



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
Universidad Nacional Autónoma de
México

ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS DE RATÓN
POR ROTAVIRUS EN UN MODELO *IN*
VITRO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A

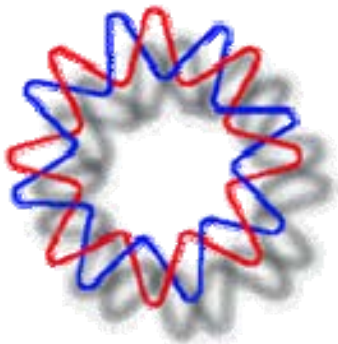
Q.F.B. TANNYA VERÓNICA VÁZQUEZ
CASTILLO

TUTOR

Dr. FERNANDO R. ESQUIVEL GUADARRAMA

Cuernavaca, Morelos.

2006





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos:

Al Dr. Fernando Esquivel por su gran apoyo y asesoría en la realización de este proyecto. Gracias por sus consejos.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Ernesto Méndez y Dr. José Luis Montiel. Gracias por su dirección y sus valiosas sugerencias en la realización de este trabajo.

A la Dra. Lourdes Gutiérrez. Por todo el apoyo brindado en la realización de este proyecto.

A la Dra. Laura Bonifaz por su asesoría en la realización de este trabajo.

A la Dra. Laura A. Palomares por su amable disposición y asesoría en la generación de las VLP's.

Al Dr. Ramón Gonzales por su disposición y apoyo, para la realización de este proyecto

A la Dra Elizabeth Mata (IBT-UNAM) y al Dr. Fernando Romero (INSP). Por el abastecimiento de los animales de experimentación utilizados en este trabajo.

A los miembros del Jurado:

Dra. Ivonne Rosenstein Azoulay
Dr. Fernando Esquivel Guadarrama
Dra. Angélica Santana
Dr. Tomás López Díaz
Dr. Alejandro Alagón Cano

..... por su interés y sus comentarios.

A la Dra. Angélica Santana por su amistad y sus consejos.

A l Dr. Santa Olalla. Gracias por su gran ejemplo.

Dedico este trabajo a:

A mis padres, Rocío y Manuel, por su apoyo incondicional, esfuerzo, ejemplo y dedicación.

A mi hermano y mi Cuñada. Gracias Manolito por tu ayuda y por tu ejemplo. Gracias Margarita por querer mucho a mi hermano, por tu esfuerzo y por esa nena que ya no tarda.

A mis abuelos Dña. Carmen, Don Cele, Dña Eudocia y Don Primo (†), gracias por sus consejos y cuidados.

A mis tíos que directa e indirectamente han incidido en mi vida. Gracias especialmente a: tía Lucero, tío Jaime, tía Faty, tío Jose Luis y tía Maricela.

A mis primos, gracias por los consejos y todos esos buenos momentos. Karla, Chavelita, Pedro (Periquín), Israel, Luli, Cesarín, Miguelito, Maguie, Nachito, Mariela, Eddy, Pamela y todos los demás.

A mis amigos de Poza Rica. Las tres chifladas: Yazmín, Ury and me. Gracias principalmente por su amistad, por todos esos padrisimos momentos, por los consejos y por lo que falta. Mayita la mejor amiga, gracias por tus consejos. Rafita, mi hermanito postizo, gracias amiguito por tus consejos y tu amistad incondicional.

A mis amigos de Xalapa. Mi amiga de siempre Beatriz Sesma, gracias por tu ejemplo, ayuda, por la hospitalidad de tu familia, por todos esos buenos momentos. A Claudia y Marilyn por los buenos momentos en el laboratorio y fuera de él. A Orlenda y Beatriz Toledano, Gracias por su amistad, su apoyo y por los momentos divertidos. A Richie mi amiguito, con cariño, gracias amigo por tus consejos, tus oraciones y tu amistad.

A los de Cuernavaca. A Joel, Lucy, Camilo y Valeria, gracias por su apoyo en todo momento y por brindarme su casa, fue un placer convivir con ustedes. A mis compañeros de generación, gracias por esos buenos momentos, especialmente a Luz, José Luis, Ruben y todos los demás, Ángela gracias por tu apoyo y por tu amistad.

A mis compañeros del Laboratorio, gracias Vanesa por todos tus consejos, amistad y apoyo. Denisse, gracias por brindarme tu amistad, por escucharme, por tus consejos y tu apoyo. A Ernesto (Neto), gracias por tus consejos y enseñanzas. A Nancy, gracias por tu ayuda y amistad. A las nuevas: Lulú y Cecilia, las superdivertidas. Oscar, gracias por los momentos divertidos y por los consejos, Coral y Dianis, gracias por su amistad, Alejandra y Adrián, por los buenos momentos. Adán, Marco y Eder, por el apoyo y compañía. Raúl y Gema, por los momentos divertidos.

A los chavos del Laboratorio de la Dra. Lourdez Gutiérrez. Adolfo, Tanya, Anita, Minerva, Humberto, Mario, Ruth. Gracias por el asilo y por su ayuda,

A los chavos del Laboratorio del Dr. Ramón Glz. Gracias por el apoyo y los consejos. Francisco, Mayra, Norma y Mery.

A los chavos del laboratorio de la Dra Palomares. Gracias Jimmy por tu asesoría, Vanessa por el apoyo. Julio Cesar, Toño Serrato y los demás.

A Gibrán Pérez del laboratorio de la Dra. Laura Bonifaz por su asesoría y consejos.

El presente trabajo fue realizado en el departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la asesoría del Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con No de registro 181158.

ABREVIATURAS

- BCR:** Receptor de célula B
- CD:** Células dendríticas
- CDp:** Célula dendrítica plasmocitoide
- Células B:** Linfocitos B
- Células Tc:** Linfocitos T citotóxicos
- Células Th:** Linfocitos T cooperadores
- CMV:** Citomegalovirus
- CPA:** Célula presentadora de antígeno
- DD:** Dominio de muerte
- EAP:** Epitelio asociado al folículo
- GC:** Centros germinales
- GLM:** Ganglio linfático mesentérico
- GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
- HIV:** Virus de inmunodeficiencia humana
- HEV:** Vénulas endoteliales altas
- HSP:** Proteína del choque térmico
- HSV:** Virus herpes simplex
- IFN:** Interferón
- IL:** Interleucina
- IMF:** Intensidad media de fluorescencia
- IRF:** Factor regulador de IFN
- ISRE:** Elemento de respuesta sensible a IFN
- LAL:** Lisado de amebocitos de Limulus
- LBP:** Proteína de unión al LPS
- LP:** Lámina propia
- LPS:** Lipopolisacárido
- LRR:** Repeticiones ricas en leucina
- MAL:** Proteína adaptadora tipo MyD88 también conocida como TIRAP
- MDI:** Multiplicidad de infección
- MHC:** Complejo principal de histocompatibilidad
- MIIC:** Compartimentos ricos en MHC II
- MMTV:** Virus mamario tumoral de ratón
- MO:** Médula ósea
- MyD88:** Molécula de diferenciación mieloide
- NK:** Linfocitos asesinos naturales
- NSP:** Proteína no estructural

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos
PKR: Proteína cinasa R
PMN: Polimorfonucleares
PP: Placa de Péyer
PRR: Receptores de reconocimiento de patógenos
R: Región
RE: Retículo endoplasmático
RNAcs: Ácido ribonucleico de cadena sencilla
RNAdc: Ácido ribonucleico de doble cadena
RSV: Virus sincicial respiratorio
RV: Rotavirus
SED: Domo subepitelial de la placa de Péyer
SCID: Ratones con inmunodeficiencia severa
SFB: Suero fetal bovino
TAP: Transportador asociado con el procesamiento del antígeno
TCR: Receptor de célula T
TGF- β : Factor transformante de crecimiento
TI: Timo independiente
TIR: Receptor Toll/IL-1
TLR: Receptor tipo Toll
TNC: Buffer en el que se encuentra disuelto RV
TNF: Factor de necrosis tumoral
TRAF: Factor asociado al receptor de TNF
TRIF: Molécula adaptadora un dominio TIR
UFF: Unidades formadoras de focos
VLP's: Pseudopartículas virales
VP: Proteína viral
VSV: Virus de estomatitis vesicular

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Infección por rotavirus	3
a) Generalidades	3
b) Estructura viral	4
c) Clasificación y epidemiología	5
d) Ciclo replicativo	6
1.2. Generalidades de la respuesta inmune	8
a) Respuesta Inmune innata	9
b) Respuesta Inmune adaptativa	10
c) Respuesta inmune de mucosa intestinal	11
1.3. Respuesta inmune en la infección por rotavirus	13
a) Modelo de estudio en la infección por rotavirus	13
c) Respuesta inmune adaptativa contra rotavirus	14
1.4. Células dendríticas	16
a) Generalidades	16
b) Maduración de las células dendríticas y estimulación de linfocitos T	17
c) Origen clasificación y distribución de las CD de ratón	19
d) Células dendríticas del tejido linfoide asociado a mucosa intestinal	20
e) Procesamiento y presentación de antígeno	21
1. <i>Complejo mayor de histocompatibilidad clase I (Vía endógena clásica)</i>	21
• <i>Vía endógena de MHC I</i>	22
• <i>Presentación cruzada y de antígenos exógenos por MHC I</i>	22
2. <i>Presentación de antígeno vía MHC II (Vía exógena clásica)</i>	22
1.5. Receptores tipo Toll	24
a) Generalidades	24
b) TLR4	28
c) Reconocimiento de LPS por TLR4 y señalización	28
1. <i>Señalización dependiente de MyD88</i>	29
2. <i>Señalización independiente de MyD88</i>	30
II. ANTECEDENTES	31
2.1. Reconocimiento viral por los TLR's	31
III. HIPÓTESIS	35
IV. OBJETIVOS	36
4.1. Objetivo general	36
4.2. Objetivos Particulares	36
V. MATERIALES Y MÉTODOS	37
5.1. Medios de cultivo	37
5.2. Ratonés	37
5.3. Virus	37
5.4. Líneas celulares, cultivo y estimulación	37
a) <i>Líneas celulares</i>	38
b) <i>Cultivo de células adherentes</i>	38
c) <i>Cultivo de células en suspensión</i>	39
d) <i>Obtención de sobrenadante (SN) rico en GM-CSF a partir de células CHO</i>	39
5.5. Obtención y estimulación de CD derivadas de médula ósea	39
a) <i>Obtención de médula ósea de ratón</i>	40
b) <i>Diferenciación de células de médula ósea a células dendríticas</i>	40

c) Purificación positiva de células CD 11c ⁺ por columna magnética	40
d) Estimulación de las células dendríticas de médula ósea	41
5.6. Amplificación viral in vitro	41
a) Propagación viral	41
b) Titulación de rotavirus	41
c) Generación de pseudopartículas virales (VLP's "virus like particles")	42
d) Semipurificación por colchón de sacarosa	42
e) Purificación por Cloruro de Cesio	43
5.7. Análisis de proteínas	43
a) Cuantificación de proteína	43
b) Geles de poliacrilamida y tinción con plata	44
c) Análisis por Western Blot	45
5.8. Citofluorometría	45
a) Anticuerpos	45
b) Tinción de marcadores externos	45
c) Tinción de citocinas intracelulares	46
5.9. Microscopía	46
a) Inmunoperoxidasa y tinción con Cristal violeta de las CDs	46
b) Inmunofluorescencia	46
5.10. Análisis estadístico	47
VI. RESULTADOS	48
6.1 Generación de células dendríticas a partir de precursores de médula ósea	49
6.2. Estimulación de CDMO con rotavirus	51
a) CD40	51
b) MHC II	55
c) CD80	56
d) IL-12	58
6.3. Microscopía de las CDMO en presencia de rotavirus	59
VII. DISCUSIÓN	61
VIII. CONCLUSIONES	70
IX. PERSPECTIVAS	71
X. BIBLIOGRAFÍA	72

RESUMEN

Rotavirus es un agente etiológico importante de gastroenteritis severas en infantes humanos, causante de cerca de 600,000 muertes anualmente. Debido a que la infección por rotavirus es de rápida resolución, se propone que el sistema inmune innato intestinal puede estar participando de manera importante en la contención de la infección que ocurre solo en los enterocitos maduros del intestino delgado y así generar una respuesta inmune adquirida eficiente. Las células dendríticas (CD) son las principales células presentadoras de antígeno por estar involucradas en la inducción de la respuesta inmune primaria, podrían ser las primeras en sensar la presencia de patógenos en el intestino, que induciría el incremento de moléculas como CD80, CD86, CD40 y MHC II en la superficie de las CD lo que las capacitaría para activar a linfocitos T cooperadores, T citotóxicos y B.

Debido al papel tan importante que tiene rotavirus en enfermedades diarreicas infantiles, existe un interés en la comprensión de la participación del sistema inmune innato, en particular de las células dendríticas, en la respuesta a la infección. Esto permitirá contar con más herramientas para el control de la enfermedad.

El objetivo de este trabajo fue analizar la respuesta de las CD de ratón al interactuar con rotavirus en un modelo in vitro. Se generaron CD a partir de precursores de médula ósea de ratón en presencia de GM-CSF. Estas células fueron estimuladas con rotavirus, pseudopartículas virales de rotavirus y el genoma viral (RNAdc) y analizadas por citofluorometría, midiendo la expresión de CD80, CD40 y MHC II sobre su superficie. De igual manera se determinó si rotavirus inducía la producción de IL-12 en las CD. Por medio de inmunofluorescencia detectando NSP3, se determinó si rotavirus era capaz de infectar a las CD a través de la presencia de la proteína no estructural NSP3, sintetizada solo durante la replicación viral.

Rotavirus indujo un incremento en el porcentaje de la expresión de CD40 en las CD, pero no así de CD80 ó MHC II. Resultados similares se encontraron cuando las CD se cultivaron en presencia de pseudopartículas virales de rotavirus, sin embargo, no se observó cambio alguno en las moléculas de superficie cuando las CD se cultivaron en presencia del RNAdc del virus.

Rotavirus no indujo la producción de IL-12 por las CD. Finalmente, se encontró que sólo un número reducido de CD se infectó con rotavirus.

Esto nos indica que las CD se activan por rotavirus. En este evento participan las proteínas pero no el genoma viral. Por otro lado, las CD podrían tener cierta permisividad a la infección, tal vez como un mecanismo para sensar al virus de manera más eficiente. La activación e infección de las CD, podría ser una de las primeras respuestas del sistema inmune innato en contra de este patógeno.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Infección por rotavirus.

a) Generalidades

Las gastroenteritis infecciosas son una causa importante de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo. Rotavirus es reconocido como el principal causante de gastroenteritis en bebés y niños pequeños (Cunliffe *et al.*, 2002). Los rotavirus se transmiten de persona a persona principalmente por vía fecal – oral. El contacto directo es requerido usualmente para la infección, pudiéndose encontrar el virus sobre las superficies expuestas al ambiente (Arias y López 2000).

La infección por rotavirus ocurre en todos los periodos de la vida del hombre, pero la infección primaria manifestada por enfermedad diarreica ocurre típicamente en niños de entre seis meses y dos años de edad (Kapikian *et al.*, 2001). Las manifestaciones clínicas de la infección son fiebre y vómito por dos o tres días seguidos por diarrea no sanguinolenta. Esto puede conducir a deshidratación grave que, si no es atendida a tiempo, puede causar la muerte (Sharma *et al.*, 2002). Por otro lado, rotavirus también infecta neonatos de varias especies de mamíferos y aves generando pérdidas económicas en el área veterinaria (Kapikian and Chanock 1996). La infección por rotavirus es estacional, con picos de incidencia en el periodo invernal en zonas templadas, ocurriendo durante todo el año en climas tropicales (Shaw *et al.*, 1999).

Aunque el impacto de la gastroenteritis por rotavirus es más notorio en países en vías de desarrollo, en realidad este virus afecta también a países desarrollados. Globalmente, los rotavirus causan más de 125 millones de casos de diarrea, ocasionando la muerte de 352,000 a 592,000 niños anualmente en todo el mundo (Parashar *et al.* 2003; Rivest *et al.*, 2004).

Después de su ingestión, los rotavirus llegan al intestino delgado donde entran a los enterocitos maduros por un mecanismo no bien definido, pero se propone que podría ser a través de entrada directa o endocitosis dependiente de calcio (Lundgren and Svansson 2001). Los mecanismos por los cuales rotavirus induce diarrea no han sido totalmente dilucidados. La infección altera la función absorbiva del epitelio intestinal, siendo la diarrea atribuida a diferentes factores como:

muerte celular asociada al virus, descamación del epitelio (villi), mala absorción que produce el tránsito de carbohidratos, grasas y proteínas no digeridas al colón (cuya capacidad absorptiva es menor) y la estimulación del sistema nervioso entérico que promueve la secreción de fluidos y solutos y la motilidad intestinal resultando en disminución del tiempo de tránsito (Lundgren *et al.*, 2000). Como no existe una correlación entre las lesiones intestinales y la presencia de diarrea se ha propuesto que al menos en parte la proteína no estructural de rotavirus NSP4 es la causante de inducir diarrea, pues es capaz de estimular la secreción transepitelial de cloro por una vía dependiente de calcio lo que desequilibra el balance iónico de la célula y provoca la salida de agua (Estes and Morris 1999 ; Graham *et al.*, 1984; Raming 2004). Es muy probable que la diarrea inducida por rotavirus sea resultado de la participación simultánea de todos estos mecanismos. La infección por rotavirus tradicionalmente ha sido limitada al tracto intestinal, pero recientemente fue reportada la distribución extraintestinal de rotavirus durante la infección en modelos animales lo que sugiere que existe un mayor rango de tejidos susceptibles a la infección (Mossel *et al.*, 2004; Ramig *et al.*, 2004).

Debido al papel tan importante que tienen los rotavirus en las enfermedades diarreicas infantiles, existe un interés considerable en desarrollar estrategias de vacunación que sean eficaces para controlar la severidad de la diarrea causada por este virus lo cual se verá facilitado siempre y cuando se tenga un mejor entendimiento del papel del sistema inmune en la limpieza y contención de la infección.

b) Estructura viral

En 1973 Bishop y colaboradores en Australia, mediante el uso de microscopía electrónica, lograron identificar el primer rotavirus humano por su apariencia particular de rueda dentada. El virus fue detectado en biopsias duodenales de niños entre los 6 a 9 meses de edad con diarrea aguda.

Rotavirus es un virus de RNA de doble cadena (RNA_{dc}) perteneciente a la familia *Reoviridae*, que carece de envoltura lipídica, posee estructura icosaédrica y mide aproximadamente 75 nm de diámetro (Prasad and Chiu 1994). El genoma viral consiste de 11 segmentos de ARN_{dc}, 6 de ellos codifican para 6 proteínas estructurales (VP, del inglés “viral protein”), que conforman las

partículas virales las cuales están constituidas por 3 capas concéntricas de proteínas. Los 5 segmentos restantes codifican para 6 proteínas no estructurales (NSP, del inglés “non-structural protein”) presentes solo en la célula infectada, que juegan un papel importante en la replicación y morfogénesis del virus (Arias y López 2000; Patton 1995).

La capa más interna que forma la nucleocápside está conformada por VP2 que esta compuesta por 60 dímeros, asociadas a su cara interna se encuentran la polimerasa viral VP1 y VP3 una guanilil transferasa que promueve el “capping” de los RNA mensajeros (Arias y López, 2000).

La capa intermedia esta formada por 260 trímeros de VP6, una proteína hidrofóbica muy estable. Tiene un papel importante dentro de la estructura del virión, debido a que interacciona con la proteína VP2 de la capa interna y con las proteínas VP4 y VP7 de la capa externa. VP6 es la más abundante del virión y constituye aproximadamente el 50 % de la masa total, (Prasad *et al.*, 1988; Lawton *et al.*, 1997).

La capa más externa del virión está formada por 260 trímeros de la glicoproteína VP7. Esta proteína es altamente inmunogénica, siendo además la segunda más abundante del virión. Sobre esta capa emergen 60 espículas de la proteína VP4 que miden aproximadamente 120 Å. El tratamiento del virión con enzimas proteolíticas como la tripsina, incrementa dramáticamente la infectividad de rotavirus, debido al rompimiento de VP4 en los de aminoácidos 241 y 247 que da lugar a dos polipéptidos VP5 y VP8. Esto genera un cambio conformacional de la molécula en la que VP5 forma el tallo de la espícula y VP8 la región globular, ambas moléculas participan en el proceso infeccioso del virus (Arias y López 2000).

c) Clasificación y epidemiología

Los rotavirus se clasifican dependiendo de sus características antigénicas en 6 grupos (A-G) que difieren en su antigenicidad y epidemiología. Los rotavirus del Grupo A son los de mayor importancia desde el punto de vista clínico, este grupo está asociado con diarrea en niños. También existen cepas de este grupo capaces de infectar a una amplia gama de especies animales, tanto silvestres como de granja, que son la causa de grandes daños económicos (Kapikian y Chanock 1996). El grupo B ha causado epidemias en China, tanto en niños como en adultos y se han informado casos esporádicos en otras partes del mundo (Hung *et al.*, 1984). Así mismo, en

Asia se ha demostrado que ciertas poblaciones poseen anticuerpos para rotavirus del grupo B (Brown *et al.*, 1987). El grupo C ha causado brotes de diarrea en niños en países como Australia, Brasil y Reino Unido (Bridger *et al.*, 1986).

En México como alrededor del mundo prevalecen los rotavirus del grupo A (Padilla-Noriega *et al.*, 1998). Velázquez y cols. (2004) demostraron que de los episodios de diarrea severa, ocurridos durante las estaciones de otoño e invierno, el 62 al 68 % de los casos, fueron positivos a rotavirus (Velázquez *et al.*, 2004). Braine (2005) afirma que en México ocurren 1000 muertes anualmente, debido a la infección por rotavirus.

Basándose en diferencias antigénicas de epítopes del antígeno mayor VP6 detectados por anticuerpos monoclonales los rotavirus del grupo A se han clasificado en los subgrupos I, II, I+II no I y no II (Gray and Desselberg 2000). El grupo A, a su vez se divide en serotipos determinados por las proteínas VP4 (tipo “P”, por proteína sensible a proteasa) y VP7 (tipo “G”, por glicoproteína) las cuales son blanco principales de anticuerpos neutralizantes (Mattion *et al.*, 1994). Hasta la fecha se han definido 14 serotipos G, de los cuales principalmente G1 a G4 tienen relevancia clínica, sin embargo los serotipos G5, G8 y G9 han llegado a ser importantes y 12 serotipos P, de estos, sólo 4 infectan al humano (P1A, P1B, P2 y P3) (Kapikian y Chanock 1996).

d) Ciclo replicativo

In vivo los rotavirus se replican principalmente en los enterocitos maduros del epitelio intestinal, localizados en las puntas de las vellosidades del intestino delgado. Sin embargo, reportes recientes sugieren que durante la infección puede ocurrir una distribución extraintestinal del virus. La replicación del virus *in vitro* esta limitada a líneas celulares epiteliales intestinales y renales. La mayoría de los estudios de replicación viral han sido efectuados *in vitro* en células epiteliales de riñón de mono (MA-104) que han sido una gran herramienta de investigación, sin embargo no representan completamente las interacciones que pueden llevarse a cabo *in vivo* (Arias y López 2000).

Los rotavirus inician su ciclo de replicación uniéndose a un receptor localizado en la superficie de la célula a través de las proteínas VP5 y VP8 que son en realidad el producto de la digestión de VP4 por tripsina y VP7. Después de que ocurre la unión, el virus es internalizado en un tiempo de 60-90 minutos, durante la penetración al interior de la célula pierden la capa externa, con lo cual se activa la transcripción (Estes 1996). La unión de algunas cepas de rotavirus a la célula huésped se lleva a cabo de manera dependiente de ácido siálico (AS:ácido N-acetilneuraminico) a través de VP8. Sin embargo se ha establecido que la unión de la mayoría de las especies de rotavirus al receptor que contiene AS no es esencial, ya que se han aislado variantes cuya infectividad es independiente de la presencia de AS, pero dependiente de la integrina celular $\alpha 2\beta 1$, que se une a VP5 (Graham *et al.*, 2003; Méndez *et al.*, 1993). La interacción con $\alpha 2\beta 1$ también es usada por virus que se unen a las células de manera dependiente AS. Después de esta segunda interacción, suceden tres interacciones más con proteínas presentes en la superficie de la célula. Aunque el orden de estas interacciones aun no ha sido establecido, se ha demostrado que VP5 interacciona con hsc70 y VP7 con las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha x\beta 2$ (Gray and Desselberg 2000; Estes 1996; López and Arias 2004).

El mecanismo de penetración del virus a la célula es controversial. Se ha postulado la penetración directa del virus a la célula como un mecanismo de entrada. Alternativamente se ha propuesto un modelo de endocitosis dependiente de calcio, basándose en la observación de que la bafilomicina A, un fármaco que inhibe la bomba de protones endosomal, bloquea la infección por rotavirus (Chemello *et al.*, 2002). Esta vía fue descrita como endocitosis dependiente de balsas y es definida por su independencia de clatrina y caveolina, su dependencia de dinamina y su sensibilidad a la depleción de colesterol (Sanchez-San Martín., 2003). Después de la internalización del virus al citoplasma celular, el genoma es transcrito a partir de partículas que carecen de la capa externa. El inicio de la síntesis de los mensajeros virales se lleva a cabo dentro de éstas partículas por medio de la acción concertada de la transcriptasa viral VP1 y la guanilil transferasa VP3. Los ARNs mensajeros sintetizados tienen una doble función: son traducidos para sintetizar las proteínas virales y son empleados como plantillas para sintetizar el RNAdc que constituirá el genoma de la progenie viral. (Estes 1996; Arias y López 2000; López and Arias 2004).

Una vez sintetizada una masa crítica de proteínas virales, estas se acumulan en el citoplasma de las células infectadas en forma de grandes inclusiones citoplasmáticas llamadas viroplasmias, donde al parecer las partículas de dos capas son ensambladas y donde se lleva a cabo la replicación del genoma viral. La traducción de los ARNm de los rotavirus se efectúa en ribosomas que pueden estar libres o asociados al RE. A medida que progresa la síntesis de proteínas virales, disminuye la síntesis de proteínas celulares, la cual se abate casi en su totalidad. La encapsidación del genoma se lleva a cabo mediante la interacción de los segmentos de ARNm con las proteínas de la nucleocápside. Una vez que esta última se ha formado, los segmentos de ARNm son internalizados y la adición de trimeros de la proteína VP6 de la capa intermedia a las nucleocápsides lleva a la formación de una partícula mayor que tiene actividad de transcriptasa.

Una vez que las DLP's han sido formadas y que se ha replicado completamente el genoma, estas partículas geman al RE donde el virus adquiere las proteínas de la capa externa. La interacción de NSP4 (proteína integral de la membrana del RE) con VP6, VP7 y VP4 media la gemación de las partículas hacia el interior del RE donde las partículas adquieren una cubierta lipídica temporal que es donde finalmente se ensamblan las proteínas de la capa externa (Dector et al., 2002). Esto resulta en la formación de partículas virales maduras con sus tres capas de proteína. El ciclo replicativo termina cuando la progenie del virus es liberada por la lisis de la célula huésped, favorecida por alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática de la célula infectada (Estes 1996; Arias y Lopez 2000). Finalmente, los rotavirus infecciosos son excretados en grandes cantidades en las heces a partir de donde puede llevarse a cabo el nuevo contagio o reinfección.

1.2 Generalidades de la respuesta inmune

La inmunidad en vertebrados puede ser dividida en inmunidad innata e inmunidad adaptativa, ambas respuestas funcionan de una manera coordinada para proteger en contra de patógenos y sustancias extrañas que pudieran dañar la integridad del individuo.

a) Respuesta Inmune innata

La inmunidad innata es la primera defensa del organismo para combatir a los patógenos. Está compuesta por: a) barreras anatómicas, como la piel y las membranas mucosas, b) barreras fisiológicas como la temperatura y el pH, c) varios factores solubles como lisozima, los interferones y el sistema del complemento y c) células del sistema inmune innato. La lisozima esta presente en mucosa y lágrimas y su principal función es la degradación de paredes bacterianas. Los interferones (IFN) son un grupo de proteínas producidas por células infectadas por virus o patógenos intracelulares, cuya función entre otras es generar un estado de alerta en las células vecinas. El sistema del complemento es un complejo enzimático que se une a las paredes bacterianas y permite que los microorganismos cubiertos por estas moléculas sean más susceptibles a la fagocitosis. La activación final del mismo desencadena en la formación de un poro transmembranal en la superficie de los microorganismos, lo que produce su muerte por lisis osmótica.

Asímismo la inmunidad innata esta formada por barreras mediadas por diferentes estirpes celulares entre las que destacan las células presentadoras de antígeno (CPA); como células dendríticas y macrófagos y otras células fagocíticas y citolíticas como neutrófilos, células asesinas naturales (NK), eosinofilos, etc. La principal función de estas células es el reconocimiento de agentes extraños al organismo a través de mecanismos efectores directos y/o de la generación de señales de alarma (como quimiocinas y citocinas). Esta respuesta se genera de una manera relativamente rápida, en cuanto el microorganismo o macromolécula entra en contacto con el organismo. Las principales características de la inmunidad innata son que su activación no induce la generación de memoria y que no existe recombinación de sus receptores de membrana pues son codificados en la línea germinal (Chandrashekhar *et al.*, 2004).

En la actualidad se han descrito receptores de membrana presentes en células del sistema inmune innato, principalmente en células dendríticas que promueven la activación de la respuesta adquirida. Estos receptores son denominados “receptores tipo Toll” (TLR del inglés “Toll-like receptor”), los cuales reconocen un grupo limitado pero altamente conservado de patrones moleculares de microorganismos. La activación de los TLR’s resulta en la inducción de genes involucrados en actividad antimicrobiana y en la maduración de las CPA, que participan de

manera importante en la inducción de la respuesta inmune adquirida a través de mediadores solubles tales como quimiocinas o citocinas (Akira, *et al.*, 2003).

b) Respuesta Inmune adaptativa

La inmunidad adaptativa es mediada por linfocitos B y T, se caracteriza por ser específica y generar memoria. Las membranas de ambos linfocitos tienen receptores específicos de unión a antígenos (BCR y TCR respectivamente), producidos por la recombinación de segmentos génicos.

Las células B se dividen en células B1 y B2. Las células B1 contribuyen fuertemente a algunas respuestas innatas, a través de antígenos formados por carbohidratos. Las células B1 son la fuente principal de anticuerpos IgM y son capaces de producir anticuerpos IgA de manera independiente de células T. Las células B2 intervienen en la respuesta inmune adaptativa. El receptor sobre las células B2 es una molécula de inmunoglobulina (Ig) que reconoce e interactúa con el antígeno directamente. Esta interacción conlleva a su activación y diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos, cuya función principal es neutralizar a patógenos y toxinas que invaden al organismo.

El receptor de la célula T está constituido por dos cadenas (α y β) unidas entre sí por puentes disulfuro, insertadas en la membrana celular con un dominio citoplasmático muy corto que se asocia a un complejo proteínico denominado CD3. El complejo CD3 está conformado por tres proteínas homólogas insertadas en la membrana celular (γ , δ y ϵ) y a un homodímero de cadenas ζ . CD3 y ζ contienen dominios citoplasmáticos que dan inicio a la transducción de señales hacia el núcleo. El TCR solo reconoce antígenos que estén combinados tanto con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I ó clase II en la superficie de CPA. Las principales poblaciones de células T son los linfocitos Th y Tc. Las células Th expresan la glicoproteína de membrana CD4, a través de su TCR reconocen péptidos de 14 a 25 aminoácidos derivados de la degradación de proteínas exógenas por CPA) unidos a MHC II en la membrana celular (Trombetta and Mellman 2005). La activación de las células Th es esencial para la proliferación y diferenciación de las células Tc y células B a través de la secreción de citocinas e interacciones celulares. Las células Tc expresan la molécula CD8 y a través de su TCR reconocen

péptidos de 8 a 10 aminoácidos producidos por la degradación de proteínas antigénicas en el citosol de CPA, asociados a las moléculas MHC I. La principal función de estas células es el reconocimiento y eliminación de células tumorales o células infectadas por patógenos intracelulares a través de citotoxicidad directa. La citotoxicidad puede ser mediada por perforina (que es capaz de formar poros en la membrana) y granzima (que penetra a la célula diana por los poros formados y es capaz de activar caspasas) o bien por inducción de apoptosis a través de la molécula Fas en la membrana celular. Las células Tc secretan proteínas antivirales y promotoras de la presentación de antígeno como el interferón gama (INF- γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF).

c) Respuesta inmune de mucosa intestinal

Además de su función digestiva, de transporte, absorción de nutrientes y agua y producción de hormonas, el epitelio intestinal funciona como una barrera entre el huésped y su ambiente externo (Sansonetti. 2004). La superficie de la mucosa intestinal esta cubierta principalmente por una delgada capa de célula epiteliales absorptivas, estas células poseen prolongaciones membranales que forman microvellosidades en su superficie. Estas células denominadas enterocitos, están conectadas entre sí, principalmente por uniones estrechas, caracterizadas por la presencia de proteínas transmembranales tales como claudina y ocludina que regulan muy estrictamente el paso de moléculas menores a 2 KDa. Aunque no es parte del epitelio, otro componente del sistema es el moco, constituido principalmente por mucinas, que cubre a las células epiteliales del contacto directo con el ambiente luminal externo (Kato and Owen 1999).

La función de barrera, del tejido epitelial de mucosa es proteger permanentemente al organismo contra la invasión y diseminación sistémica de microorganismos comensales y patógenos, sin embargo cuando se rebasa esta barrera el tejido epitelial es vulnerable a la de entrada de los mismos.

Desde un punto de vista funcional, el sistema inmune de mucosas se divide en sitios inductores, donde los antígenos que atraviesan la barrera epitelial pueden generar respuesta de células linfoides, y en sitios efectores donde las células efectoras realizan su función (Lycke 2002). El sitio inductor principal esta constituido por las placas de Peyer (PP), que son áreas organizadas de

tejido linfoide, localizadas principalmente en el íleon distal. Las PP están formadas por folículos linfoides de células B con centros germinales (GC) rodeados por zonas pobladas principalmente por células T y CPA. En el domo de la PP (SED) están presentes células plasmáticas, células dendríticas, macrófagos y en menor número células T y B. A su vez el domo está cubierto por el epitelio asociado al folículo (FAE), caracterizado por la presencia de unas células especializadas denominadas células M, cuyo nombre deriva de los microplegamientos presentes en la zona apical de las células. A diferencia de las células epiteliales, las células M carecen de glicocalix lo que las hace más susceptibles al contacto y entrada de antígenos (McGhee and Kiono 1999; Lycke 2002 Sansonetti 2004).

Las células M no llevan a cabo degradación de antígenos, sino que permiten su translocación, (incluyendo microorganismos) del lumen intestinal a la región basolateral del epitelio donde los antígenos pueden interactuar con CPA presentes en el domo de la PP y dar inicio a la respuesta inmune (McGhee and Kiono 1999). El antígeno capturado por las CPA es presentado a las células T y B presentes en la PP. Estas células activadas migran por medio de vénulas endoteliales altas (HEV) hacia los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) donde proliferan para posteriormente entrar a la circulación a través del ducto torácico, regresando predominantemente a la lámina propia (LP) intestinal (el principal sitio efector). Esta migración puede darse por la presencia de “homing receptors” (receptores de direccionalidad) en la superficie de las células, los cuales están conformados por el heterodímero de las integrinas $\alpha_4\beta_7$ y la quimiocina CCR9, específicos para tejidos linfoides asociados a la mucosa intestinal. Los ligandos de estas moléculas son la adhesina MADCAM-1 y el receptor de quimiocina CCL25 respectivamente, ambos presentes en el endotelio de los vasos capilares intestinales (Lycke 2002; Svensson *et al.*, 2002).

La LP intestinal es una cubierta de tejido conectivo, que está localizada por debajo del epitelio, esta constituida por células de músculo liso y fibroblastos (McDonald 2003). La característica más importante de la LP es que alberga prácticamente todos los componentes celulares como CPA (incluyendo células dendríticas), eosinófilos, células T y B, etc. necesarios para funcionar como una barrera. Es en la LP donde las células B secretan IgA, que son vertidas en el lumen intestinal donde participan efectivamente en la neutralización de antígenos (Kukel *et al.*, 2003;

Staat *et al.*, 1994).

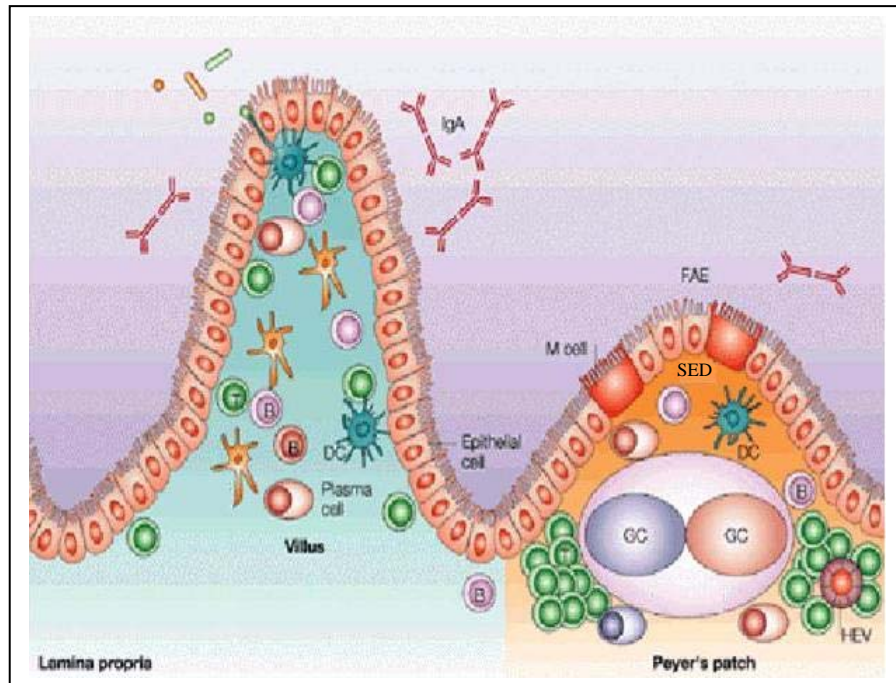


Figura 1.1 Tejido linfático asociado a mucosa intestinal (Modificado de Fagarasan and Honjo, 2002).

1.3. Respuesta inmune en la infección por rotavirus

a) Modelo de estudio en la infección por rotavirus

El mejor modelo de estudio en la infección por rotavirus es el modelo de ratón. Tanto el ratón adulto como el neonato son susceptibles a la infección por rotavirus murinos o de otras especies (heterólogos). Sin embargo, (al igual que en el humano) solo en neonatos se observa diarrea. En ratones adultos la infección es asintomática, por lo que el parámetro principal de infección es la cantidad de virus excretado en las heces (Ward *et al.*, 1990; Burns *et al.*, 1995).

b) Respuesta inmune innata contra rotavirus

La participación de los componentes de la respuesta innata ha sido poco estudiada en la infección por rotavirus en el modelo de ratón, a pesar de que se ha propuesto que esta respuesta juega un papel importante en el control inicial de la infección. Se ha demostrado que ratones deficientes en STAT-1, (un componente indispensable para las respuestas inducidas por IFN tipo I y II),

presentan títulos virales, muy superiores (100 veces más) a los ratones control (Vancott *et al.*, 2003). En estos ratones se observó replicación viral extraintestinal, lo que sugiere que los IFN podrían estar participando en la contención de la infección al intestino. Las fuentes de esta citocina podrían ser macrófagos, células dendríticas o bien linfocitos intraepiteliales, favoreciendo el inicio de la respuesta inmune y el bloqueo de la producción de partículas virales.

c) Respuesta inmune adaptativa contra rotavirus

En la infección por rotavirus se induce una potente respuesta de anticuerpos séricos e intestinales, tanto en humanos como en los diferentes modelos animales (Offit *et al.*, 1994). La aparición de anticuerpos IgA's intestinales anti-rotavirus correlaciona con la resolución de la infección primaria. Sin embargo los anticuerpos neutralizantes (dirigidos contra las proteínas VP4 y VP7) en suero y en intestino, aunque participan en la resolución de la infección primaria, no correlacionan con protección después del desafío con rotavirus (Ward 1996). Los anticuerpos no neutralizantes predominantes son dirigidos hacia la proteína estructural VP6 y pueden mediar la inmunidad contra rotavirus *in vivo* (Franco and Greenberg 1999). Aunque los demás componentes del sistema inmune participan en la resolución de la infección primaria contra rotavirus (como se explicará más adelante) la resistencia completa a la reinfección es absolutamente dependiente de anticuerpos (Franco and Greenberg 1996). Por otro lado Blutt y colaboradores (2002) demostraron que existe un incremento en el número de células B en PP y en GLM en ratones infectados con rotavirus entre 1 y 6 días después de la infección, y que la activación de las mismas parece ser a través de un mecanismo independiente de células T. Asimismo, demostraron que la activación policlonal de los linfocitos B inducida por rotavirus ocurre en parte debido a la conformación estructural de la proteína de cápside externa VP7 (Blutt *et al.*, 2004^a). Sin embargo, se ha demostrado que los anticuerpos policlonales secretados por las células B1 (inmunidad innata) no son capaces de abatir la infección por rotavirus en ratones con inmunodeficiencia severa (SCID) y que las células B2 (inmunidad adaptativa) son la principal fuente de anticuerpos IgA específicos para rotavirus (Kushnir *et al.*, 2001).

Así también, se demostró que ratones knockout del TCR $\alpha\beta$ ($-/-$) y ratones Nude (atímicos) resolvieron la infección primaria contra rotavirus y desarrollaron anticuerpos IgA intestinales rotavirus específicos. Esto sugiere que las células T son importantes, pero no esenciales para el

desarrollo de anticuerpos IgA específicos contra rotavirus (Franco and Greenberg 1997). Cuando los ratones knockout del TCR $\alpha\beta$ ($-/-$) fueron desafiados 8 semanas después de la infección primaria, estos fueron resistentes a la reinfección, sugiriendo que una respuesta de anticuerpos timo independiente (TI) y un mecanismo innato pueden contribuir a la inmunidad contra rotavirus murino. En ratones normales esta respuesta corresponde al aproximadamente el 20 % del total de IgA, siendo el 80 % restante resultado de inmunidad dependiente de células T.

Finalmente, se demostró que el 40 % de los ratones con inmunodeficiencia severa SCID (deficientes en células T y B) fueron capaces de resolver la infección primaria, aunque no desarrollaron anticuerpos IgM, IgG o IgA rotavirus específicos en suero o en intestino. Esto sugiere que mecanismos innatos pueden mediar la inmunidad parcial contra rotavirus (Franco and Greenberg 1997).

La participación de las células Th en el proceso de la resolución de la infección por rotavirus ha sido muy poco estudiada. Se ha descrito que en la infección por rotavirus estas células juegan un papel importante en la completa resolución de la infección y en la producción de anticuerpos IgA intestinales e IgM, IgG e IgA séricos específicos contra rotavirus (Franco and Greenberg 1997; McNeal *et al.*, 1997). Se ha demostrado que la proteína de la capa intermedia de rotavirus VP6 es un antígeno blanco importante en ratones inmunizados con rotavirus (Bruce *et al.*, 1994). Así, Baños y colaboradores (1997) demostraron que la secuencia 289-302 de VP6 que se encuentra conservada en las diferentes cepas de rotavirus, es capaz de generar un reconocimiento heterotípico por parte de las células Th (Baños *et al.*, 1997). A nivel funcional Franco y Greenberg (1997) observaron que en la infección por rotavirus las células Th son importantes en la inducción de células B secretoras de IgA contra rotavirus. Así también, se ha demostrado que las células Th de memoria específicas para VP6 pueden potenciar la producción de anticuerpos neutralizantes con especificidad para las proteínas de la capa externa de rotavirus, por parte de las células B (Esquivel *et al.*, 2000).

En lo que respecta a los linfocitos Tc, en el modelo de ratón éstos participan de manera importante en la limpieza de la infección primaria por rotavirus. Son esenciales para la pronta resolución de la infección, pero no indispensables para llevar a cabo este proceso, ni para la

inducción de protección a una respuesta secundaria (Franco and Greenberg 1997; Franco and Greenberg 1999).

Dharakul y colaboradores (1990) encontraron que la presencia de rotavirus en heces fue abatida en ratones SCID, después de la transferencia pasiva de linfocitos Tc de ratones inmunocompetentes previamente inoculados con baculovirus recombinantes que expresan las proteínas VP7, VP6, VP4 y VP1 de rotavirus. Además, cuando las células Tc fueron cotransferidas con células Th específicas contra rotavirus, la resolución de la enfermedad se llevó a cabo de manera más eficiente (McNeal *et al.*, 1997). Así también, se demostró que las células Th específicas contra rotavirus pueden ejercer una función protectora directa cuando son transferidos en ratones SCID con infección crónica. Más aun, se demostró que los linfocitos Tc generados por ratones inoculados oralmente con rotavirus presentan una mejor reactividad cruzada con células blanco infectadas con vaccinia recombinante que expresan la proteína de cápside externa VP7 que aquellas que expresan las proteínas VP4 o VP6 (Offit *et al.*, 1994). Así mismo se ha demostrado la existencia de epítopes específicos para linfocitos Tc en la proteína VP7 que sobrelapan con las secuencias señal H1 y H2 para traslocación al RE (Franco *et al.*, 1993; Buesa *et al.*, 1999).

Podemos concluir que la infección por rotavirus induce una respuesta multifactorial y compleja en la que participan mecanismos de la respuesta inmune innata en la contención y en la limpieza de la infección primaria y mecanismos de la respuesta inmune adaptativa dada por la producción de anticuerpos y la actividad por parte de las células Tc y Th. Estos mecanismos parecen actuar de manera coordinada, por lo que la participación de todos ellos es necesaria para la resolución rápida y eficaz de la enfermedad, así como para la generación de inmunidad protectora.

1.4. Células dendríticas

a) Generalidades

La primera visualización de las células dendríticas (CD) fue hecha por Paul Langerhans en 1868, sin embargo fue hasta comienzos de los 70's cuando Steinman y cols. describieron una nueva población celular en los órganos linfoides periféricos de ratón, siendo los primeros en denominar

a estas células como células dendríticas (Steinman and Chon 1973).

Las CD son parte de la respuesta inmune innata y se consideran como las primeras células involucradas en iniciar la respuesta inmune adquirida con base en su capacidad como CPA profesionales potentes (Bancherau *et al.*, 2000; Carbone *et al.*, 2003). Los progenitores de las CD en la médula ósea dan origen a precursores circulantes que llegan a los tejidos donde residen como CD inmaduras con elevada capacidad fagocítica. Cuando ocurre daño al tejido y entrada de patógenos las CD inmaduras capturan el antígeno y subsecuentemente migran a los órganos linfoides, donde seleccionan a células T antígeno específicas e inician la respuesta inmune adaptativa. Así también las CD dirigen a las células efectoras para llegar al sitio donde se encuentra el tejido dañado (Banchereau *et al.*, 2000).

b) Maduración de las células dendríticas y estimulación de linfocitos T

Las CD se localizan en los principales portales de entrada de microorganismos como la piel y las mucosas, donde llevan a cabo la función de centinelas, detectando los patógenos que invaden al organismo, internalizan antígenos vía macropinocitosis, endocitosis mediada por receptor y fagocitosis. Entre los receptores que reconocen patógenos se encuentran los receptores de manosa, receptores de lectina tipo C que reconocen microorganismos cubiertos por carbohidratos y los receptores de inmunoglobulina que pueden tener una participación importante en la internalización y degradación de patógenos opsonizados (Rescigno 2002).

Las CD inmaduras pueden fagocitar eficientemente bacterias, levaduras y otros parásitos. Los antígenos internalizados son procesados por la vía endosomal lisosomal y posteriormente redistribuidos a la superficie de las células como péptidos asociados a la molécula MHC II ó alternativamente como péptidos asociados al MHC I derivados de proteínas citosólicas endógenas de antígenos tumorales o virales (Guermonprez *et al.*, 2002). Las CD inmaduras están adaptadas para endocitosis, expresando bajos niveles de moléculas MHC clase I y II y moléculas co-estimuladoras como CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) y CD40; después de detectar al patógeno o citocinas pro-inflamatorias las CD inmaduras se transforman en células maduras con capacidad reducida para captar el antígeno (Banchereau *et al.*, 2000), pero con una capacidad excepcional para estimular células T a través del incremento de las moléculas MHC cargadas con péptido

antigénico en la superficie de las células (Mellman and Steinman 2001). Además presentan otras características como mayor expresión de moléculas co-estimuladoras en la membrana celular, liberación de citocinas o quimiocinas y cambio en la morfología al extender largas dendritas que pueden incrementar la oportunidad para capturar e interactuar con células T a través de los ligandos CD28 para B7-1 y 2 y CD154 (CD40L) para CD40 (Mellman and Steinman 2001; Banchereau *et al.*, 2000). La señal de unión de las moléculas MHC-péptido de las CD con los TCR de las células Th (señal 1) no es suficiente para activarlas, señales adicionales son proveídas por las moléculas co-estimuladoras (señal 2) y citocinas (señal 3). Además, la interacción de las CD con células T esta mediada por algunas moléculas de adhesión, como las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ y miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (CD2, CD50, CD54 y CD58) (Banchereau *et al.*, 2000).

Los TLRs presentes en los diferentes subtipos de CD, al sentir la presencia de patógenos, son capaces de inducir la maduración de las CD (Reis e Sousa. 2004). No solo los patógenos son capaces de inducir este proceso, si no que mediadores inflamatorios tales como TNF- α , IL-1 β u otras citocinas producidas por la señalización a través de receptores de reconocimiento de patógenos (PRR del inglés “Pattern recognition receptor”) presentes en otras células como células epiteliales, son capaces de inducir la maduración de las CD. Así también los IFN tipo I pueden actuar de manera autócrina o parácrina en la maduración (Roake *et al.*, 1995; Reis e Sousa. 2004). No obstante, aunque las señales inflamatorias indirectas pueden causar la maduración de las células dendríticas, estas no las capacitan para dirigir una función efectora sobre las células Th. Las únicas CD capaces de inducir esta respuesta son aquellas que han tenido contacto previo con algún patógeno (Heath and Villadangos 2005). Las CD maduras migran hacia áreas ricas en células T en los órganos linfoides atraídas por citocinas como 6Ckine y/o MIP-3 β producidas en estas zonas y captadas por el receptor CCR7 incrementado en CD maduras, donde pueden llevar a cabo la activación de las células Th (Banchereau *et al.*, 2000).

Cuando CD40 en las CD enlaza su ligando CD154 presente en células Th o en otras células como NK o plaquetas ocurre el reclutamiento de la molécula TRAF (Factor asociado al receptor TNF) que induce la activación de dos vías de señalización, la de MAPK cinasas y la de NF- κ B. Así, NF- κ B activa moléculas importantes para la producción de IL-12 y para la sobrevivencia de las

CD, favoreciendo la polarización de las células $CD4^+$ hacia células Th1 producidas en respuesta a patógenos intracelulares (Sullivan and Ranjery 2003).

Las CD también pueden estimular la proliferación de las células B al influenciar el cambio en el isotipo de anticuerpos producidos que ocurre en la maduración de las células B a través de las moléculas BLyS y APRIL presentes en las CD (Litinskiy *et al.*, 2002).

c) Origen clasificación y distribución de las CD de ratón

Las CD comprenden un gran número de subpoblaciones, cada una con diferentes funciones. La diversidad funcional de las subpoblaciones de CD se relacionan con su estado de diferenciación, su localización específica y es una consecuencia de las interacciones con antígenos y células efectoras del sistema inmune (Banchereau *et al.*, 2000).

En ratón se han descrito al menos 3 subpoblaciones de CD: $CD8\alpha^+$ linfoides, $CD8\alpha^-$ mieloides y $B220^+$ plasmocitoides. Las CD $CD8^+$ se encuentran en zonas ricas en células T de los órganos linfoides y en la corteza del timo. Las CD $CD8^-$ se han localizado en la zona marginal del bazo, en el domo subepitelial de la placa de Peyer y en la zona subcapsular de los nódulos linfáticos (Pulendran *et al.*, 2001). Las CD $B220^+$ (CD tipo plasmocitoide CDp) se localizan en todos los órganos linfoides y se caracterizan por ser las principales productoras de interferones tipo I en respuesta a infecciones virales (Martín, *et al.*, 2002). Una cuarta subpoblación ha sido recientemente descrita, denominada CD asesinas, productoras de IFN (IKDCs, del inglés “interferon-producing killer DC”) sorprendentemente se caracteriza por producir después de su activación $INF\alpha$ y γ dependiendo del estímulo, matar células blanco (células tumorales ó infectadas con virus) empleando receptores de activación de las células NK y subsecuentemente adquirir la capacidad para procesar y presentar los antígenos de las células destruidas en el contexto de MHC II para activar células Th (Chan *et al.*, 2006). Los diferentes grupos de CD expresan marcadores como $CD11c^+$ (característico de células dendríticas de ratón) y niveles basales de MHC II, CD80, CD86 y CD40.

Aunque inicialmente la clasificación como linfoide y mioide de las CD fue hecha con base en la expresión de la molécula $CD8\alpha$, Weissman colaboradores (2000) demostraron, a través de

ensayos de reconstrucción de CD, que tanto un progenitor linfoide como un progenitor mieloide podían diferenciarse en CD CD8⁺, CD8⁻ y CDP (Traver *et al.*, 2000). Así mismo Martínez del Hoyo (2002) demostró que un precursor común CD11c⁺, MHC II⁻ presente en la sangre del ratón es capaz de generar CD CD8⁺, CD8⁻ y CDP después de transferir CD a ratones irradiados. Otros reportes afirman que la molécula CD8α es un marcador de maduración más que un marcador de linaje linfoide (Moron *et al.*, 2002; Rescigno 2002;). Esto sugiere la existencia de un modelo más plástico en la diferenciación de las CD.

Las CD CD8α⁻ han sido extensamente descritas como leucocitos especializados en activar células T vírgenes, sin embargo su estudio es difícil porque son raras en todos los tejidos del cuerpo y es complicado aislarlas (Lutz *et al.*, 1999) sin embargo es posible generar CD de origen mieloide a partir de precursores de médula ósea de ratón estimulados con el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), con lo cual se obtienen rendimientos elevados. El fenotipo de estas células es CD8⁻, CD11b⁺. (Pulendran *et al.*, 2001; Kapsemberg, 2003).

d) Células dendríticas del tejido linfoide asociado a mucosa intestinal

En los tejidos mucosos las CD están dispersas a lo largo de sitios intra y subepiteliales. El fenotipo de las CD es influenciado por citocinas y mediadores anti-inflamatorios que son producidos por las células epiteliales (Niedergang *et al.*, 2004). En PP, existen al menos cuatro diferentes subtipos de células dendríticas CD11c⁺ basados en la expresión de los marcadores de superficie **CD11b** y **CD8α**: CD11b⁺ CD8α⁻, CD11b⁻ CD8α⁺, las dobles negativas CD11b⁻ CD8α⁻ y CD11c^{int} CD8α⁺ B220⁺ (Bilsborough and Viney 2004). Las CD CD11b⁺ CD8α⁻ inducen diferenciación Th2, mientras que las CD CD11b⁻ CD8α⁺ y CD11b⁻ CD8α⁻ promueven el desarrollo de células Th1 (Niedergang *et al.* 2004).

En cuanto a las CD de LP, Allan Mowat y colaboradores (2005) demostraron que las CD de LP comprenden principalmente CD CD11b⁺ CD8α⁻ y en menor proporción CD11b⁻ CD8α⁻ y CD11c^{int} tipo CD plasmocitoides. Estas células constitutivamente producen IL-10 e IFN tipo I pero no IL-12, además son capaces de incrementar moléculas co-estimuladoras en respuesta al LPS indicando que pueden responder parcialmente a señales pro-inflamatorias demostrando así que no son inherentemente tolerogénicas (Kaiserlian *et al.*, 2005).

Se ha descrito que las CD son capaces abrir las uniones estrechas entre las células epiteliales intestinales, extendiendo dendritas fuera del epitelio, muestreando patógenos directamente. Como las CD expresan proteínas presentes en uniones estrechas de células epiteliales tales como ocludina y claudina, pueden preservar la integridad de la barrera epitelial (Rescigno *et al.*, 2001).

La mucosa intestinal esta continuamente expuesta a antígenos de los alimentos y a un gran número de bacterias comensales no patogénicas que constituyen la flora del intestino. Las bacterias comensales probablemente inducen la maduración del sistema inmune de mucosas a través de las CD de mucosa. La tolerancia a antígenos benéficos parece ser controlada por estas células, por lo tanto las CD estimulan la actividad de las células T reguladoras que producen IL-10 o TFG- β . Se ha propuesto que las CD intestinales inducen y mantienen la tolerancia periférica a antígenos propios al transportar células epiteliales apoptóticas al área de células T del nódulo linfático mesentérico (Bilsborough and Viney., 2004; Niedergang *et al.* 2004).

e) Procesamiento y presentación de antígeno

El procesamiento de antígeno permite la inducción de una respuesta inmune específica. El procesamiento proteolítico de las proteínas antigénicas genera péptidos cortos que se unen a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. La expresión en la superficie de la célula de los complejos MHC-péptido permite su presentación a las células T para generar respuestas que median y/o regulan la inmunidad celular. La presentación de antígeno es mediada por dos clases de moléculas, MHC clase I y MHC clase II las cuales usan vías distintas de procesamiento de antígeno. (Ramachandra *et al.*, 1999).

1. Complejo mayor de histocompatibilidad clase I (Vía endógena clásica)

Para generar linfocitos T citotóxicos las células dendríticas presentan péptidos antigénicos sobre moléculas MHC I. Las moléculas de clase I constan de dos cadenas polipeptídicas unidas de forma covalente. Una de ellas es denominada cadena pesada ó α y la otra se denomina β 2-microglobulina. Los segmentos aminoterminal extracitoplasmáticos de α , denominados α 1 y α 2 forman la hendidura de unión a péptidos. Los péptidos de MHC I pueden ser cargados a través de dos vías, una endógena y otra exógena.

- ***Vía endógena de MHC I***

La vía endógena clásica de MHC I involucra la degradación de proteínas citosólicas y el montaje de péptidos en las moléculas MHC I sintetizadas de novo en el RE. El procesamiento de antígeno ocurre primero en el citosol a través de un sistema proteolítico dependiente de ATP, el cual comienza por la conjugación de ubiquitina. Las proteínas ubiquitiniladas son dirigidas al proteosoma en donde la proteína es degradada en péptidos, los péptidos generados son translocados al RE a través de una vía dependiente de ATP a través de los transportadores de membrana TAP1/2 (del inglés “Transporter associated with antigen processing”) donde los péptidos son cargados en las moléculas MHC I recién sintetizadas. A continuación, el complejo péptido-MHC I sale del RE y es transportado a la superficie celular a través de la vía secretora (Banchereau *et al.*, 2000; Grommé and Neefjes 2002).

- ***Presentación cruzada y de antígenos exógenos por MHC I.***

Las proteínas exógenas (no sintetizadas por las CPA) constituyen una fuente de ligandos peptídicos para MHC I y son absolutamente eficaces en activar células Tc. La presentación cruzada puede ser la principal vía de respuestas restringidas a MHC I para antígenos tumorales, o microorganismos que no infectan células dendríticas, estas pueden ingerir células infectadas o células cancerosas y presentar antígenos a partir de estas fuentes. La vía exógena también provee una oportunidad única para que las CPA presenten antígenos internalizados, simultáneamente sobre MHC-I y MHC II. Se han descrito dos rutas para la vía exógena MHC I, una vía independiente de TAP en la cual el antígeno es probablemente hidrolizado en endosomas indicando que no requieren transporte al citosol (Pfeifer *et al.*, 1993; Bachmann *et al.*, 1995) y una vía de fagosomas a citosol, en la cual los antígenos exógenos pueden ser transferidos al citosol, donde son digeridos por el proteosoma y cargados en las moléculas MHC I a través de una manera dependiente de TAP. (Rodríguez *et al.*, 1999; Banchereau *et al.*, 2000; Trombeta and Mellman 2005)

2. Presentación de antígeno vía MHC II (Vía exógena clásica).

Los antígenos particulados y solubles son capturados eficientemente por CD inmaduras y son cargados en los compartimentos de MHC clase II presentes únicamente en las CPA profesionales. El MHC II es un heterodímero conformado por dos glicoproteínas polimórficas

transmembranales denominadas cadenas α y β , ambas producto de los genes del MHC que al ser traducidas, son translocadas a la membrana del RE donde se asocian con una tercera glicoproteína integral denominada cadena invariante I. Las CD inmaduras constantemente acumulan moléculas MHC clase II en compartimentos intracelulares con características similares a los lisosomas identificados como compartimentos ricos en MHC II (MIICs). En estas células los antígenos o macromoléculas son internalizados por la vía endosomal a los compartimentos MIIC prelisosomales medianamente ácidos donde se acumulan complejos MHCII-I; las funciones de I son facilitar el ensamblaje de las cadenas α y β de la molécula MHC II, evitar la unión de péptidos que se localizan en el RE y promover la exportación de MHC II hacia el aparato de Golgi para ser desviados a la vía de endosomas (Marks *et al.*, 1998; Cresswell 1994 Banchereau *et al.*, 2000).

En la vía clásica el antígeno capturado es dirigido a los compartimentos MIICs. Estos compartimentos contienen una molécula denominada HLA-DM (H2 en ratón) que promueve la liberación catalítica de la porción restante de I unida a MHC II e incrementa su unión al péptido de origen exógeno (producto de la degradación en un ambiente lisosomal-endosomal del antígeno internalizado) (Banchereau *et al.*, 2001).

La degradación proteolítica de los antígenos es regulada por la razón entre la catepsina S y su inhibidor endógeno cistatina C. Después de la maduración, la concentración de cistatina C disminuye, por lo tanto la actividad de catepsina S se incrementa promoviendo la liberación de I y permitiendo la exportación de molécula MHC II cargadas con péptido a la superficie de la célula. Mientras que en las células dendríticas inmaduras las moléculas clase II son rápidamente internalizadas y tienen una vida media corta, el estímulo de maduración/inflamación permite un marcado incremento en la síntesis de moléculas clase II y en la translocación de los complejos MHCII-péptido a la superficie de la célula, donde permanecen estables por días con capacidad para el reconocimiento por células T CD4⁺ (Banchereau *et al.*, 2000, Villadangos *et al.*, 2000; Ramachandra *et al.*, 1999).

1.5. Receptores tipo Toll

a) Generalidades

Los receptores tipo Toll (TLRs) son conocidos como receptores esenciales de la inmunidad innata en mamíferos, plantas e insectos. El gen Toll fue identificado primero en *Drosophila*, observando que las mutaciones en Toll producían un desarrollo embrionario dorso-ventral anormal (Hashimoto *et al.*, 1988). Estudios posteriores demostraron que Toll era importante en la defensa de *Drosophila* contra hongos, debido a que los mutantes de Toll eran susceptibles a infecciones por estos microorganismos (Lemaitre *et al.*, 1996). Trabajos subsecuentes revelaron la presencia de una familia de homólogos de Toll en mamíferos, denominados TLRs (Medzhitov *et al.*, 1997). Hay al menos 12 TLRs conocidos en el ratón; de los cuales al menos 11 son expresados en humanos siendo TLR 1-9 conservados entre las dos especies, aunque TLR10 es funcional sólo en el humano y TLR11-13 solo están presentes en ratón (Finberg and Kurt-Jones 2004; Bowie and Haga 2005; Takeda and Akira 2005).

Los TLRs pertenecen a los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR, del inglés “patogen recognition receptors”) del sistema inmune innato y son codificados en la línea germinal (Chandrashekar *et al.*, 2004). Los PRR son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs del inglés “Pathogen Associated Molecular Patterns”), estos PAMPs tienen tres características comunes que los hacen blanco para el reconocimiento inmune innato: 1) son producidos solo por microorganismos y no por las células del huésped, 2) son invariantes entre microorganismos de una clase dada y 3) son esenciales para la sobrevivencia microbiana (Medzhitov 2001). Cuando los TLR reconocen PAMPs se inicia una respuesta que programa los perfiles de expresión de genes antipatógenos y promueve la inmunidad adquirida (Boehme and Compton 2004).

Los TLRs son glicoproteínas integrales de membrana tipo 1. Con base en su región citoplasmática estos receptores se han clasificado dentro de una gran superfamilia que incluye al receptor para IL-1, sin embargo su región extracelular difiere, los TLRs contienen repeticiones ricas en Leucina (LRR, del inglés “Leucine-rich repeat”), mientras que la región extracelular del receptor para IL-1 contiene tres dominios tipo Inmunoglobulina (Akira and Takeda. 2004). En

respuesta a microbios o a señales de peligro, representadas por PAMPs los TLRs inician una cascada de señalización intracelular que dirige a la expresión de genes pro-inflamatorios (Vogel *et al.*, 2003).

Los receptores tipo Toll no son fagocíticos *per se* sin embargo se ha demostrado que son capaces de regular la formación del fagosoma debido a que la señalización a través de estos receptores activa moléculas que son requeridas para la fagocitosis, como Rac1 y la cinasa PI3K ambas requeridas para este proceso (Underhill and Ozinsky 2002).

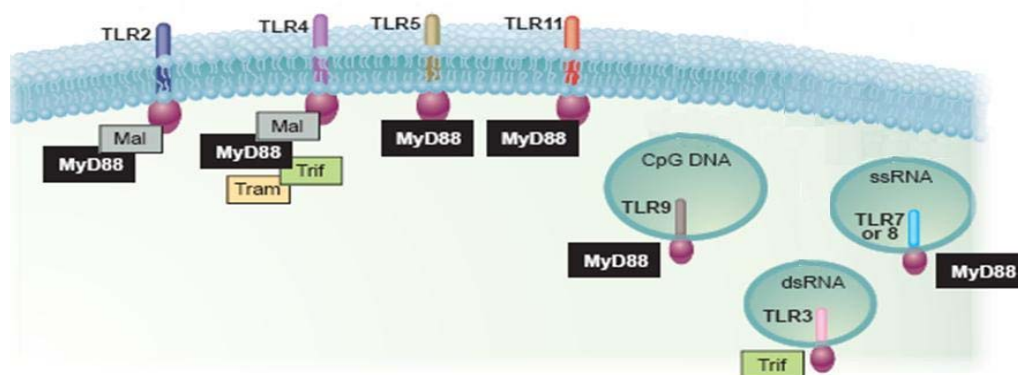


Figura 1.2. Localización de los TLR's en la célula.

Se ha sugerido que la señalización por receptores fagocíticos puede modular la señalización por los TLRs. Se ha observado que el receptor de manosa con dominios extracitoplasmáticos de reconocimiento de carbohidratos lectina tipo C puede iniciar una señalización antiinflamatoria. Mientras que el LPS induce la producción de IL-12 en células dendríticas, la estimulación simultánea con un anticuerpo monoclonal anti-receptor de manosa bloquea la inducción de esta citocina (indicando que la unión del anticuerpo al receptor de manosa altera la respuesta celular a la activación por los TLRs). Así también hay evidencia que la activación de los receptores Fc γ en macrófagos y células dendríticas modula la señalización por TLRs pues la unión de los receptores Fc γ a su ligando *in vitro* induce una baja producción de IL-12 y una producción incrementada de

IL-10 en respuesta a LPS (Underhill and Gantner 2004; Sutterwala *et al.*, 1997; Sutterwala *et al.*, 1998). Los niveles de la expresión de los TLRs en la superficie celular, medido por la unión de anticuerpos monoclonales, parecen ser muy bajos. Esto corresponde a pocos miles de moléculas por célula en monocitos y pocos cientos o menos en células dendríticas inmaduras. Sin embargo la expresión de los TLRs es observada en muchas otras células, incluyendo células endoteliales vasculares, adipocitos, miocitos cardiacos y células epiteliales intestinales (Akira *et al.*, 2001).

Receptor	Localización	Células	Ligando	Origen de los ligandos
TLR1	Superficie celular	Ubicua	Triacilpolipeptidos	Bacterias y mycobacteria
TLR2	Superficie celular	PMN (Polimorfonucleares), CD y monocitos.	Lipoproteínas/Lipopeptidos Peptidoglicano Ácido lipoteicoico Lipopolisacarido atípico Zymosan Proteína del choque térmico 70*	Varios patógenos Bacterias Gram positivas Bacterias Gram positiva <i>Porphyromonas gingivalis</i> Hongos Huésped
TLR3	Endosomas	CD y células NK	RNA _{dc}	Virus
TLR4	Superficie celular	Macrófagos, CD, células endoteliales.	Lipopolisacarido Proteína de fusión Proteína de la envoltura Proteína del choque térmico 60*. Proteína del choque térmico 70*. Oligosacaridos de ácido hialuronico* Fragmentos de polisacárido de sulfato de heparan*. Fibronectina	Bacterias Gram negativas Virus sincitial respiratorio Virus tumoral mamario de ratón <i>Chlamydia pneumoniae</i> Huésped Huésped Huésped Huésped
TLR5	Superficie celular	Monocitos inmaduros, CD inmaduras, células epiteliales, NK y T.	Flagelina	Bacteria
TLR6	Superficie celular	Células B y NK y monocitos.	Ácido lipoteicoico Zimosan	Bacterias Gram negativas Hongos
TLR7	Endosomas	Células B y precursores de CD plasmocitoides.	Imidazoquinolinas RNA de cadena simple	Compuestos sintéticos Virus
TLR8	Endosomas	Monocitos, células NK y T.	Imidazoquinolinas RNA de cadena simple	Compuesto sintético RNA de cadena simple
TLR9	Endosomas	Precursores de CD plasmocitoides, células B, macrófagos, PMN y células NK.	DNA conteniendo CpG	Bacterias y virus
TLR10	?	Células B y precursores de CD plasmocitoides.	No determinado	No determinado
TLR11	?	?	Proteína tipo Profilina de <i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i> y Bacterias uropatógenicas

Tabla 1. Receptores tipo Toll y sus principales ligandos. (Akira, 2004; Janssens and Beyaert 2003; Lauw *et al.*, 2005).

b) TLR4

Como se describe en la tabla 1, TLR4 es un receptor esencial para el reconocimiento de lipopolisacárido (LPS) y otras moléculas como Taxol y proteínas virales. Además, se ha observado que TLR4 participa en el reconocimiento de ligandos endógenos tales como proteínas del choque térmico (HSP70), oligosacáridos de ácido hialurónico, sulfato de heparan y fibronectina. Sin embargo, todos estos ligandos endógenos requieren ser usados a muy altas concentraciones para activar TLR4. Se ha demostrado que la contaminación de LPS en las preparaciones de HSP70 le confiere habilidad para activar TLR4, el LPS es un inmuno-activador muy potente y por lo tanto TLR4 puede ser activado por una muy pequeña cantidad de esta molécula (Akira *et al.*, 2005).

c) Reconocimiento de LPS por TLR4 y señalización

El LPS de la membrana externa de bacterias Gram negativas es procesado por la Proteína de unión al LPS (LBP, LPS binding protein) y CD14 soluble. LBP es una transferasa de lípidos que reconoce al lípido A (porción toxica del LPS, constituido de seis cadenas de ácidos grasos unidos de varias maneras a dos residuos de glucosamina). Remueve el LPS de la membrana externa y forma complejos solubles consistiendo de LPS, LBP y CD14, que presentan el LPS a CD14 de membrana. Así, el LPS unido a CD14 es transferido a TLR4-MD-2 lo cual desencadena la oligomerización de los receptores y produce una señal. La señal producida por LPS produce la dimerización del dominio citoplasmático de TLR4 y MD-2 participa regulando esta dimerización. (Miyake, 2004).

El dominio citoplasmático de los TLRs se denomina dominio TIR (Toll/IL-1 receptor). La vía de señalización activada por TLR4 en respuesta al LPS hace uso de proteínas adaptadoras que también poseen dominios TIR. Una de ellas es la Molécula de Diferenciación Mieloide (MyD88), que a través de interacciones homotípicas es capaz de transducir la señal a través de los TLRs. Con base en su participación en la señalización a través de los TLR, la respuesta generada puede dividirse en una respuesta temprana dependiente de MyD88 y una respuesta tardía independiente de MyD88 (Akira and Takeda 2004).

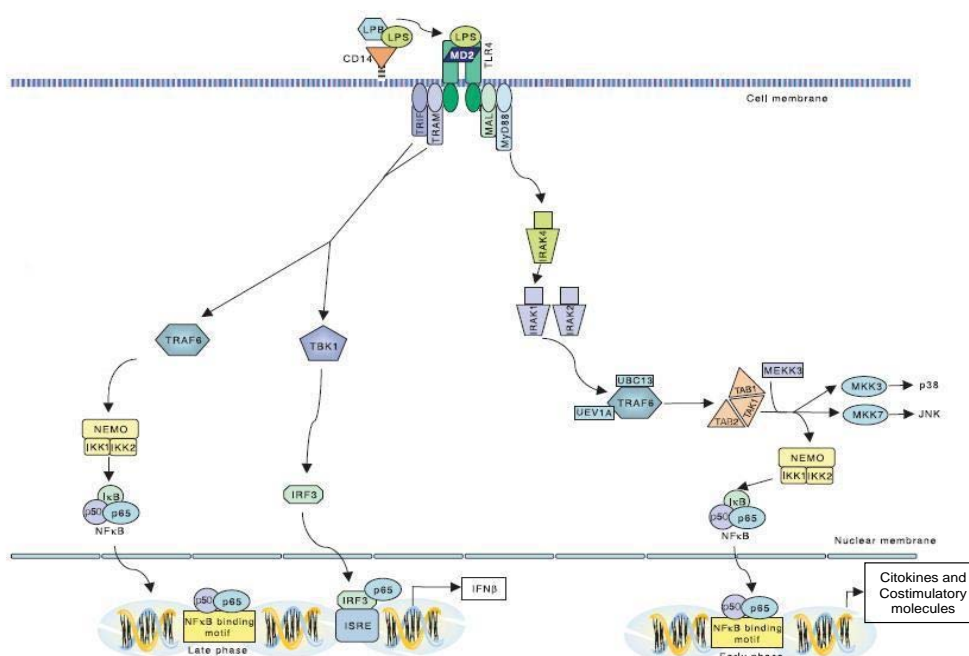


Figura 1.3. Reconocimiento de LPS por TLR4 y señalización dependiente e independiente de MyD88 (Modificada de Palsson-McDermott and O'Neil 2004).

1. Señalización dependiente de MyD88

MyD88 posee un dominio de muerte (DD) N-terminal que es separado de un dominio TIR C-terminal por una secuencia de aminoácidos. Otra molécula adaptadora que homodimeriza y también heterodimeriza con MyD88 es MAL (proteína adaptadora tipo MyD88 también conocida como TIRAP). Cuando LPS se une a MD-2 y TLR4 con ayuda de CD14 induce la dimerización de TLR4 lo cual a su vez recluta a MyD88 y MAL al complejo receptor, Estos a su vez reclutan a la proteína IRAK4, que posee actividad cinasa intrínseca, que a su vez esta capacitada para activar a IRAK1 que también posee actividad cinasa. Las moléculas IRAKs poseen un dominio DD N-terminal con el que llevan a cabo interacciones homofílicas y un dominio central de cinasa de serina/treonina. IRAK1 activado autofosforila sus residuos N-terminal y así IRAK1 hiperfosforilado capacita a TRAF6 para unirse al complejo, lo cual induce su activación. Así TRAF6 activado se asocia con TAB2 el cual activa a la MAPK cinasa TAK1 que esta constitutivamente asociada con su proteína adaptadora TAB1. En este punto TAK1 actúa como un activador común de NF- κ B, así como también p38 y la MAPK cinasa JNK. Los dímeros de NF- κ B son usualmente secuestrados en el citoplasma en una forma inactiva por moléculas inhibitoras de la familia NF- κ B (I κ B). Su activación involucra la fosforilación, ubiquitinación y

proteólisis de las proteínas I κ B y la liberación y translocación nuclear de los factores NF- κ B. Este proceso de activación está mediado por el complejo cinasa I κ B (IKK), el cual comprende las dos subunidades catalíticas IKK- α e IKK- β (también conocidos como IKK1 e IKK2) y una subunidad reguladora IKK- γ (también conocida como modulador esencial de NF- κ B, NEMO). Después de la activación por señales río arriba IKK fosforila I κ B dirigiendo su poliubiquitilación y degradación mediada por el proteasoma. (Akira and Takeda 2004; Palsson-McDermott and O'Neil 2004).

2. Señalización independiente de MyD88

Esta vía induce la activación de IRF3 (del inglés “IFN regulatory factor 3”) que media la inducción inicial de interferones tipo 1 y la activación tardía de NF- κ B. La cual dirige la activación de citocinas pro-inflamatorias.

Los únicos TLRs que emplean esta vía son TLR3 y TLR4. Las interacciones iniciales llevadas a cabo por ambos receptores son similares variando en que una molécula denominada TRAM ó TICAM-2 participa en la señalización por TLR4 y no así por TLR3. Estructuralmente TRAM se parece a MAL y funciona como un puente entre TLR4 y TRIF (del inglés “TIR-containing adapter molecule”), el cual también es requerido para la señalización por TLR3. El modelo para la activación tardía de NF- κ B de manera independiente de MyD88 involucra la unión de TRIF a TRAF6 vía algunos dominios de unión a TRAF6 en la región N-terminal de TRIF, los eventos subsecuentes dirigen a la activación de NF- κ B probablemente a través del modelo anteriormente descrito. En el caso de la activación de IRF3 parece ser más compleja, IKK ϵ y TBK1 actúan como cinasa de IRF3. Estas dos moléculas se unen a IRF3, lo cual ha permitido proponer el modelo de un complejo de TRIF, TBK1, IKK ϵ e IRF3 dirigiendo a la fosforilación y activación de IRF3. IRF3 puede entonces unirse al elemento de respuesta sensible a INF (ISRE) induciendo la expresión de un conjunto de genes incluyendo INF- β . Recientemente se ha implicado la participación de la subunidad p65 de NF- κ B en la activación de IRF3 por LPS (Akira and Takeda 2004; Palsson-McDermott and O'Neil 2004).

II. ANTECEDENTES

2.1 Reconocimiento viral por los TLR's

Como se mencionó anteriormente, los TLR's participan de una manera muy importante identificando la presencia de patógenos al reconocer estructuras conservadas de una amplia variedad de microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras y, recientemente identificados como ligandos de TLR's, ácidos nucleicos y algunas proteínas virales (Vaidya and Cheng 2003).

Como ya se mencionó la señalización a través de los TLR's dirige a la maduración de CPA incluyendo las células dendríticas, lo que va ligado a la expresión de moléculas co-estimuladoras y la secreción de citocinas pro-inflamatorias incluyendo interferones α y β citocinas que inducen un complejo mecanismo de resistencia antiviral en células infectadas o no infectadas (Taniguchi and Tanaka 2002; Boeheme and Compton 2004).

Hasta la fecha se han identificado cuatro clases de PAMPs en el reconocimiento viral por los TLR's: RNA de doble cadena (RNAdc), ADN con secuencias CpG, ARN de cadena sencilla (RNAs) y glicoproteínas de envoltura (Boeheme and Compton 2004).

El material genético de algunos virus esta constituido por RNAdc, esta molécula también es el intermediario de replicación de virus de RNA y se cree que la lisis de células infectadas pueden liberar RNAdc que puede interaccionar con TLR3. En fibroblastos TLR3 es expresado en la superficie de las células sin embargo en células dendríticas la expresión de TLR3 esta restringida a compartimentos intracelulares. La activación de TLR3 induce una producción limitada de citocinas pro-inflamatorias sin embargo induce una robusta secreción de INF- β y la expresión de moléculas co-estimuladoras (Matsumoto *et al.*, 2003. Boeheme and Compton 2004). Algunos virus como virus Herpes simplex tipo 1 y 2 (HSV-1 y 2) y citomegalovirus (CMV) murino, que poseen genomas ricos en motivos CpG son capaces de inducir la producción de INF- α y citocinas pro-inflamatorias por CDp y CD murinas a través de TLR9 (Krug *et al.*, 2004^a; Krug *et al.*, 2004^b). El modelo que permite explicar esta interacción es en el que las partículas virales pueden ser tomadas por las células y subsecuentemente degradadas en vesículas endocíticas, donde el genoma viral es expuesto y puede interaccionar con TLR9 (Boeheme and Compton. 2004). Otros

virus cuyo genoma está compuesto de RNAs como virus de estomatitis vesicular (VSV) y virus de inmunodeficiencia humana tipo I (HIV) son capaces de inducir la secreción de INF- α y la expresión de marcadores de activación de una manera dependiente de TLR7 en CDp y células B de ratón (dependiente a su vez de acidificación endosomal en CDp) (Lund *et al.*, 2004; Boehme and Compton 2004). De igual manera, el genoma compuesto por RNAs del virus influenza es capaz de inducir la producción de grandes cantidades de INF α por CDp a través de TLR7 de manera dependiente de MyD88 (Heil *et al* 2004). Por otro lado, glicoproteínas virales como la proteína hemaglutinina del virus del sarampión y la glicoproteína B de envoltura de CMV humano son capaces de inducir citocinas inflamatorias a través de TLR2 en células mononucleares de sangre periférica de humano (Bieback *et al.*, 2002; Compton *et al.*, 2003). Así también, como se explicará mas adelante, TLR4 es capaz de participar en el reconocimiento de proteínas virales.

Las glicoproteínas de envoltura viral son una amplia clase de moléculas que han emergido como ligandos de TLRs. TLR4 fue el primer TLR que se demostró participaba de manera importante en la defensa del huésped en contra de virus (Finberg and Kurt-Jones 2004). Kurt-Jones y cols (2000) demostraron que la proteína de fusión (F) del virus sincicial respiratorio (RSV) es capaz de inducir la secreción de citocinas en monocitos humanos de una manera dependiente de TLR4 y CD14, así también demostraron que el virus persiste durante más tiempo en los pulmones de ratones deficientes en TLR4 que en ratones normales. Además Haynes y cols. (2001) demostraron que ratones que carecen de TLR4 muestran niveles menores de infiltrado de células NK y células CD14⁺ en los pulmones y niveles reducidos de IL-12 en suero que los ratones normales, rindiendo en una reducción en la capacidad para resolver la infección viral.

Por otro lado, se demostró que el virus tumoral mamario de ratón (MMTV) es capaz de interactuar con TLR4 demostrándose que la proteína de envoltura (Env) es el componente viral responsable para la activación del mismo Rassa *et al.*, (2002). Así también, se ha demostrado que MMTV es capaz de activar células B en ratones normales pero no en ratones deficientes en señalización a través de TLR4. Además, que TLR4 coinmunoprecipita con la proteína Env de MMTV evidenciando la interacción directa entre ambas proteínas. Recientemente se demostró que la unión directa del virus con TLR4 induce la maduración de CDMO e incrementa la

expresión del receptor de entrada de MMTV (CD71) sobre las mismas. Además, se demostró *in vivo* que MMTV es capaz de incrementar el número de células dendríticas en placa de Peyer de neonatos así como también el receptor CD71 de una manera dependiente de TLR4 (Burzyn *et al.*, 2004).

Resulta interesante la habilidad de las glicoproteínas virales para activar a los TLRs porque son sintetizadas en las células del huésped y por lo tanto no pueden sufrir modificaciones o expresar motivos que sean significativamente diferentes a las proteínas del huésped. Es posible que estas proteínas posean conformaciones estructurales únicas y/o agrupaciones de glicanos que les permita ser reconocidas como antígenos (Boehme and Compton 2004).

De acuerdo a todo lo anterior, en la superficie celular TLR2 y TLR4 pueden reconocer glicoproteínas virales, mientras que TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 pueden detectar material genético viral libre, con lo cual inducen la expresión de genes antivirales (Bowie and Haga 2005).

TLR	Especie	PAMP viral	Virus
TLR2	Humano, Humano y ratón	Proteínas del virión HA	CMV Virus del sarampión
TLR3	Humano, ratón	RNAdc	Varios
TLR4	Ratón Ratón Ratón	Proteína F VP7	RSV MMTV RV*
TLR7	Ratón	Proteína Env	Influenza, HIV, VSV
TLR8	Humano	RNAcs	HIV
TLR9	Ratón	DNA	HSV-1, HSV-2

Tabla 2.1. TLR's implicados en la respuesta a PAMPs virales (Bowie and Haga 2005, Blutt et al 2004^{b}).*

En cuanto a rotavirus, Blutt y cols. (2004^b) observaron que al usar ratones que expresan el BCR incompleto (ratones XID) o ratones que expresan un BCR transgénico específico para la lisozima de huevo de gallina ocurría activación de células B indicando que el BCR no era requerido para la inducción de esta activación. Por lo tanto, propusieron que la activación de células B podría

estarse dando a través de algún TLR. Anteriormente se había demostrado que la activación de estas células se debía a la glicoproteína viral VP7, por lo que propusieron que esta activación podría ser a partir de TLR4 como ocurre para otras proteínas virales (Blutt *et al* 2004^a; Blatt *et al.*, 2004^b). Evidencia preliminar sugiere que la proteína de cápside externa de rotavirus VP7 interactúa con TLR4 en las células B resultando en su activación (Blutt *et al.*, 2004^b). Interesantemente esta activación fue independiente de la glicosilación de VP7, pues al emplear la cepa mutante de rotavirus que expresa VP7 no glicosilada se observó una activación de células B comparable con la activación que induce la cepa silvestre. Por lo cual propusieron que la activación de las células B puede ser atribuida a los motivos altamente repetitivos y densamente empaquetados de VP7, lo cual demostraron al emplear preparaciones virales hervidas en las cuales no observaron activación de éstas células (Blutt *et al* 2004^a).

Debido a que la infección por rotavirus es de rápida resolución, se plantea que la inmunidad innata puede estar participando de manera importante en la contención de la infección y en el establecimiento de una respuesta inmune adaptativa adecuada. Por esto, se propone que un mejor entendimiento de la participación de la inmunidad innata en particular de las células dendríticas en la respuesta a la infección por rotavirus permitirá contar con más herramientas que permitan favorecer el control de la enfermedad.

De esta manera, en este trabajo nos propusimos analizar el papel de uno de los principales componentes de la respuesta inmune innata como son las CD, en la infección por rotavirus. Específicamente investigamos si el genoma ó las proteínas de rotavirus son capaces de inducir la activación de estas células.

III. HIPÓTESIS

En un modelo *in vitro*, rotavirus será capaz de activar a las células dendríticas provenientes de médula ósea de ratón.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Analizar el papel de rotavirus en la activación de células dendríticas de ratón en un modelo *in vitro*.

4.2. Objetivos Particulares

1. Evaluar si rotavirus purificado e inactivado por calor activa *in vitro* células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones BALB/c, induciendo la producción de IL-12 y el aumento de la expresión de CD40, CD80 y MHC II en la superficie celular.
2. Determinar la contribución del genoma viral y de las proteínas de rotavirus a la activación de las células dendríticas, usando VLP's purificados compuestos de las proteínas VP2/VP6/VP7.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo fueron adquiridos a GIBCO BRL y preparados de la siguiente manera:

RPMI⁻ : RPMI 1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina y 2 gr de NaHCO₃ por litro.

RPMI⁺ : RPMI 1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina, 2 gr/lt de NaHCO₃ , 5x10⁻⁵ M de 2-mercaptoetanol, 10 mM de Hepes, 40 µg/ml de gentamicina y 10 % de suero fetal bovino (SFB).

DMEM: DMEM alto en glucosa suplementado con 2mM de L-glutamina, 110 mg/lt de piruvato de sodio, 3.7 gr/lt de NaHCO₃ por litro. 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de streptomycin .

DMEM⁺: DMEM alto en glucosa suplementado con 2mM de L-glutamina, 110 mg/lt de piruvato de sodio, 3.7 gr/lt de NaHCO₃ por litro, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de streptomycin y 10 % de SFB.

Los medios fueron ajustados a pH 7 y esterilizados por filtración por una membrana de 0.22 µm.

Sf900-II: medio completo, optimizado, libre de suero. Para cultivo de células de insecto.

5.2 Ratones

Se emplearon ratones hembras de la cepa BALB/c (H-2^d) de 5-10 semanas de edad, libres de patógenos (Bioterio, IBT-UNAM e INSP).

5.3 Virus

El virus RRV (Sa/G3P11, SGII) de momo Rhesus fue propagado in vitro en la línea celular MA-104.

Se utilizaron baculovirus (virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica*) recombinantes que expresan los genes que codifican para las proteínas VP2-GFP (de la cepa de rotavirus RF), VP6 y VP7 (de la cepa de rotavirus SA-11) fueron usados para la infección de células H5 para obtener las pseudopartículas virales (Los baculovirus y las células fueron amablemente proporcionados por la Dra. Laura Palomares).

5.4 Líneas celulares, cultivo y estimulación

a) Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas fueron las siguientes:

MA-104: Células epiteliales de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*. Susceptibles a la infección por rotavirus.

CHO: Células de ovario de hamster chino (*Cricetulus griseus*). Transfectadas con el plásmido que contiene el gen que codifica para GM-CSF de ratón y un gen de resistencia a geneticina (Estas células fueron amablemente donadas por la Dra. Laura Bonifaz).

BTI-Tn-5B1-4 (Invitrogen): conocida comercialmente como High FiveTM. Esta línea proviene del ovario del lepidóptero *Trichoplusia ni*.

A20: Linfocitos B provenientes de Sarcoma reticular de ratón (*Mus musculus*) Balb/cAnN. Expresan grandes cantidades de MHC II en su superficie (Kappler *et al.*, 1982).

Células L: Fibroblastos de tejido conectivo subcutáneo de ratón C3H/An.

Células L-IA^d: Fibroblastos de tejido conectivo subcutáneo de ratón C3H/An transfectados con los genes que codifican para las cadenas α y β de MHC II del haplotipo IA^d (Malissen *et al.*, 1986).

b) Cultivo de células adherentes

Los cultivos se realizaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5 % y humedad al 95 %. Las células fueron cultivadas en frascos de cultivo (Corning) de 25, 75 o 162 cm² y cada vez que llegaban a confluencia eran subcultivadas en diferentes proporciones para su mantenimiento. Las células MA-104 y las células L fueron cultivadas con DMEM⁺, las células CHO fueron cultivadas en RPMI⁺ suplementado con 0.5mg/ml de geneticina (Gibco).

Para mantener los cultivos la monocapa de células MA-104 y de células L fue lavada con PBS 1X (8 gr de NaCl, 0.2 gr de KCl, Na₂HPO₄ y K₂HPO₄ ajustando el pH 7) posteriormente las células fueron despegadas del frasco con Tripsina-EDTA (Sigma) (0.025 % de tripsina y 1 mM de EDTA en PBS 1X).

Las células CHO fueron despegadas del frasco con una solución de EDTA (8 gr NaCl 8, 0.4 gr KCl, 1 gr. Dextrosa, 0.2 gr EDTA-Na, 8 ml de NaHCO₃ 7.5 % para un litro).

Ambas líneas fueron incubadas con 1-5 ml de estas soluciones por 5-10 minutos a 37 °C y posteriormente se tomó una alícuota de este volumen que se pasó a un nuevo frasco con medio fresco.

c) Cultivo de células en suspensión

Las células High Five™ fueron cultivadas a 28°C en cultivo en suspensión, en agitación en matraces de vidrio de 250 ml a una densidad de 0.5×10^6 células/l en 30 ml de medio Sf-900 II. Las células A20 se cultivaron en RPMI⁺.

Para mantener los cultivos se centrifugaron y contaron las células con azul de tripano al 4 % en una cámara de Neubauer. Para las células H5 se contaron los 4 cuadrantes grandes de la periferia y el central, el resultado final fue multiplicado por 1×10^4 y por la dilución correspondiente. Para las células A20 se contaron las células en la cuadrícula central, los cuatro cuadros de las esquinas y el cuadro central, el resultado final fue multiplicado por 1×10^5 y por la dilución correspondiente. Posteriormente se tomó el volumen que contenía el número de células adecuado para obtener la densidad deseada. Las células se sembraron en un frasco nuevo con el volumen correspondiente de medio fresco.

d) Obtención de sobrenadante (SN) rico en GM-CSF a partir de células CHO

La línea de células CHO transfectadas con el gen que codifica para GM-CSF fueron mantenidas con 0.5 mg/ml del mismo. Para esto las células inicialmente fueron descongeladas en un Frasco de cultivo de 25 cm² (F25) (Corning) con 5 ml de RPMI⁺ suplementado con 0.5 mg/ml de geneticina. A las 24 hrs, se retiraron 3 ml del medio y se agregó el mismo volumen de medio fresco suplementado con geneticina. Cuando las células llegaron al 80 % de confluencia se subcultivaron en un nuevo F25 a una dilución 1:30 en 5 ml de medio con geneticina (ver cultivo de células adherentes). Cuando las células llegaron al 80 % de confluencia nuevamente se subcultivaron en un F75 a una dilución 1:10 en 20 ml de medio suplementado con el antibiótico. Cuando las células alcanzaron el 80 % de confluencia se subcultivaron en 8 F175 a una dilución 1:8 en 40 ml de medio suplementado con geneticina. Al llegar al 80 % de confluencia, se retiró el medio de las células, se lavó la monocapa con 5 ml de RPMI y se adicionó 50 ml de RPMI (sin suero) a cada frasco. Se cultivaron por 72 hrs y se colectó el medio de cada frasco. El SN colectado fue centrifugado y filtrado a través de una membrana de 0.22µm (Millipore). Finalmente se hicieron alícuotas del SN y se almacenaron a -20 C.

5.5 Obtención y estimulación de CD derivadas de médula ósea

a) Obtención de médula ósea de ratón

Ratones BALB/c fueron sacrificados por dislocación cervical. Posteriormente, con ayuda de pinzas y tijeras estériles se obtuvieron tibias y fémures de cada extremidad cuidando no cortar los huesos y se eliminaron los restos del tejido con gasa humedecida con PBS 1X. Los huesos obtenidos se colectaron en 5 ml de RPMI, posteriormente, ya en condiciones estériles se colocaron por 2 minutos en 5 ml de etanol

al 70 % y dos veces en 5 ml de RPMI⁻ para eliminar los restos de etanol. Después, se cortaron las epífisis de los huesos y con ayuda de jeringas de 10 ml con aguja de 27 G x 13 mm (Plastipack) se procedió a pasar RPMI⁻ a través de la luz de los huesos para colectar la médula ósea en una caja petri de 100mm. En seguida las células fueron disgregadas por pipeteo vigoroso y resuspendidas en RPMI⁻ y centrifugadas a 1600 rpm, el pellet obtenido fue resuspendido en 1 ó 2 ml del mismo. Posteriormente se tomó una alícuota de la solución y se mezcló con NH₄Cl a una proporción 1:5, dejando reposar la solución por cinco minutos a TA, para eliminar los eritrocitos. Finalmente de esta solución se tomó una alícuota que fue mezclada con Azul de tripano a una dilución 1:1 y se procedió a contar las células en una cámara de Neubauer (los cuadros de la periferia y el central de la cuadrícula del centro) multiplicando el número de células obtenidas por la dilución correspondiente.

b) Diferenciación de células de médula ósea a células dendríticas

Células de médula ósea no depletadas de eritrocitos fueron sembradas en cajas petri de 100 mm, a una densidad de 0.5×10^6 células/ml en 10 ml de RPMI⁺ suplementado con 15 -20 % de medio condicionado rico en GM-CSF. Las células fueron cultivadas a 37° C en atmósfera de CO₂ al 5 % y humedad al 95 %. El día de la siembra se tomó como día cero. Al día 3 se adicionó al cultivo 10 ml de RPMI⁺ suplementado con 15 -20 % de SN rico en GM-CSF. A partir del día 5 se obtuvieron células dendríticas inmaduras. Para obtener un mayor enriquecimiento de células dendríticas, las células fueron cultivadas hasta el día 9 alimentando el cultivo a los días 6 y 8. En ambos casos la mitad del sobrenadante del cultivo fue colectado y centrifugado a 1700 rpm por 7 minutos, el pellet celular fue colectado y resuspendido en 10 ml de RPMI⁺ suplementado con 15 -20 % de SN rico en GM-CSF que se adicionó al cultivo.

c) Purificación positiva de células CD 11c⁺ por columna magnética

Las células de MO diferenciadas fueron colectadas al día 5 y purificadas empleando el sistema de separación magnética (MACS, del inglés “Magnetic cell sorting”)(Miltenyi Biotec, Alemania). Las células se centrifugaron, se lavaron y se resuspendieron en 99 µl Buffer Macs (BM, 1 % de BSA , 2 mM EDTA en PBS 1X) por cada 1×10^7 células. Posteriormente las células fueron incubadas por quince minutos con el anticuerpo anti-CD11c biotinilado (BD) a una dilución 1:100 por cada 1×10^7 células en BM. Después fueron lavadas dos veces y resuspendidas en 90 µl de BM por cada 1×10^7 células. En seguida fueron incubadas por 15 minutos con perlas magnéticas acopladas a Streptavidina (Miltenyi, Biotec) a una dilución 1:10 por cada 1×10^7 células en BM. Posteriormente las células fueron lavadas dos veces y resuspendidas en 500µl del mismo buffer. Finalmente, se pasaron las células a través de una

columna magnética pegada a una placa de metal. La porción correspondiente a células dendríticas se obtuvo al despegar la columna de la placa y al dejar pasar 1 ml de BM a través de ella.

d) Estimulación de las células dendríticas de médula ósea.

Células dendríticas de 5 días de diferenciación, purificadas o no positivamente fueron sembradas en RPMI⁺ al 15 % GM-CSF a una densidad de 0.5×10^6 , 2×10^6 células/ml en cajas para cultivo en suspensión de 35 mm (Corning) ó placas de 96 pozos tratadas ó no para cultivo celular (Falcon) respectivamente. La estimulación se realizó durante 24 hrs empleando RRV semipurificado (Sp), RRV purificado (P) y VLP's (VP2/6/7). Como control positivo se emplearon diferentes concentraciones LPS de la cepa de *E. coli* 055:B5 (Sigma). Para inducir el incremento en IL-12 en CDMO se empleo INF- γ de ratón (Sigma) a una concentración de 50 U/ml.

5.6 Amplificación de rotavirus *in vitro*

a) Propagación viral

Cultivos celulares de MA-104 crecidas a confluencia en frascos 162 cm² se lavaron 2 veces con 5 ml de PBS 1X, cuidando no despegar las células. Posteriormente las células fueron infectadas con la cepa de rotavirus RRV, para esto se agregaron 3 ml de un lisado viral de células MA-104 infectadas empleando una MDI (Multiplicidad de infección = Virus infeccioso (UFF)/No células) de 1-5. Los lisados se habían tratado previamente con 10 μ g/ml de tripsina por 30 minutos a 37 °C para la activación de los virus. Después de agregar el inóculo el cultivo se incubó a 37°C por 1 hr para permitir que el virus se absorbiera. Posteriormente, se agregaron 27 ml de medio DMEM- a cada frasco y se cultivaron por 24 hrs. a la misma temperatura o hasta observar efecto citopático. En seguida se colectó lisado viral. La suspensión se congeló a -20°C y posteriormente se descongeló, repitiendo este procedimiento una vez más para romper las células y liberar las partículas virales.

b) Titulación de rotavirus

Células MA-104 en confluencia en placas de cultivo de fondo plano de 96 pozos (Falcon) fueron infectadas por duplicado con 12 diluciones seriadas de lisados virales (RRV) activados, comenzando con una dilución 1:8 (en un volumen de 50 μ l). Se dejaron absorber los virus durante 1 hr. Posteriormente se retiró el medio rico en virus, las células se lavaron con 110 μ l de PBS 1X y se añadió 200 μ l de DMEM- a cada pozo. Las células se cultivaron por 14 hrs a 37°C y se revelaron por la técnica de inmunoperoxidasa.

Todos los lavados subsecuentes se hicieron con 110 μ l de PBS 1X. Después de ese tiempo se retiró el medio y se lavaron las células 2 veces. A continuación, se agregó a cada pozo 110 μ l de la solución PBS 1X:acetona 1:4 dejando reposar la placa durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA) para fijar las células. En seguida se lavaron las células una vez y posteriormente se agregó a cada pozo 50 μ l de una solución conteniendo el primer anticuerpo policlonal anti-RRV de conejo a una dilución 1:1500 en PBS 1X. Se dejó reposar la placa por 1 hr a 37°C. En seguida las células se lavaron dos veces. Posteriormente se agregó 50 μ l a cada pozo de una solución conteniendo proteína-A acoplada a peroxidasa (Amersham) a una dilución 1:2500 en PBS 1X. Se incubó la placa por 2 hrs a 37°C y en seguida las células fueron nuevamente lavadas dos veces. A continuación se agregó 50 μ l de carbazol (4.5 ml de carbazol [4 mg/ml de dimetil formamida (SIGMA)], 12 ml de buffer de acetatos [0.68 gr de acetato de sodio (SIGMA) en 100 ml de agua llevado a pH 5 con ac. Acético (J.T. Backer)], 30 μ l de peróxido de hidrógeno al 30 %) a cada pozo dejando reposar la placa por 10 minutos protegida de la luz. Posteriormente se retiró la solución de carbazol y la placa se lavó una vez con agua bidestilada. Finalmente se contaron las UFF (unidades formadoras de focos) que son células ó grupos de células infectadas que se tiñeron de color café. Se obtuvieron los títulos virales a través de la fórmula: No de células X Dilución X Objetivo X No de campos, obteniendo la media del título de al menos tres diluciones.

c) Generación de pseudopartículas virales (VLP's "virus like particles")

Células H5 fueron sembradas en 30 ml medio Sf-900 II en matraces de vidrio de 250 ml a una densidad de 0.5×10^6 células/ml e infectadas con baculovirus recombinantes que expresan las proteínas virales VP2 de la cepa de rotavirus RF acoplada a GFP (Proteína verde fluorescente), VP6 y VP7 de la cepa SA11 de rotavirus, a una MDI de 5 para cada lisado viral. Se eligió la MDI de 5 pues con es a esta cantidad de virus existe una probabilidad de que al menos una partícula viral de cada uno de los tres baculovirus recombinantes empleados en la coinfección penetren a la célula, con lo cual teóricamente el 100 % de la población celular sería infectada (Palomares 1999). Las células fueron incubaron por 96 hrs en agitación a 28°C a 100 rpm. Posteriormente los lisados celulares se colectaron y las VLP's se purificaron por gradiente de Cloruro de Cesio como se indica más adelante para rotavirus. Los virus obtenidos fueron desalados empleando filtros tipo centricon (Millipore).

d) Semipurificación por colchón de sacarosa

Lisado viral de células MA-104 infectadas con rotavirus se centrifugaron a 25,000 rpm (SW 28) por 2 hrs/4 °C en tubos ultra-claros de 1 x 3.5 pulgadas (Beckman) . El pellet obtenido se resuspendió en 6 ml

de TSC (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7.4). Posteriormente se adicionó un volumen igual de Freón y se agitó por 10 min manteniendo fría la solución. Posteriormente se centrifugó a 6,000 rpm a 4 °C por 10 min. se separó la parte acuosa y a la parte orgánica se le añadió 6 ml de TSC repitiendo el procedimiento anterior dos veces más, cada vez recuperando la parte acuosa. El sobrenadante acuoso obtenido se centrifugó en tubos ultra-claros (Beckman) a 40,000 rpm durante 2 h a 4°C. El pellet obtenido, rico en virus fue resuspendido en 3.5 ml de TSC. En un tubo de 5 ml se agregó 1.5 ml sacarosa al 30% en TSC al cual fue añadido 3.5 ml de la solución rica en virus, con cuidado para evitar que el colchón de sacarosa se rompiera. Los tubos fueron centrifugados por 2 h a 40,000 rpm a 4°C. Finalmente el botón fue resuspendido en 1 ml de TSC preparando alicotas 50 µl.

e) Purificación por Cloruro de Cesio.

Lisado de células MA-104 infectadas con RRV, fueron centrifugados a 20,000 rpm en el rotor SW28 a 4°C por 2 hrs en ultracentrifuga (Beckman). El pellet obtenido se resuspendió en 2 ml TNC (Tris 10mM, NaCl 100mM, CaCl₂ 1mM, pH 7.4) y se agregó un volumen igual de tricloro-fluoro-metano (Freon). La mezcla se agitó vigorosamente por 10 minutos y se centrifugó a 6000 rpm a 4 °C por 20 minutos en ultracentrifuga (Sorvall). Posteriormente se colectó la fase acuosa repitiéndose este procedimiento 2 veces más. En seguida se preparó el gradiente de cesio, el cual consiste en llevar la solución acuosa rica en virus a 5 ml de TNC con 1.459482 gr de cloruro de cesio (Research organics) en tubos ultra-claros de 5 ml (Beckman). Los tubos se centrifugaron a 40,000 rpm en el rotor SW50 a 4 °C por 18 hrs. Posteriormente se colectaron las bandas formadas en el gradiente con ayuda de jeringas de 1 ml, empleando agujas de 21G x 1 ¼ ". La bandas se distribuyeron de la siguiente manera: la banda superior está formada por cápsides vacías (CV) con y sin capa externa (1.29 y 1.30 g/cm³ respectivamente) la banda intermedia corresponde a partículas completas (TLP, del inglés "Triple-layered particles" de 1.3 g/cm³) y la banda inferior corresponde a partículas sin la capa externa (DLP, del inglés "Double-layered particles" de 1.38 g/cm³). Posteriormente se procedió a eliminar el cloruro de cesio al pasar alícuotas de 30 µl a través de columnas de sefarosa G25 (Sigma) hechas manualmente en puntas de 200 µl o bien los virus fueron concentrados empleando filtros tipos centrífuga para proteínas mayores de 10 KDa (Millipore).

5.7 Análisis de proteínas

a) Cuantificación de proteína

Se empleó el método de Bradford para determinar la concentración de proteína de las preparaciones virales. De un estándar de BSA (Albúmina de suero bovino, Bio-Rad) se prepararon diluciones de 100, 75,

50, 30, 20, 10 y 5 µg/ml en Buffer TNC. Posteriormente en una placa (Costar) por duplicado, se agregaron 160µl de las diluciones de BSA ó de las muestras virales. En seguida se agregó 40µl de la solución concentrada de Bradford (Bio-Rad) a cada pozo mezclando perfectamente. Inmediatamente después se leyó la placa en el lector de microplacas (Labsystems-multiskan) a 570 nm. Con las concentraciones conocidas de BSA y las densidades ópticas respectivas, se obtuvo la curva estándar a través de la cual se determinó la concentración de proteína de las muestras. Como blanco se empleó el buffer TNC.

b) Geles de poliacrilamida y tinción con plata

Para caracterizar el contenido proteínico de las preparaciones virales, las muestras obtenidas fueron analizadas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras. Se empleó un marcador de peso molecular de 250 kDa (Bio-Rad). Se utilizó un gel al 11 %, gel de corrida (1.9 ml agua destilada, 720 µl de Tris 2 M pH 8.8 , 1.33 ml archilamida 30 %, 36.5 µl SDS 10 %, 25 µl persulfato de amonio (PA) (Sigma) y 4 µl Temed) y el gel concentrador al 4% (2 ml agua destilada, 108 µl de Tris (Research Organics) 2 M pH 8, 330 µl archilamida (Bio-Rad) al 30 %, 25 µl SDS (Bio-Rad) 10 %, 25 µl de PA y 3 µl Temed (Bio-Rad)). A cada 5 µl de la muestra se le agregó 10 µl de buffer de carga (SDS 1%, 1mM de 2-Mercaptoetanol, 2mM de EDTA, 10 % de glicerol, 50 mM de Tris HCl, pH 6.8) se hirvieron las muestras durante 10 minutos, se cargaron en el gel y se corrieron en voltaje constante de 120 V en buffer de corrida 1X (1.5 gr de Tris base (JT Backer), 7.2 gr Glicina (Bio-Rad) y 8 ml de SDS 10 % por lt.) por aproximadamente 2 hrs. Posteriormente el gel fue teñido con plata. Todos los pasos siguientes fueron hechos en agitación a temperatura ambiente (TA). El gel obtenido fue colocado durante 1 hr a en solución fijadora (15 ml metanol (JT Backer), 3.6 ml ácido acético coconcentrado, 15 µl de formaldehído (36 %), 11.4 ml de agua mQ). Posteriormente el gel fue lavado 3 veces, 20 minutos cada vez con una solución etanol-agua 1:2. Después fue colocado por exactamente 1 minuto protegido de la luz en solución de pretratamiento (0.01 gr de Tiosulfato de sodio(Sigma) en 50 ml de agua). En seguida el gel fue lavado tres veces por 20 segundos en agua. A continuación fue colocado por 20 minutos en una solución de plata (333 µl de solución de nitrato de Plata (Sigma)[5.5 gr de nitrato de plata en 30 ml de agua], 22.5 µl de formaldehído, 30 ml de agua). Posteriormente fue lavado con agua 2 veces por 20 segundos. A continuación fue colocado en solución de reveladora (1.8 gr Carbonato de sodio, 15 µl Formaldehído, 600 µl de la solución anterior de tiosulfato de sodio, 30 ml de agua) hasta la aparición de las bandas. Posteriormente el gel fue lavado 2 veces por 2 minutos con agua. Finalmente el gel fue colocado por diez minutos en una solución para parar la reacción (15 ml metanol, 3.6 ml de ácido acético, 11.4 ml de agua). Para conservar el gel, este fue colocado sobre papel filtro y secado en un secador de geles (Bio-Rad) durante 1 hr. a 80°C.

c) Análisis por Western Blot

Se corrieron geles de poliacrilamida con las muestras de RRV y VLP's y se procedió a realizar ensayos de Western Blot. Se transfirió el gel de poliacrilamida pretratado con buffer de transferencia (Buffer I [36.3 gr de Tris-base, 200 ml de metanol], Buffer II [3 gr Tris-base], Buffer III [3 gr de Tris-base, 3 glicina] por 15 minutos en cada Buffer) a una membrana de nitrocelulosa (Millipore) en una cámara de transferencia a 200 V (Isco) durante 2 hr con Buffer de transferencia. Se incubó la membrana con PBS 1X-leche 0.1 % en agitación 2 hrs a TA en agitación para bloquear. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo primario policlonal anti-YM de conejo 1:5000 en 15 ml de PBS 1X-leche 0.1 % (Carnation) durante 2 hrs en agitación. Se lavó 3 veces durante 15 minutos cada vez con 10 ml de PBS 1X-leche 0.1 %. Posteriormente fue incubada con el anticuerpo secundario anti-conejo de cabra acoplado a peroxidasa 1:6000 (Jackson Immunochemicals) en 15 ml de PBS 1X-leche 0.1 % durante 2 hrs en agitación. En seguida se lavó 3 veces durante 15 minutos con 10 ml de PBS 1X-leche 0.1 % y finalmente se reveló la membrana incubándola durante 20 minutos con carbazol (descrito anteriormente), y se lavó con agua corriente para eliminar el exceso.

5.8 Citofluorometría

a) Anticuerpos

Todos los anticuerpos fueron obtenidos de BD a menos que se indique otra cosa. Se emplearon a diferentes diluciones en BB-SC 1%: Fab-FITC (Jackson Immunoresearch)(1:20) y anti MHC-II (SN del hibridoma NIMR4)(1:2), anti-CD11c-FITC (HL3)(1:400), anti-CD40-PE (3/23)(1:200) y anti-CD11b-PE ó FITC (M1/70)(1:400), anti-CD8 (53-6.7)(1:200), CD80-Biotina (16-1041)(1:400), CD69-Biotina (HL.2F3)(1:200), IL-12-PE (p40/p70)(C15.6), anti-IgG1 -PE (R3-34)(1:400), anti-IgG2b,κ-FITC (M1/70)(1:400), Streptavidina-FITC(1:300) y Streptavidina-PE(1:300).

b) Tinción de marcadores externos

CD derivadas de MO sometidas a los diversos tratamientos descritos anteriormente, fueron colectadas, centrifugadas 7 minutos a 1700 rpm y lavadas una vez con RPMI-. Posteriormente las células fueron resuspendidas en 500 µl de "Binding Buffer" (BB, 0.01 % de Azida de sodio (SIGMA), 2mM de EDTA (SIGMA) y 2 % de SFB en PBS 1 X) para ser contadas. En seguida las células fueron repartidas en un número de tubos eppendorff de 500 µl ó pozos de fondo V de placas no tratadas para cultivo similar al número de tinciones requeridas para cada grupo. Cuidando de poner el mismo número de células para

cada pozo. Las células fueron centrifugadas a 350 g por 5 minutos a 4 ° C (Beckman, Coulter) y el BB fue retirado. En seguida fueron resuspendidas en 50µl de BB-suero de conejo (SC) al 1% o BB-SC 1% y anti-CD16/CD32 (2.4G2) (1:400) a 4° C durante 30 minutos para bloquear los receptores Fc. Posteriormente las células fueron lavadas con 100 µl de BB y centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos a 4 ° C. En seguida fueron incubadas por 30 minutos en oscuridad con los segundos o terceros anticuerpos para marcadores externos en un volumen de 50 µl. Se hicieron dos lavados con 150µl de BB entre la adición de cada anticuerpo. Las células marcadas fueron resuspendidas en 300 µl BB, fijadas con 100 µl de p-formaldehído al 4 % y por último analizadas en el citofluorómetro (Facsalibur Beckton and Dickinson).

c) Tinción de citocinas intracelulares

Para las tinciones intracelulares las células inmunomarcadas para moléculas externas se resuspendieron en 50 µl de Cytotfix/Citoperm (BD) por 20 minutos a 4°C para permeabilizarlas. Después las células se lavaron dos veces con 100 µl de Perm/Wash 1X (BD). Posteriormente fueron incubadas por 30 minutos en oscuridad con los anticuerpos para citocinas internas en 50 µl de Perm/Wash adicionado con SC al 1 %. En seguida se lavaron dos veces con 100 µl de Perm/Wash. Finalmente fueron resuspendidas en 400 µl de Perm/Wash y analizadas en el citofluorómetro.

5.9 Microscopia

a) Inmunoperoxidasa y tinción con Cristal violeta de las CDs

CD purificadas positivamente a través de la molécula CD11c se sembraron en placas de 96 pozos tratadas para cultivo celular y fueron estimuladas con RRV, VLP's ó LPS. Después de 24 hrs. las células se trataron con la técnica de inmunoperoxidasa como se indica en la titulación de rotavirus. Las células tratadas ó no con LPS fueron teñidos con 0.1 % de Cristal Violeta en Etanol al 20%. Finalmente las células se analizaron en un microscopio de luz.

b) Inmunofluorescencia

Células diferenciadas se cultivaron en placas de 35 mm conteniendo en el fondo cubreobjetos de 18 mm, por 24 hrs. Este tiempo fue suficiente para lograr que las células se adhirieran al vidrio. Posteriormente se retiró el medio con suero y se lavaron los cubreobjetos con 500 µl de RPMI-, posteriormente se agregó a cada placa 200 µl de RPMI- solo ó conteniendo 2 µg/ml de RRV, se dejó absorber el virus durante 1 hr a 37 ° C, se agregó 800 µl de RPMI- y se incubó por 24 hrs a 37 ° C. Después de ese tiempo se colectaron

los cubreobjetos y se colocaron en placas de 6 pozos para su inmunomarcaje. Se agregó 200 μ l de p-formaldehído 2% a cada cubreobjetos y se incubó por 20 minutos a TA para fijar las células y se lavaron 2 veces con PBS 1X-50 mM NH_4Cl (Research Organics). Posteriormente se procedió a bloquear las células durante 15 minutos (u O/N a 4°C) con PBS 1X-50 mM NH_4Cl , 1 % BSA, 2 % suero de conejo / 0.5 % Tritón X-100 y se lavaron 1 vez con PBS 1X-50mM NH_4Cl . Posteriormente se preparó el anticuerpo primario en solución bloqueadora (sin tritón) (anti-NSP3 1:500 y anti-CD11c FITC 1:100), (el anticuerpo anti NSP3 fue amablemente donado por el Dr. Luis Padilla) se agregó 50 μ l de cada anticuerpo por cubreobjetos y incubó 1 hr. a TA cubierto de la luz. En seguida las células se lavaron 4 veces con PBS 1X-50 mM NH_4Cl por 20 min (5 minutos por lavado). A continuación las células fueron incubadas con 50 μ l del anticuerpo secundario (Alexa 568 anti-ratón 1:3000) por 1 hr. a TA cubierto de la luz, después de ese tiempo se lavaron 3 veces con PBS 1X-50 mM NH_4Cl . En seguida se incubaron por 5 minutos con DAPI 1:8,000 en PBS 1X-50 mM NH_4Cl y se lavaron 1 vez más con PBS 1X 50 mM NH_4Cl . Posteriormente se colocaron 5 μ l de glicerol al 10 % en PBS 1X en portaobjetos de 76 x 26 mm a los cuales se les colocaron los cubreobjetos con la parte de las células hacia abajo. Las orillas fueron selladas con barniz y se dejaron secar por 24 hrs. Finalmente las células fueron conservadas a -70 ° C hasta su observación en el microscopio de epifluorescencia.

5.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el Software STATISTICA versión 6.0 (Tulsa, OK USA). Las diferencias entre los resultados fueron determinados a través de la prueba Kruscal-Wallis. Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados como significativos.

VI. RESULTADOS

6.1. Generación de células dendríticas a partir de precursores de médula ósea

Se generaron células dendríticas a partir de precursores de médula ósea (MO) de ratones BALB/c. Las células de MO fueron cultivadas durante cinco días en presencia de 15 - 20 % de medio condicionado rico en GM-CSF proveniente de cultivos de células CHO transfectadas. La expresión de la integrina CD11c (marcador de CD) en las células fue analizada por citofluorometría usando como control células de MO frescas, para cada muestra se capturaron 10,000 eventos. Se encontró que en las células de MO cultivadas con GM-CSF se generó una población de células más grandes y granulosas en comparación con el control de células de MO frescas (Fig. 6.1A, B). La expresión del marcador de superficie CD11c en la población total fue de un 30 % en las células diferenciadas con el factor y de un 1.3 % en las células de MO sin cultivar (Fig. 1C, $n = 3$, $P < 0.05$). Estos resultados claramente nos indican que las células de MO cultivadas en presencia de GM-CSF se enriquecieron en CD y que estas muy probablemente son la nueva población mencionada.

Para demostrar que la nueva población celular correspondía a las CD, se analizaron los datos de citofluorometría en 3 diferentes regiones que corresponden a 3 poblaciones definidas (Fig. 6.1 D y F). Se encontró que en la región 3, que correspondía a la nueva población, se localizaba el mayor porcentaje de expresión de CD11c con un 47.5 % de células positivas en esta región (Fig. 6.1 D). En contraste, las regiones 1 y 2 mostraron un porcentaje de expresión del marcador de 5.1 y 2.6 %, respectivamente ($n = 4$, $P < 0.05$). De esta manera, todos los resultados reportados en este trabajo se referirán a la región 3, que denominamos como la región enriquecida en CD, a menos que se especifique otra cosa. La región 3 corresponde a un 30 % ($n = 4$, $DS = 11.9$) de las células totales.

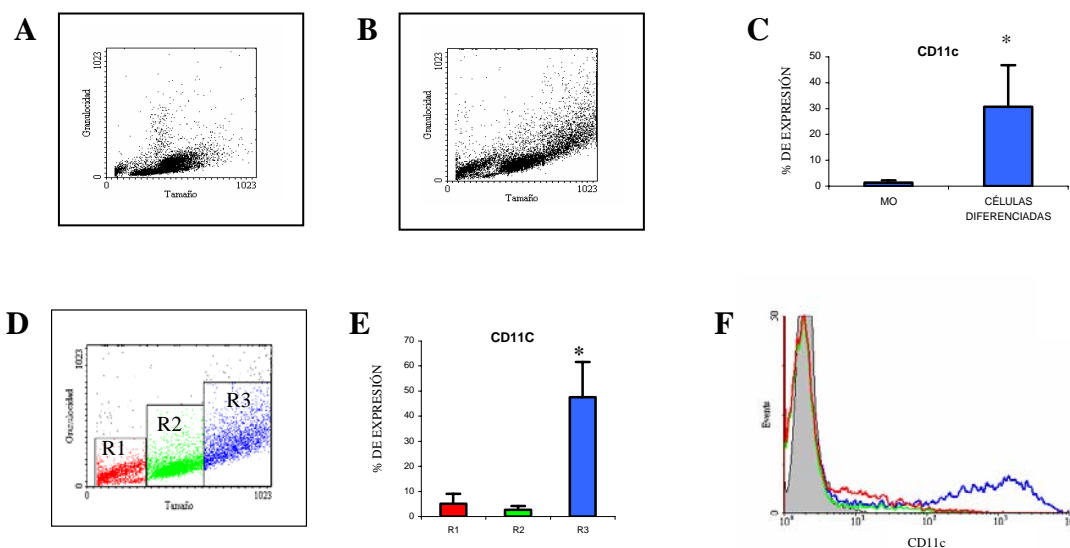


Figura 6.1. Generación de CD derivadas de MO. Análisis por citofluorometría de la expresión de CD11c en células de MO y células diferenciadas. (A) Grafico granulocidad & Tamaño de células frescas de MO y (B) células de MO cultivadas en presencia de GM-CSF. (C) Expresión de CD11c en células de MO y células diferenciadas, (n = 3, P < 0.05). (D, E y F) Análisis de la expresión de CD11c en las células diferenciadas en tres diferentes regiones, (n = 4, P < 0.05).

Con la finalidad de optimizar los rendimientos en la generación de CD derivadas de MO, se usaron diferentes concentraciones de SN rico en GM-CSF y tiempos de cultivo. Se realizó una cinética de inducción de CD a partir de cultivos de MO en función de concentraciones de SN al 5, 10 y 20 %. Se encontró que no existieron diferencias en la cinética de expresión de CD11c en función de las diferentes concentraciones de SN empleado. En todos los casos se observó que durante los 3 primeros días hubo un ligero incremento de CD11c en células totales y a partir de este último día se dio un gran incremento del marcador al día 4 que se mantuvo hasta el día 6. Como control se cultivaron células de MO en ausencia de GM-CSF y como se esperaba las células no expresaron CD11c (dato no mostrado).

Las CD derivadas de MO con GM-CSF presentan un fenotipo de CD de tipo mielóide (Inaba *et al.*, 1992), esto es, presentan el fenotipo CD11c⁺, CD8α⁻ y CD11b⁺. De esta manera, células de MO cultivadas por 5 días con el factor de diferenciación fueron analizadas por citofluorometría para la expresión de las moléculas mencionadas. Se encontró que las CD expresaban la molécula CD11b pero no CD8α (Fig. 6.2A), lo que confirma el fenotipo mielóide descrito. Así mismo, cuando las células diferenciadas por cinco días fueron seleccionadas positivamente a través de la molécula CD11c y se analizaron por microscopía se demostró que las CD presentaron la

morfología típica de células dendríticas (Fig. 2B) lo cual se acentuó cuando fueron cultivadas por 24 hrs. en presencia de 500 ng/ml de LPS (Fig. 9Ad, ver más adelante).

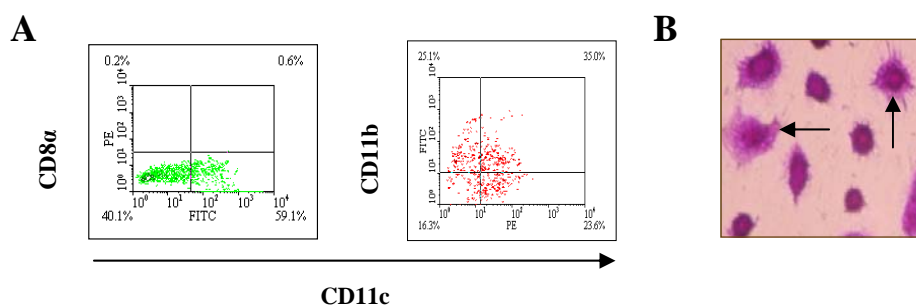


Figura 6.2. Fenotipo y morfología de las CD derivadas de MO. (A) Fenotipo de las CD derivadas de MO en base a la expresión de las moléculas CD8 α y CD11b en R3. (B) Morfología de las CD purificadas positivamente a través de la integrina CD11c, teñidas con cristal violeta. Las flechas indican células que presentan la morfología típica de CD.

En base a los resultados anteriores, es claro que se logró montar el sistema de generación de CD a partir de precursores de MO, que presentan el fenotipo de CD mielóide esperado, por lo que estas células fueron utilizadas para los subsecuentes experimentos de estimulación con rotavirus (RV).

LPS es un contaminante ubicuo. La presencia de pequeñas cantidades del mismo en el medio de cultivo podría afectar el proceso de producción de CD y la funcionalidad de las mismas. Existe evidencia de que un estímulo continuo dado por LPS en los precursores, es capaz de inhibir la diferenciación de los mismos a CD (Palucka *et al.*, 1999 Rotta *et al.*, 2003). (Fig. 6.3 A). Para descartar la presencia de LPS en los cultivos, células de MO fueron cultivadas en presencia de 5 ng/ml de LPS y GM-CSF. Se midió la expresión de CD11c y CD40 en células de MO cultivadas durante 5 días en presencia ó ausencia de 5 ng/ml de LPS y estimuladas con 1 μ g/ml de mismo. Como se esperaba, el LPS inhibió la diferenciación de los precursores. Se encontró en el total de células, una baja expresión de CD11c en células de MO cultivadas en presencia de GM-CSF y LPS cuando se comparó con células control cultivadas en ausencia LPS. Por otro lado, se observó que del total de células diferenciadas estimuladas con LPS pero cultivadas en ausencia del mismo, un 13.4 % expresaron CD40, lo cual fue un aumento significativo cuando se comparó con células control no estimuladas. En contraste, cuando células cultivadas en presencia de LPS fueron sometidas a un estímulo secundario, solo un 2.8 % de las células expresaron CD40 y no fue significativo cuando se comparó con células control no sometidas al estímulo ($n = 2$, $P < 0.05$, dato no mostrado), este fenómeno fue similar al observado cuando se midió la expresión de

CD40 en células de MO estimuladas con LPS (Fig.6.4 B ver más adelante). Este resultado nos indica que en nuestros cultivos de diferenciación no hubo 5 ng/ml de LPS como contaminante.

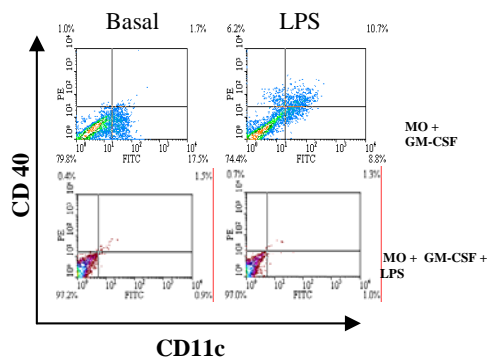


Figura 6.3. Cultivo de células de MO en presencia de LPS. Expresión de CD11c y CD40 en células de MO cultivadas durante 5 días con GM-CSF en presencia ó ausencia de 5 ng/ml de LPS y posteriormente estimuladas por 24 hrs. con 1 µg/ml del mismo.

6.2. Estimulación de CDMO con RV

Con la finalidad de determinar si rotavirus es capaz de activar a las CD derivadas de MO, éstas fueron estimuladas con diferentes preparaciones de RV y el incremento de las moléculas CD40, MHC II y CD80, así como los niveles de IL-12 intracelular fueron analizados por citometría de flujo.

a) CD40

Para analizar la inducción en la expresión de CD40 por rotavirus, se determinaron los niveles constitutivos de este marcador en CDMO de 5 días de cultivo y se compararon con los niveles en células de MO. Se encontró que 0.4 % de las células de MO expresaban CD40, en cambio 5.8 % de las células diferenciadas en R3 expresaban esta molécula. La sola diferenciación indujo un incremento significativo en la expresión de CD40 ($n = 3$, $P < 0.05$) (Fig. 6.4 B). Como control positivo de activación y maduración de las células diferenciadas se utilizó LPS, ya que es capaz de activar a las CD a través de TLR4 e inducir el incremento de marcadores de activación. Cuando células de MO fueron estimuladas con 1µg/ml de LPS no se encontró un aumento

significativo de CD40 con respecto a las células control no estimuladas. En seguida, para determinar la concentración óptima de LPS, las células diferenciadas fueron estimuladas con diferentes concentraciones del mismo. Se encontró que el porcentaje de células que expresaban CD40 en la región enriquecida en CD (R3) incrementó desde la concentración mínima empleada que fue de 500 ng/ml y que el porcentaje de células positivas para CD40 fue directamente proporcional a la concentración de LPS empleada (experimento representativo) (Fig. 6.4 A). Así que se eligieron las concentraciones de 500 y 1000 ng/ml de LPS en los ensayos subsecuentes.

A continuación, para determinar si RV era capaz de incrementar la expresión de este marcador, las células diferenciadas fueron estimuladas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de RV semipurificado (Sp, Fig. 6.5C1, ver más adelante). Se encontró un incremento significativo en el porcentaje de células positivas para CD40 en R3 que fue de 57.3 en comparación con células control no estimuladas ($n = 3$, $p < 0.05$) (Fig. 6.4 B).

Posteriormente se midió la IMF (intensidad media de fluorescencia) con respecto a la expresión de CD40, lo cual nos indicaría si había incrementado la cantidad de moléculas que inicialmente expresaba cada célula. Se encontró que las células diferenciadas estimuladas con RV tuvieron una IMF en R3 mayor que las células control no estimuladas (95.5 y 44.1 respectivamente) sin embargo, la diferencia no fue significativa.

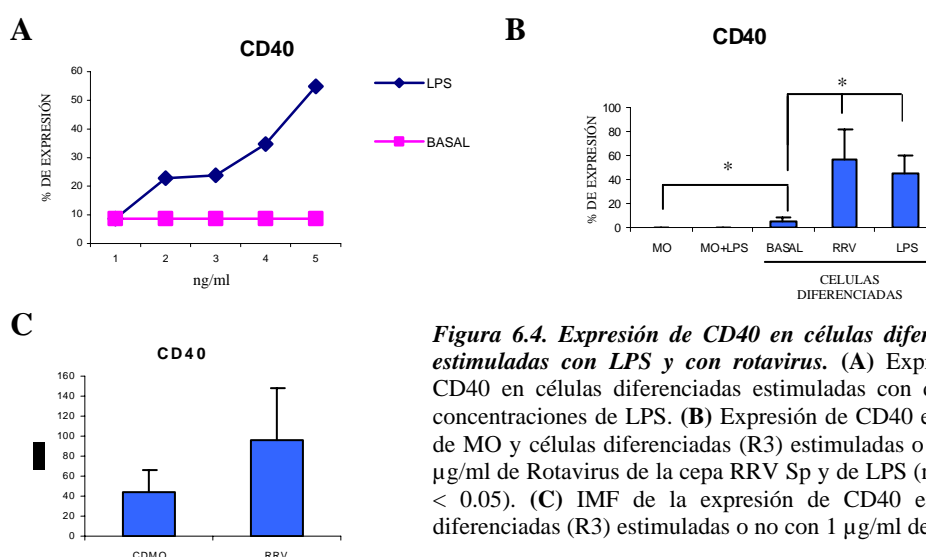


Figura 6.4. Expresión de CD40 en células diferenciadas estimuladas con LPS y con rotavirus. (A) Expresión de CD40 en células diferenciadas estimuladas con diferentes concentraciones de LPS. (B) Expresión de CD40 en células de MO y células diferenciadas (R3) estimuladas o no con 1 $\mu\text{g/ml}$ de Rotavirus de la cepa RRV Sp y de LPS ($n = 2-3$, $P < 0.05$). (C) IMF de la expresión de CD40 en células diferenciadas (R3) estimuladas o no con 1 $\mu\text{g/ml}$ de RRV Sp

Hasta aquí se había visto que RV era capaz de producir un efecto en las CD derivadas de MO con respecto a la expresión de CD40. No obstante, el virus que empleamos era semipurificado por colchón de sacarosa, lo cual no descartaba la presencia de restos celulares. Además, es sabido que las partículas virales obtenidas de esta manera, se componen de partículas virales completas e incompletas. Así que los ensayos subsecuentes se hicieron con virus purificado por gradiente de cloruro de cesio, utilizando solo las partículas consideradas como TLP en donde la mayoría de las partículas virales están completas.

Por otro lado, aun no se podía descartar la presencia de LPS en las preparaciones virales y en los cultivos ya que, como esta molécula forma parte de las paredes bacterianas es un contaminante ubicuo. Para descartar la presencia de LPS en las preparaciones virales se procedió a llevar a cabo los ensayos de estimulación empleando stocks virales hervidos por 1 hr. y sin hervir. El LPS es una molécula termoestable, por lo que la disminución en la activación observada en CD estimuladas con preparaciones virales sometidas a ebullición descartaría la presencia de este pues las partículas virales son sensibles a la temperatura (Blutt et al 2004^a). Inicialmente, las células diferenciadas fueron cultivadas en presencia de TNC (buffer donde esta resuspendido el virus) lo cual indujo la expresión de CD40 en un 4.8 % de las células CD11c⁺ en R3. Al compararlo con la expresión basal de CD40 en células diferenciadas no sometidas a ningún estímulo, no se encontró diferencia significativa. Con esto pudimos descartar la presencia LPS en el buffer que contiene las preparaciones virales. A continuación, las células diferenciadas fueron estimuladas con 1 µg/ml de LPS hervido y sin hervir. Se encontró, que en células cultivadas en presencia de LPS hubo un incremento del 22.5% en células CD11c⁺ que expresaban CD40 y del 22.15 % en células cultivadas en presencia de LPS hervido (R3). Ambos resultados fueron significativos cuando se compararon con células control no estimuladas (n = 2, P < 0.05) (Fig. 6.5 A).

Por otro lado, para probar que RV era capaz de incrementar la expresión de CD40 en CD CD11c⁺ las células diferenciadas fueron cultivadas en presencia de 1 µg/ml de RV purificado (Fig. 6.5 C2). Se encontró que en las células diferenciadas cultivadas en presencia de RV 15.1 % de las mismas en R3 expresaban CD40, lo cual fue significativamente mayor cuando se comparó con células cultivadas en presencia de TNC (n = 2, P < 0.05). Para descartar la presencia de LPS en las preparaciones virales se empleó 1 µg/ml virus hervido para estimular a las CD. Se encontró una disminución del 50% en la expresión de CD40 en células CD11c⁺ en R3 con

respecto a las células estimuladas con RV sin hervir, el valor observado fue comparable al obtenido con TNC. Este resultado claramente indica que RV es capaz de inducir la expresión de CD40 en CD CD11c⁺.

Posteriormente, para saber si en el incremento observado en la expresión de CD40 participaban las proteínas virales estructurales, las células diferenciadas fueron cultivadas en presencia de VLP's conformados por las proteínas VP2/VP6/VP7 como se puede observar en las Figuras 4C3 y 4D. El incremento en el porcentaje de expresión de CD40 en células diferenciadas estimuladas con VLP's, así como la disminución del mismo al emplear VLP's hervidas nos indicaría que muy probablemente la conformación estructural de las proteínas virales estaba participando en el incremento observado. Como se esperaba, de acuerdo a lo reportado por Blutt y cols. (2004^a) se encontró que las VLP's eran capaces de inducir un incremento en el porcentaje de expresión de CD40 en CD CD11c⁺ el cual fue del 12.8 % (n = 2, P < 0.05). Así mismo, cuando se emplearon VLP's hervidas se observó una disminución en la expresión de CD40 con respecto a las células estimuladas con VLP's sin hervir, sin embargo, este decremento no fue significativo.

Por otro lado, para probar si el genoma viral estaba participando en la activación de las células, células diferenciadas fueron estimuladas en presencia de RNAdc viral purificado de células infectadas. Se sabe que esta molécula es el ligando de TLR3 presente en CD, así que se esperaba que CDMO cultivadas en presencia del mismo fueran capaces de inducir un incremento en el porcentaje de células que expresaban este marcador. Contrario a lo que se esperaba, se observó que en las células cultivadas en presencia de RNAdc de rotavirus no hubo un incremento en el porcentaje de expresión de CD40 en CD CD11c⁺, cuando se comparó con células control no estimuladas (Fig. 6.5 A). A continuación se midió la IMF con respecto a la expresión de CD40 de células estimuladas con RV, VLP's ó LPS. No se encontró diferencia significativa en la IMF de la expresión de CD40 en CD estimuladas con RV con respecto a células cultivadas en presencia de TNC. Sin embargo se encontró un incremento significativo en la IMF de células estimuladas con VLP's ó LPS, cuando se compararon con células cultivadas en presencia de TNC ó células control no estimuladas (n = 2, P < 0.05) (Fig. 6.5 B).

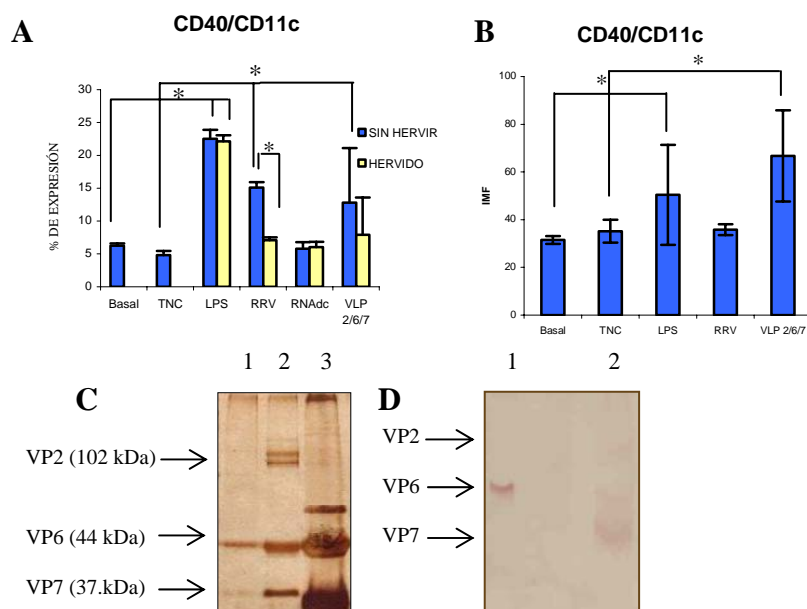


Figura 6.5. Expresión de CD40 en CD11c⁺ estimuladas con RV e IMF de la expresión de CD40. (A) Expresión de CD40 en CD11c⁺ estimuladas con 1 μ g/ml de LPS, 1 μ g/ml de RRV, 500 ng/ml de RNAdc y 30 μ g/ml de VLP's conformados por VP2/VP6/VP7 de rotavirus. Las muestras fueron hervidas ó no. (n = 2, P < 0.05). S/H= Sin hervir, H= Hervido. (B) Medición de la IMF de la expresión de CD40 (n = 2, P < 0.05). (C) Preparaciones virales en un gel desnaturalizante SDS-acrilamida 11 % teñido con nitrato de plata. 1) RRV Sp, 2) RRV purificado y 3) VLP's VP2/VP6/VP7. (D) Western blot de las preparaciones virales utilizando un anticuerpo policlonal α -YM. 1) RRV y 2) VLP's VP2/VP6/VP7.

Con base en los resultados anteriores es claro que RV es capaz de inducir un incremento en el porcentaje de CD que expresan CD40 y que esta expresión no correlacionó con el incremento en la IMF, lo que sugiere que aumentó el número de CD que expresaban esta molécula. En este incremento participan las proteínas pero no el genoma de rotavirus.

b) MHC II

Para evaluar la inducción en la expresión de MHC II por RV, primero analizamos los niveles constitutivos de esta molécula en la región enriquecida en CD (R3) de cultivos de 5 días y los comparamos con los niveles en células de MO. Se encontró que 19 % de las células de MO expresaban MHC II, en contraste las células diferenciadas en R3 expresaban el 59 %. Esto es, la sola diferenciación a CD indujo un incremento significativo en la expresión de MHC II (n = 2-3, p < 0.05). Cuando células de MO fueron estimuladas con LPS no se encontró un aumento significativo de MHC clase II con respecto a las células control no estimuladas. Por otro lado, cuando las células diferenciadas fueron estimuladas con LPS se encontró un incremento en la expresión de este marcador con respecto a las células control (n = 2, P < 0.05). Así también, las células diferenciadas fueron estimuladas con 1 μ g/ml de RV Sp sin que se detectaran cambios en

el porcentaje de células que expresaban MHC II con respecto a las células no estimuladas (Fig. 6.6 A). Cuando se midió la expresión de esta molécula en células CD11c⁺ en R3, se observó que el porcentaje de células tratadas con RRV no cambió con respecto a las células control no estimuladas (Fig. 5B).

A continuación se midió la IMF, sin embargo, no hubo diferencia significativa en la IMF expresada en las células en R3 sin estimular y estimuladas con RV (Fig. 6.6 C). Con la finalidad de demostrar que el anticuerpo α -MHC II utilizado funcionaba adecuadamente, se midió la expresión de MHC II en fibroblastos transfectados y sin transfectar con los genes que codifican para MHC II, así como en células B que expresan esta molécula constitutivamente (células A20). Se encontró que tanto en las células A20 como en los fibroblastos transfectados más del 90 % de las células expresaban MHC II, y como se esperaba no existió expresión de esta molécula en los fibroblastos no transfectados. Este resultado claramente nos indicó que el anticuerpo funcionaba adecuadamente (Fig. 6.6 D, experimento representativo).

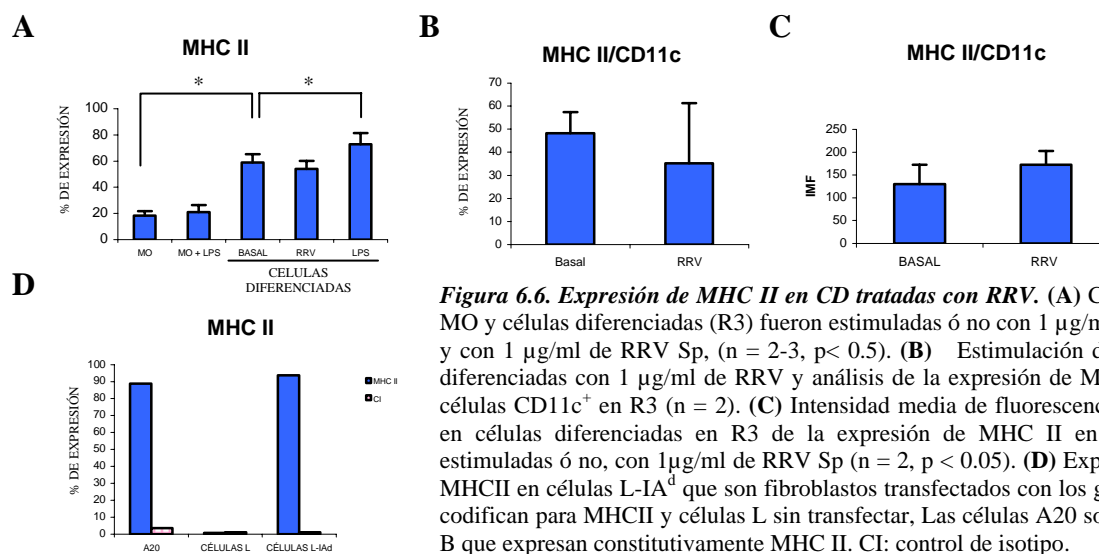


Figura 6.6. Expresión de MHC II en CD tratadas con RRV. (A) Células de MO y células diferenciadas (R3) fueron estimuladas ó no con 1 μ g/ml de LPS y con 1 μ g/ml de RRV Sp, (n = 2-3, p < 0.5). (B) Estimulación de células diferenciadas con 1 μ g/ml de RRV y análisis de la expresión de MHC II en células CD11c⁺ en R3 (n = 2). (C) Intensidad media de fluorescencia (IMF) en células diferenciadas en R3 de la expresión de MHC II en células estimuladas ó no, con 1 μ g/ml de RRV Sp (n = 2, p < 0.05). (D) Expresión de MHCII en células L-IA^d que son fibroblastos transfectados con los genes que codifican para MHCII y células L sin transfectar, Las células A20 son células B que expresan constitutivamente MHC II. CI: control de isotipo.

c) CD80

Para determinar la inducción en la expresión de CD80 por RV, primero analizamos los niveles constitutivos de esta molécula en células diferenciadas de 5 días de cultivo y los comparamos con los niveles en células de MO. Se encontró que 1.5 % de células de MO expresaban CD80, en contraste las células diferenciadas en R3 expresaban 86.5 %. Al igual que para MHC II, la sola

diferenciación a CD indujo un marcado incremento en la expresión de CD80. En seguida, cuando células de MO fueron estimuladas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS se encontró un incremento significativo de CD80 con respecto a las células control no estimuladas ($n = 3$, $P < 0.05$). Para conocer la concentración óptima de LPS con la cual se activan las CD, las células diferenciadas fueron estimuladas con diferentes concentraciones del mismo. Se encontró un 86.5 en el porcentaje de expresión de CD80 basal en células control no estimuladas, el cual fue aun mayor que los niveles observados en células estimuladas con las diferentes concentraciones de LPS empleadas (Fig. 6.7 A, experimento representativo). Cuando las células diferenciadas fueron cultivadas en presencia de TNC no se observó cambio, en la expresión de CD80 en R3 con respecto al nivel basal de la expresión de esta molécula. Así mismo cuando las células diferenciadas fueron estimuladas con RV, se observó un 84.3 % de células que expresaban de CD80, lo cual no represento una diferencia relevante en la expresión de este marcador (Fig. 6.7 B) con respecto a las células cultivadas en presencia de TNC. Por otro lado, cuando se midió la expresión de CD80 en CD11c⁺ en R3 se observó una disminución en la expresión de CD80 en células estimuladas con LPS cuando se comparó con células control no estimuladas. Y no se observó cambio en la expresión de este marcador en células estimuladas con RV con respecto a células cultivadas en presencia de TNC (Fig. 6C, experimento representativo). Sin embargo, hubo un incremento en la IMF de las células estimuladas con LPS pero no con RV (Fig. 6.7 D, experimento representativo). Con base en los resultados anteriores, no hay duda que el nivel basal de la expresión de CD80 fue muy elevado, que LPS induce una disminución en el porcentaje de células que expresan este marcador, pero un incremento en la IMF del mismo y que RV no induce cambio en el porcentaje de expresión de esta molécula ni en la IMF en las CD.

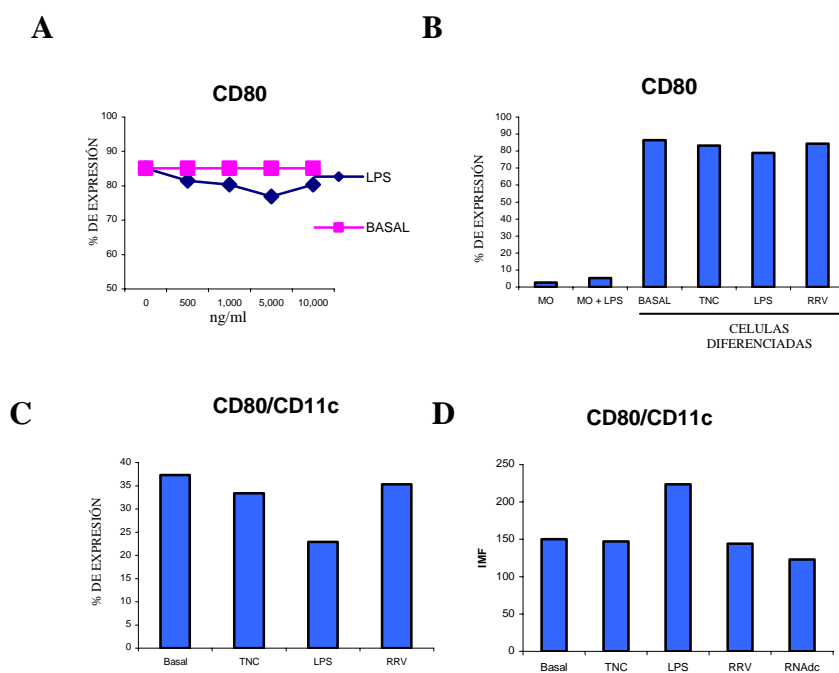


Figura 6.7. Expresión de CD80 en las células diferenciadas. (A) Expresión de CD80 en células diferenciadas (R3) estimuladas con diferentes concentraciones de LPS. (B) Expresión de CD80 en células de MO y en células diferenciadas en R3 cultivadas en presencia de TNC ó estimuladas o no con 1 ug/ml de LPS y 500 ng/ml de RRV (Para MO y MO + LPS n = 3, P < 0.05). (C) Expresión de CD80 en CD en R3, las células fueron cultivadas en presencia de TNC y estimuladas con 1 ug/ml de LPS y 500 ng/ml RRV. (D) IMF de la expresión de CD80 en las CD.

d) IL-12

La IL-12 es una citocina pro-inflamatoria secretada por macrófagos y CD. Se incrementa en algunas infecciones por patógenos intracelulares, siendo capaz de participar en respuestas antivirales *in vivo*. Con la finalidad de determinar si RV es capaz de inducir la producción de IL-12 en las CD derivadas de MO, éstas fueron cultivadas con rotavirus, LPS, INF- γ y con mezclas de los anteriores. La IL-12 intracelular producida por las células fue medida por citometría de flujo. Se encontró que cuando las células diferenciadas fueron cultivadas por 24 hrs. en presencia de 50 U/ml de INF- γ y 1 μ g/ml de LPS se produjo un aumento en el porcentaje de células CD11c⁺ que producían esta citocina, en comparación con células control no estimuladas. Cuando las células se cultivaron en presencia de INF- γ y LPS por separado, produjeron niveles similares de IL-12 que las células control. Cuando las células diferenciadas fueron cultivadas en presencia de INF- γ y 500 ng/ml de rotavirus no hubo incremento en el porcentaje de células que expresaban esta citocina. Se observó lo mismo cuando las células fueron cultivadas únicamente con RV por 24 y 48 hrs. (Fig. 6.8, experimento representativo). Con base en los resultados anteriores, podemos concluir que rotavirus no induce la producción de IL-12 en CD derivadas de MO.

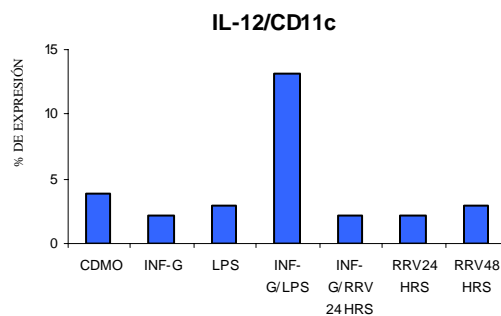


Figura 6.8. Producción de IL-12 por células CD11c⁺ estimuladas con rotavirus. Medición de IL-12 intracelular en R3 de CD cultivadas en presencia de 500 ng/ml de RRV, 1 ug/ml de LPS y 50 U/ml de INF- γ por 24 y 48 hrs.

6.3. Microscopía de las CDMO en presencia de rotavirus

El efecto observado sobre las CD, según los resultados de la figura 4A no se debe al RNAdc viral, si no a las proteínas de rotavirus. Sin embargo, si RV era capaz de entrar a las CD, este podría estarse replicando dentro de ellas, generar RNAdc viral en el citoplasma y activar otra vía, como PKR (Proteína cinasa R), que fuese en parte responsable de la activación (como sugiere Vijay-Kumar y cols. 2005). Para probar lo anterior, las CD purificadas por selección positiva fueron cultivadas en presencia de rotavirus y analizadas por microscopía (con la finalidad de observar el antígeno asociado a ellas). Se emplearon VLP's como control, que no serían capaces de infectar a las CD y replicarse dentro de ellas, por lo que probablemente el antígeno sería difícilmente detectado. Se observó la presencia del antígeno viral en el 14 % de las células cultivadas en presencia de 1 μ g/ml de RV y en el 1 % de las CD cultivadas en presencia de VLP's VP2/VP6/VP7 (utilizando la detección por inmunoperoxidasa) (Fig. 6.9 A). Aunque en ambos casos fue posible observar la presencia de antígenos de RV asociado a las CD, se observó un porcentaje menor cuando las CD fueron cultivadas en presencia de las VLP's (Fig. 6.9 Ac). Este resultado apoya la hipótesis de que RV pudiera estar infectando a las CD.

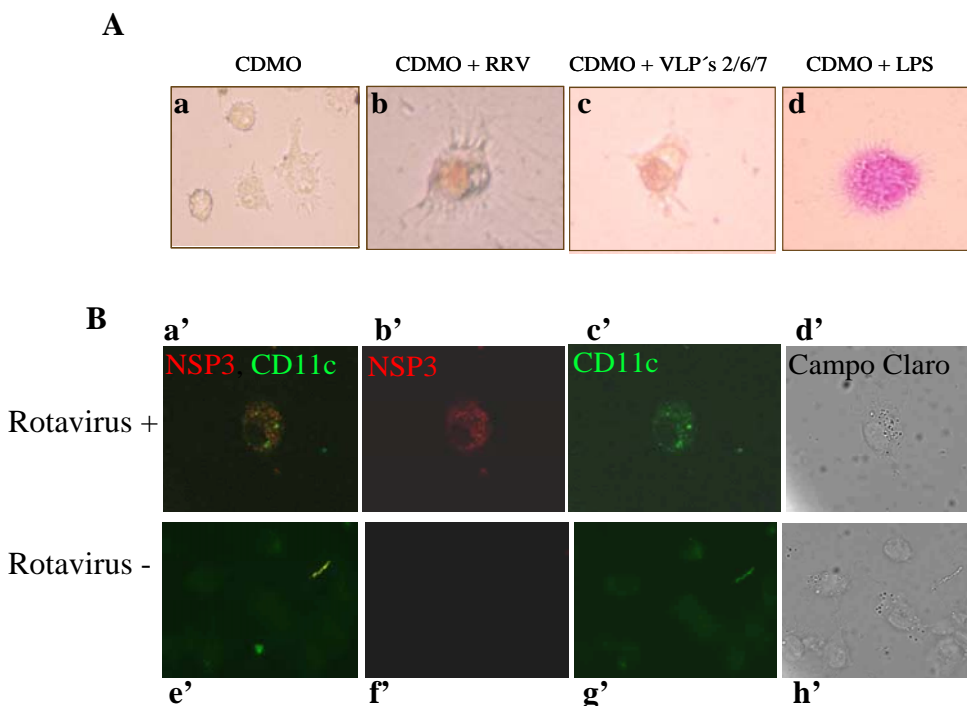


Figura 6.9. Microscopía de las CDMO en presencia de rotavirus. (A) Presencia del antígeno viral en CD purificadas positivamente a través de la integrina CD11c cultivadas por 24 hrs con **b)** 1 $\mu\text{g/ml}$ de RRV ó **c)** VLP's 2/6/7 e inmunomarcadas con el anticuerpo α -RRV detectado por el método de peroxidasa-carbazol. En **a)** se muestran las células control. En **d)** células cultivadas por 24 hrs en presencia de 500 ng/ml de LPS teñidas con cristal violeta. (B) Células diferenciadas durante 8 días fueron cultivadas por 24 hrs en presencia ó ausencia de 500 ng/ml de RRV. Las células fueron inmunomarcadas con el anticuerpo monoclonal de ratón α -NSP3 (**b'** y **f'**), detectado con un anticuerpo α -ratón acoplado a Alexa 568 ó con el anticuerpo monoclonal α -CD11c (**c'** y **g'**) acoplado a FITC. En (**a'** y **e'**) se muestran las imágenes superpuestas. Y en (**d'** y **h'**) las imágenes de campo claro.

Tomando como antecedente estos resultados, se decidió desarrollar la técnica de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal contra la proteína no estructural de rotavirus NSP3, la cual solo se produce cuando hay replicación viral. Esto permitiría determinar si las CD eran permisivas a la infección. Se observó que NSP3 se produjo dentro de células CD11c⁺ cultivadas en presencia de 500 ng/ml RV (Fig 6.9 Ba') y como se esperaba NSP3 no estaba presente en las células control cultivadas en ausencia del virus (Fig. 6.9Be'). Estos resultados indican que las CD son permisivas a la infección por RV.

VII. DISCUSIÓN

Las CD son las CPA más importantes por ser las principales células involucradas en la inducción de la respuesta inmune primaria (Hart 1997; Banchereau and Steinman 1998). Las CD transfieren información del medio ambiente circundante (patógenos invasores) a las células tanto del sistema inmune innato como del adaptativo. Los progenitores de las CD en MO dan lugar a precursores circulantes que llegan a los tejidos, donde residen como CD inmaduras con elevada capacidad endocítica. Después de la entrada de patógenos ó daño al tejido, las CD inmaduras capturan el antígeno y subsecuentemente migran a los órganos linfoides donde activan a células T antígeno específicas, iniciando la respuesta inmune adaptativa (Banchereau *et al.*, 2000). Así, las CD participan de manera importante en la respuesta producida por los linfocitos Th y Tc. Las CD también controlan la calidad de la respuesta de las células T, induciendo distintas respuestas efectoras en estos linfocitos. Estas respuestas son críticas para la eliminación de las infecciones y de las células tumorales.

El principal objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta de las CD al interactuar con RV. Debido a que las CD se encuentran en un bajo número en los tejidos del cuerpo y los procedimientos para su aislamiento son complicados e inducen su activación, el estudio de las CD ha sido difícil. Una alternativa para su estudio sistemático, es la generación de CD a partir de precursores de MO ó monocitos de sangre periférica en los modelos de ratón y de humano respectivamente, cultivados en presencia de GM-CSF (e IL-4 en el caso de monocitos humanos). Este procedimiento permite la generación de un gran número de CD y genera poblaciones uniformes en cuanto al fenotipo y su estado de maduración. Asimismo, este modelo permite realizar ensayos de estimulación de las CD ante una gran diversidad de antígenos (virus, bacterias, péptidos etc.), estudiar la funcionalidad de estas células y realizar ensayos de activación de células T (Lutz et al 1998; Inaba et al. 1992; Sallustro et al 1994).

En el laboratorio se montó el sistema de generación de CD a partir de precursores de MO de ratón. Para esto, nos basamos en el método reportado por Lutz *et al.*, (1998) en el cual no se elimina ninguna población presente en las células de MO que pudiera excluir algunos progenitores (Hart 1997). Además, se emplean cajas Petri bacteriológicas en vez de cajas Petri

para cultivo celular, pues estas últimas favorecen el desarrollo de macrófagos e inhiben la generación de CD (Yamaguchi *et al.*, 1997). La diferenciación se llevó a cabo durante 5 días y no 10, como se propone en el método de Lutz, pues teóricamente a este tiempo se tienen CD en un estado de maduración menor (Bonifaz L., CMN, Siglo XXI, comunicación personal).

Las CD generadas durante el desarrollo de este proyecto tuvieron un fenotipo mieloide determinado por la presencia de CD11b y la ausencia de CD8 α , tal como se ha descrito (Inaba *et al.*, 1992; Romani *et al.*, 1994; Rescigno 2002). Este fenotipo también es reportado en las CD que constituyen la población predominante de CD en LP (Chirido *et al.*, 2005); aunque la funcionalidad de las CD esta determinada por el ambiente donde se encuentran, este podría potencialmente representar un buen modelo de CD de LP.

Para la generación de las CD se empleó SN rico en GM-CSF producido a partir de células transfectadas con el plásmido que contiene el gen de ratón que codifica para este factor.

Lutz *et al.*, (1998) compararon la generación de CD en presencia de GM-CSF recombinante y de SN rico en GM-CSF y no observaron diferencias en el rendimiento de CD (medido por la expresión del marcador de CD CD11c).

Los rendimientos que se obtuvieron en la generación de CD al día 5 fueron del orden del 30 %. Estos resultados se acercan a lo reportado por Lutz et al., (1998), en donde los cultivos de MO de ratones de la cepa C57BL6 generaron al día 6 un rendimiento de CD del 36 %. Esta pequeña diferencia se pudo haber debido a lo reportado previamente en el sentido de que existe mejor rendimiento en la generación de CD a partir de MO en ratones C57BL/6 que de MO de ratones BALB/c.

El LPS es un activador potente de las células del sistema inmune, sin embargo se ha descrito una insensibilidad temporal de células de la inmunidad innata a retos continuos con esta molécula. Este fenómeno es conocido como tolerancia al LPS y se asocia con alteraciones funcionales en CD y macrófagos (Wysocka *et al.*, 2001). Para determinar la presencia de LPS como contaminante en los cultivos, generalmente se emplea el ensayo de Lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), el cual se fundamenta en el empleo de una mezcla de enzimas obtenidas de

amebocitos del cangrejo herradura americano (*Limulus polyphemus*) que son capaces de formar un coagulo en presencia de LPS a partir del cual se han desarrollado Kits para cuantificar la endotoxina (Levin 1987). Alternativamente, se descarta la presencia de LPS por la ausencia de TNF- α en el sobrenadante de los cultivos, ya que la estimulación con LPS induce la producción de esta citocina por las CD. Debido a que en el laboratorio no se contaba con el material para llevar a cabo cualquiera de estos dos ensayos, se decidió realizar los cultivos de diferenciación en presencia de 5 ng/ml de LPS. La diferenciación de precursores (monocitos) de CD en presencia de LPS bloquea la diferenciación de los mismos *in vitro* (Palucha *et al.*, 1999) e *in vivo* (Rotta *et al.*, 2003). Se observó que las células de MO cultivadas en presencia de GM-CSF y LPS fueron incapaces de diferenciarse a CD, lo cual comprobamos por la ausencia de la expresión de la integrina CD11c en las células. De esta manera, descartamos la presencia de al menos 5 ng/ml de LPS en los cultivos, pues su presencia hubiese inhibido la generación de CD.

Con base en lo anterior, es posible concluir que se generaron CD a partir de precursores de MO de ratón con un fenotipo mieloide y una eficiencia de generación similar a lo reportados en otros trabajos.

Algunas moléculas tales como LPS, TNF- α , la proteína de envoltura de MMTV (virus mamario tumoral de ratón), entre otras, tienen la capacidad de activar a las CD e inducir su transición de CD inmaduras a CD maduras. El proceso de maduración está asociado a algunos eventos coordinados tales como (a) pérdida de la capacidad endocítica/fagocítica, (b) incremento en la expresión de moléculas co-estimuladoras tales como CD40, CD80 y CD86, (c) cambio en la morfología de las células al extender largas prolongaciones citoplasmáticas y (d) cambio en los compartimentos de MHC II, incrementando su expresión en la superficie celular; de tal forma que las CD maduras adquieren la capacidad para activar a las células T (Banchereau *et al.*, 2000; Burzyn *et al.*, 2004).

Utilizando el procedimiento anteriormente mencionado, en este trabajo se estudió el efecto de la interacción de RV sobre la maduración de las CD derivadas de MO, lo cual se llevó a cabo midiendo la expresión de los marcadores de activación CD40, CD80 y MHC II sobre la superficie de las CD, así como la producción de IL-12. Asimismo, se determinó la contribución

tanto de las proteínas estructurales como del genoma de RV (RNAdc) en esta activación. Como control positivo de la activación de las CD, éstas fueron estimuladas con LPS.

CD40 es un receptor de superficie que pertenece a la familia de receptores de TNF- α . Se expresa en células B, CD, monocitos y células epiteliales. Su ligando CD154 es expresado principalmente en células T CD4⁺ (Banchereau *et al.*, 1994; Van Kooten *et al.*, 2000). La unión de CD40 con su ligando tiene importantes consecuencias en las CD como incremento en la sobrevivencia de las células, secreción de citocinas (IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α) y la producción de enzimas tales como matriz metaloproteinasas (MMP). Además, esta unión altera el fenotipo de las CD al aumentar la expresión de moléculas co-estimuladoras sobre la superficie de las células, tales como CD80 y CD86. De tal manera que la activación de CD40 es una de las señales críticas que permiten la completa maduración de las CD y, por lo tanto, da lugar a una CPA más potente, capaz de inducir la activación y proliferación de células T vírgenes (Banchereau and Steinman 1998; Van Kooten *et al.*, 2000).

En nuestro modelo, el porcentaje de expresión de CD40 en las CD estimuladas con RV incrementó significativamente con respecto a las células control. Inesperadamente, no se observó cambio en la IMF del mismo, lo que sugiere que el aumento en CD40 se debió a la contribución de la mayoría de las células en la población, es decir que aumentó el número de células que expresan este marcador y no el número de moléculas sobre la superficie de las células que ya lo expresaban de manera basal.

Cuando las células fueron estimuladas con LPS, se observó un incremento en la expresión de este marcador tanto en el número de células como en la IMF, lo que nos indica que las células pueden incrementar el número de moléculas CD40 dependiendo del estímulo antigénico que reciban. Este incremento de CD40 en las CD podría deberse a las proteínas estructurales de RV, como reportó Blutt, *et al* 2004, donde la proteína de la cápside externa VP7 indujo la activación de las células B al incrementar la expresión del marcador de activación temprana CD69 sobre la superficie de las células, como producto de la interacción de esta proteína viral con TLR4. Sin embargo, no se podía descartar la participación del genoma viral de RV en la activación observada, pues se ha demostrado que el RNAdc es el ligando de TLR3 presente en células de

sistema inmune innato incluyendo a las CD a través del cual se puede inducir la maduración de las mismas (Alexopoulou *et al.*, 2001; Muzio *et al.*, 2000). Así, para demostrar lo anterior las CD fueron estimuladas con pseudopartículas virales compuestas por las proteínas VP2/VP6/VP7 de rotavirus y con RNAdc viral purificado. Encontramos que de las CD estimuladas con las VLP's incrementaron el porcentaje de células que expresaban CD40 así como la IMF de la expresión del mismo con respecto a las células control. Para lo anterior, fue necesario emplear una concentración elevada de VLP's (30 µg/ml) en comparación con la concentración empleada de RV (1 µg/ml). Una posible explicación a esto podría ser lo reportado por Mena *et al* 2005, quienes demostraron que de la concentración de proteína de las VLP's conformadas por VP2/VP6 de rotavirus (generadas empleando una MDI similar a la que nosotros usamos para estos baculovirus), únicamente el 2.3 % correspondió a partículas ensambladas, por lo que probablemente para las VLP's conformados por VP2/VP6/VP7 el porcentaje de partículas haya sido menor. Es posible que la proteína no ensamblada provenga de la muestra original ó se haya generada durante el proceso de purificación o desalado. Es claro que las preparaciones de VLP's no son homogéneas, pudiendo estar presentes proteínas solubles, partículas de dos capas (VP2/VP6) y partículas conformadas por VP2/VP6/VP7. VP2 es capaz de autoensamblarse. VP6, necesita que VP2 ya esté conformada para su correcto ensamblaje, debido a que esta proteína presenta polimorfismos, formando estructuras como trímeros, esferas, cúmulos y agregados pequeños. En el caso de VP7 su correcta conformación es dependiente de calcio (Gilbert *et al.*, 2001; Mathieu *et al.*, 2001). Probablemente la activación observada se deba a la conformación estructural de las proteínas, que solo esté presente en las partículas ensambladas y por eso se requiera emplear una elevada concentración de VLP's para observar algún efecto. Esta idea se vió reforzada por el hecho de que cuando los ensayos de estimulación se realizaron empleando preparaciones virales hervidas (RV y VLP's), se observó una disminución en la expresión de CD40 lo cual indica que al menos en parte se requiere la conformación original de las proteínas. Lo mismo fue reportado por Blutt y cols (2004^a) para células B. Por otro lado, sería importante en futuros trabajos determinar la contribución de VP2, VP6 y VP7 en la estimulación de las CD, así como el probable TLR que podría estar participando en esta respuesta. Asimismo, ya que las VLP's empleadas carecían de VP4 no se puede descartar que esta proteína pudiese estar participando en la activación de las CD por RV. Existe evidencia de que VP8 (producto de la proteólisis de VP4) y VP4 activan NF-κB, a través de la interacción de estas proteínas, con

TRAFs celulares en la línea HEK-293 (LaMónica *et al.*, 2001). Debido a lo anterior sería importante generar VLPs completas compuestas por VP2/VP6/VP7/VP4 para llevar a cabo ensayos de estimulación de CD.

En cuanto al genoma viral de RV, no se observó cambio en la expresión de CD40 ni en la IMF en las CD estimuladas en comparación con las células control. Matsumoto y cols. (2003) demostraron que el RNAdc viral tiene un efecto sobre CD derivadas de monocitos humanos incrementando la IMF de la expresión de otros marcadores de activación CD86 y HLA-DR en la superficie de las células. Estos datos nos sugieren que el estudio de la activación de las CD en nuestro modelo requiere el análisis de otros marcadores de activación como CD86 donde los cambios bajo las mismas condiciones sean más evidentes.

En las CD de nuestro modelo, TLR3 se expresa de una manera suficiente para responder a Poly I:C, que es un polímero sintético análogo al RNAdc capaz de inducir activación a través del mismo receptor. Esta activación fue observada como un incremento en el porcentaje de CD que expresaban CD40 (13%) con respecto al nivel basal (4 %). Asimismo, cuando macrófagos derivados de MO de ratón fueron estimulados con el mismo stock de RNAdc se observó un marcado incremento en el porcentaje de células que expresaban este marcador (69 %) con respecto a las células sin estimular (12.6 %), así como la producción de óxido nítrico. (Resultados de este laboratorio, Denisse Rosales Martínez). Es probable que en el caso particular de las CD derivadas de MO, la expresión de TLR3 sea suficiente para responder a Poly I:C pero no al RNAdc viral. Es posible que en los macrófagos la expresión de este receptor sea mayor, lo que los haría más reactivos al genoma viral. Se propone en futuros experimentos determinar el nivel de expresión de TLR3 en cada población celular. Así también sería interesante determinar si en CD aisladas de placas de Peyer y LP intestinales se puede inducir activación por el RNAdc viral.

Con lo que respecta a la expresión de C80 y de MHC II, en nuestro modelo los niveles basales de estas moléculas en las CD fueron muy elevados y un estímulo posterior dado por RV ó inclusive LPS no indujo un marcado incremento en el porcentaje ni en la IMF de las células que expresaban estas moléculas.

Se ha demostrado que las CD obtenidas en cultivos *in vitro* en presencia de SFB (Suero fetal bovino) podrían capturar las proteínas del suero (antígenos xenogénicos), lo cual induciría su maduración incrementando moléculas como CD80, CD86 CD40 y MHC II y su capacidad para capturar, procesar y presentar antígenos a células T disminuiría. Asimismo, Wells *et al.*, (2005) demostraron que al generar CD de MO empleando medio definido X-vivo libre de suero se obtienen CD con niveles marcadamente menores de moléculas coestimuladoras y MHC II. Es interesante notar que en nuestro modelo, aunque las CD no son totalmente inmaduras, su estado de maduración no es final como podemos ver por los niveles basales de CD40 que son considerablemente bajos.

En el caso de CD80, en otros modelos virales se ha reportado que CD de ratones BALB/c originadas a partir MO a través del método de Lutz cultivadas en presencia de MMTV, incrementaron la IMF de la expresión de esta molécula (Burzyn *et al* 2004). Por otro lado, aunque en este trabajo no se analizó la expresión de CD86, se ha demostrado que RV (RRV) es capaz de inducir un ligero incremento del porcentaje de CD de humano derivadas de monocitos que expresan este marcador, así como la IMF del mismo (Narváez *et al.*, 2005). Lo mismo fue observado para CD83 que es un marcador de maduración presente en CD humanas, lo cual confirma nuestras observaciones, concluyendo que RV induce la maduración de las CD derivadas MO de ratón.

Por otro lado, con base en resultados obtenidos en nuestro laboratorio, donde se observó que CD CD11c⁺ de PP incrementaban ligeramente la expresión de IL-12 intracelular, medida a través de citofluorometría (estas células fueron aisladas de PP de ratones infectados con RV de cepa la EDIM a los dos días post-infección) (Tesis de Licenciatura; Mayte Cervantes Badillo, 2003), se analizó si RV era capaz de inducir la producción de esta citocina en las CD derivadas de MO. La importancia del estudio de esta citocina radica en que es representativa de respuestas generadas contra patógenos intracelulares (Trinchieri *et al.*, 2003). Se encontró que las células estimuladas con RV no indujeron el incremento de IL-12. No obstante, las CD de nuestro modelo tuvieron la capacidad de producirla cuando fueron estimuladas con LPS en presencia de INF- γ . La ausencia de producción de IL-12 por RV se podría deber a que, como se mencionó anteriormente, el estímulo de maduración producido por el mismo no es muy potente. Resultados similares fueron

reportados por Narváez *et al.*, 2005, pues observaron que las CD de humano inmaduras (no sometidas a algún estímulo) no fueron capaces de producir IL-12. Sin embargo CD maduras (estimuladas previamente con Poly I:C) estimuladas con RV (RRV) fueron capaces de producir pequeñas cantidades de esta citocina.

Como hemos mencionado con anterioridad, es evidente que RV tiene un efecto en la activación de las CD, y que en esta activación están participando en parte las proteínas virales sin embargo, no podíamos descartar que, al menos en parte, el efecto observado se debía a que RV se estuviera replicando en las CD. La infección viral implicaría que el RNAdc viral generado en el citoplasma de las CD podría activar a la molécula PKR e inducir efectos antivirales en las CD (Clemens 1996). La presencia del antígeno viral en un porcentaje mayor CD cultivadas en presencia de RV con respecto a las células cultivadas en presencia de VLP's, sugería que RV podría haberse replicado en las células. Para determinar si RV se replicaba dentro de las CD, estas fueron incubadas en presencia del virus, inmunomarcadas con un anticuerpo monoclonal (acoplado a un fluoróforo) específico para la proteína NSP3, que sólo está presente en células infectadas, y las células fueron analizadas en el microscopio de epifluorescencia. Sólo en un pequeño número de CD se detectó NSP3 y por lo tanto esas células se encontraban infectadas. Esto nos confirmó que RV era capaz de infectar a las CD, aunque de manera muy limitada. No es claro hasta que grado la infección encontrada pueda contribuir a la activación inducida por RV en CD. Esto se podría dilucidar utilizando RV inactivado con luz ultravioleta para bloquear su replicación sin alterar la estructura de sus proteínas.

Nuestras observaciones confirman lo reportado por Narváez *et al.*, (2005) quienes detectaron la presencia de la proteína de replicación viral NSP4 dentro de CD inmaduras, pero solo en un bajo porcentaje de ellas. Interesantemente, RV parece infectar preferencialmente a las CD maduras, es decir, sometidas a un estímulo que induzca maduración. Sin embargo, en contraste con las líneas celulares que se emplean para estudiar y cultivar a RV, éste no induce apoptosis ó muerte de las CD (Narváez *et al.*, 2005). De las integrinas que estan involucradas en la entrada del virus a las líneas celulares empleadas para estudiar a RV (Lopez and Arias 2004) solo $\alpha 4$ parece estar preferencialmente expresada en las CD maduras en comparación con las CD inmaduras (Puig-Kroger *et al.*, 2000, Graham *et al.*, 2005).

Debido a que RV infecta a las CD, el RNAdc generado en el citoplasma, podría estar activando la vía de respuestas antivirales de PKR (Vijay-Kumar *et al.*, 2005). A través de esta vía, se inhibiría la síntesis de proteínas tanto celulares como virales y se induciría la activación de NF- κ B, que podría estar participando junto con las proteínas virales en la activación de las CD. No obstante, existen reportes de que la proteína NSP3 de RV del grupo C, inhibe la activación de PKR en células epiteliales, lo cual podría favorecer la replicación viral (Langland *et al.*, 1994). Así que, sería interesante determinar si esta vía participa en la activación de las CD.

RV a través de sus proteínas es capaz de activar CD *in vitro* incrementando el porcentaje de expresión sólo de CD40, en esta activación, en nuestro modelo no participó el genoma viral, sin embargo, probablemente podría estar participando la infección de las CD por RV. *In vivo* las CD de LP probablemente serían de las primeras células que tendrían contacto con RV. El ambiente intestinal tolerogénico dado por los niveles elevados de TGF- β e IL-10, modularía la función de las CD y debido a que RV no representa un estímulo potente, probablemente la activación de las CD por RV podría verse favorecida por las citocinas liberadas por los enterocitos infectados y con ello se lograría una mejor capacidad para activar a las células T e inducir una respuesta adaptativa eficiente.

VIII. CONCLUSIONES

- Se implementó el sistema de generación de CD derivadas de MO de ratón para estudiar la interacción de RV con estas células.
- RV induce la activación de las CD de MO, lo cual fue determinado por el incremento en el número de células que expresan CD40 sobre su superficie.
- RV no incrementó la expresión de la molécula MHC II ni del co-estimulador CD80 sobre la superficie de las CD de MO.
- En la activación observada participan las proteínas estructurales de rotavirus, pero no el genoma viral.
- Las CD estimuladas con RV no produjeron IL-12.
- Un bajo número de CD inmaduras (no sometidas a un fuerte estímulo previo) son permisivas a la infección por RV. Probablemente este evento contribuya en parte en la activación de las CD.

IX. PERSPECTIVAS

- Generar CD de precursores de MO empleando medio definido X-vivo libre de suero con la finalidad de obtener CD con niveles de moléculas coestimuladoras y MHC II bajos.
- Medir la expresión de moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y MHC II en CD así generadas, estimuladas con RV y VLP's compuestos por las proteínas VP2/VP6/VP7 y VP2/VP6/VP7/VP4.
- Analizar si en la activación de las CD participa la interacción de VP7 con TLR4 como se propone sucede en células B.
- Medir la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80, CD86 y MHC II en CD estimuladas con RV inactivado con luz UV.
- Medir la expresión de moléculas co-estimuladoras CD40, CD80, CD86 y MHC II en CD cultivadas en presencia de SN obtenido de cultivos de segmentos de intestino de ratón infectado ó no con RV. Para de esta manera simular las condiciones del intestino.
- Determinar el porcentaje de CD inmaduras susceptibles a la infección por RV.
- Analizar si las CD maduras de ratón son preferencialmente susceptibles a la infección por RV como sucede con CD de humano derivadas de monocitos.
- Llevar a cabo ensayos de activación de células T antígeno específicas con las CD estimuladas con RV y determinar que citocinas producen.
- Realizar ensayos de transferencia de CD estimuladas con RV a ratones sanos y retarlos con RV para determinar si el estímulo dado por las CD es capaz de inducir protección.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Akira S, Takeda K, And Kaisho T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquire immunity. *Nature Immunology* 2(8): 675-680.

Akira S, Takeda K. 2004 Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *C R Biol. Jun*;32 (6):581-9.

Akira S. 2003. Mammalian Toll-like receptors. *Curreent Opinion in Immunol.* 15:5-11.

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature.* Oct 18;413(6857):732-8.

Arias CA y Lopez, S. 2000. Los rotavirus. (Ed.) Martinez E y Martinez JC (Ed.) *Microbios en linea.* Cap 17. CIFN. UNAM. México 1-16.

Bachmann MF, Oxenius A, Pircher H, Hengartner H, Ashton-Richardt PA, Tonegawa S, Zinkernagel RM. 1995. TAP1-independent loading of class I molecules by exogenous viral proteins. *Eur J Immunol.* Jun;25(6):1739-43.

Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi JP, van Kooten C, Liu YJ, Rousset F, Saeland S. 1994. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol.*12:881-922.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y, Pulendran B, Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunology.* 18:767-811.

Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* Mar 19;392(6673):245-52.

Bieback K, Lien E, Klagge I M, Avota E, Schneider-Schaulies J, Duprex W P, Wagner H, Kirschning C J, Ter Meulen V and Schneider-Schaulies S. 2002. Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates Toll-like receptor 2 signaling. *J. Virol.* 76: 8729-8736.

Bilsborough J, Viney JL. 2004. Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease. *Gastroenterology.* Jul;127(1):300-9.

Bishop RF., Davison GP, Holmes IH, and Ruck BJ., 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet.* 1281-1283.

Blutt S, Crawford S, Warfield K, Lewis D, Estes M and Conneer M. 2004^a. The VP7 outer capsid protein of rotavirus induces polyclonal B- cell activation. *J Virol.* Jul;78(13):6974-81.

Blutt S, Crawford S, Warfield K, Lewis D, Estes M and Conneer M. 2004^b. B cell activation by rotavirus requires TLR4 and VP7. 8TH International Symposium on Double-Stranded RNA viruses. II Ciocco Castevecchio Pascoli, Italy. P99.

Blutt S, Warfield KL, Lewis DE, and Conner ME. 2002. Early response to rotavirus infection involves massive B cell activation. *J Immunol.* 1;168(11):5716-21.

Boeheme K. and Compton T. 2004. Innate sensing of viruses by Toll-like receptors. *J Virol.* 78: 15. 7867-7863.

Boes M. 1998. A critical role of natural Immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *J. Exp. Med.* 188:3881-3886.

Bowie AG, Haga IR. 2005. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Mol Immunol.* May;42(8): 859-67. Epub. Jan 6.

Braine, Theresa. Rotavirus vaccine introduction in Mexico sets precedent. 2005. *Bull World Health Organ*, Mar. vol.83, no.3, p.167-167. ISSN 0042-9686.

Bridger, J, Pedley S and McCraes, M. 1986. Group C rotaviruses in humans. Agriculture and food research Council Institute for research on animal diseases. *J Clin Microbiol* 23: 760-763.

Brown, D, Beards G, Chen G, *et al.* 1987. Prevalence of antibodies to group B (atypical) rotavirus in human and animals. *J Clin Microbiol* 25:316-319.

Bruce M, Campbell I, Xiong Y, Redmon M, Snodgrass D. 1994. Recognition of rotavirus antigens by mouse L3T4-positive T helper cells. *J Gen Virol.* Aug. 75 (Pt 8):1859-66.

Buesa J, Raga J, Colomina J, Souza O, Munoz C, Gil M. 1999. Rotavirus-specific Cytotoxic T lymphocytes recognize overlapping epitopes in the amino-terminal region of the VP7 Glycoprotein. *Virology.* May 10;257(2):424-37.

Burns J, Siadat-Pajouh M, Krishanane A, Greenberg H. 1995. Protective effect of Rotavirus VP6-Specific Ig A monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science.* 272:104-107.

Burzyn D, Rassa J C, Kim D, Nepomnaschy I, Ross S, and Piazzon I. 2003. Toll like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by a retrovirus. *J Virol.* 78:2. 576-584.

Carbone F, Heath W. 2003. The role of dendritic cell subset in immunity to viruses. *Current Opinion in Immunol.* 15:416-420.

Cervantes B. Mayté. 2003. Análisis del perfil de citocinas expresadas por diferentes poblaciones celulares en órganos linfoides asociados a mucosa intestinal en ratones infectados con rotavirus. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Chan CW, Crafton E, Fan HN, Flook J, Yoshimura K, Skarica M, Brockstedt D, Dubensky TW, Stins MF, Lanier LL, Pardoll DM, Housseau F. 2006 Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med.* Feb;12(2):207-13. Epub. Jan 29.

Chemello ME, Aristimuno OC, Michelangeli F, Ruiz MC. 2002. Requirement for vacuolar H⁺ -ATPase activity and Ca²⁺ gradient during entry of rotavirus into MA104 cells. *J Virol.* Dec;76(24):13083-7.

Chirido FG, Millington OR, Beacock-Sharp H, Mowat AM. 2005. Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. *Eur J Immunol.* Jun;35(6):1831-40.

Clemens MJ. PKR--a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997 Jul;29(7):945-9.

Coligan J E, Kruisbeek A M, Margulies D H, Shevach E M, Strober W. 2003. *Current protocols in Immunology.* 2(S14): 10.23.3.

-
- Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW. 2003. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor. *J Virol.* Apr;77(8):4588-96.
- Cresswell P. 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12:259-293.
- Cuellar A, Fonseca A, Gomez A. 2004. Efecto del lipopolisacárido en cultivos de células dendríticas humanas y su inhibición por la polimixina B. *Biomédica.* 24: 413-22.
- Cunliffe N A, Bresee J S, Gentsch J R, Glass R I, Hart C A. 2002. The expanding diversity of rotaviruses. *The Lancet* 356. Feb 23.
- Dector MA, Romero P, Lopez S, Arias CF. 2002. Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO Rep.* Dec;3(12):1175-80. Epub 2002 Nov 21.
- Dharakul T, Rott L, Greenberg HB. 1990. Recovery from chronic rotavirus infection in mice with severe combined immunodeficiency: virus clearance mediated by adoptive transfer of immune CD8+ T lymphocytes. *J Virol.* Sep;64(9):4375-82.
- Esquivel FR, Lopez S, Gutierrez L, Arias C. 2000. The internal rotavirus protein VP6 primes for an enhanced neutralizing antibody responses. *Arch Virol.* 145(4): 813-25.
- Estes M K and Morris A P. 1999. A viral enterotoxin: A new mechanism of virus induced pathogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 473:73-82.
- Estes M. 1996. Rotaviruses and their replication. *Fields virology.* 1625-1655.
- Fagarasan S. and Honjo T. 2001. Intestinal IgA synthesis regulation of front-line body defenses. *Nature* 3:63-72.
- Finberg W and Kurt-Jones. 2004. Viruses and Toll-like receptors. *Microbes and infection* 6:1356-1360.
- Franco M and Greenberg H. 1995. Role of B cells and cytotoxic T lymphocytes in clearance of and immunity to rotavirus infection in mice. *J Virol.* 69:7800-06.
- Franco M and Greenberg H. 1997. Immunity to rotavirus in T cell deficient mice. *Virology.* 23 8(2):169-179.
- Franco MA, Feng N, Greenberg HB. 1996. Rotavirus immunity in the mouse. *Arch Virol Suppl.* 1996; 12 : 41-52.
- Franco M, Prieto I, Labbé M, Poncet D, Borrás-Cuestas F, Cohen J. 1993. An immunodominant cytotoxic T cell epitope on the VP7 rotavirus protein overlaps the H2 signal peptide. *J Gen Virol.* Dec;74 (Pt 12):2579-86.
- Franco MA, Greenberg HB. Immunity to rotavirus infection in mice. *J Infect Dis.* 1999 May;179 Suppl 3:S466-9.
- Gilbert JM, Feng N, Patton JT, Greenberg HB. 2001. Rotavirus assembly - interaction of surface protein VP7 with middle layer protein VP6. *Arch Virol.* 146 (6):1155-71.

Graham D Y, Sackman J W, and Estes M K. 1984. Pathogenesis of rotavirus-induced diarrhea: preliminary studies in miniature swine piglet. *Dig Dis Sci.* 29: 1028-1035.

Graham K L, Halasz P, Tan Y, Hewish M J, Takada Y, Mackow E R, Robinson M K, Coulson B S. 2003. Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry. *Journal of Virology.* 77.18:9969-78.

Graham KL, Fleming FE, Halasz P, Hewish MJ, Nagesha HS, Holmes IH, Takada Y, Coulson BS. 2005. Rotaviruses interact with alpha4beta7 and alpha4beta1 integrins by binding the same integrin domains as natural ligands. *J Gen Virol.* Dec;86(Pt 12):3397-408.

Gray J, Desselberg U. 2000. *Rotavirus. Methods and Protocols.* Human Press.

Guermonez P, Valladeau J, Zitvogel, L, Thery C, and Amigorena S. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 20:621-667.

Hart DN. 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood.* Nov 1;90(9):3245-87.

Hashimoto C, Hudson K L and Anderson K V. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorso-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell.* 52: 269-279.

Haynes L M, Moore D D, Kurt-Jones E A, Finberg R W, Anderson L J, and Tripp R A. 2001 Involvement of Toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol.* 75:22. 10730-10737.

Heath R and Villalobos A. 2005. No driving without a license. *Nature Publishing Group. News and Views.*

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.* Mar 5;303(5663):1526-9. Epub 2004 Feb 19.

Hung T, Chen G, Wang C. 1984. Waterborne outbreaks of rotavirus diarrhea in adults in China caused by a novel rotavirus. *Lancet.* I.1139-1142.

Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med.* Dec 1;176(6):1693-702.

Janssens S, Beyaert R. 2003. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev.* Oct;16(4):637-46.

Kaiserlian D, Bensussan N C, and Hosmalin A. 2005. The mucosal immune system: from control of inflammation to protection against infections. *Journal of Leucocyte Biology.* 78. 1-8.

Kapikian A, Hocino Y, Chanock RM. 2001. Rotaviruses. In: Knippe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology, Vol II.* Philadelphia: Lippincott William & Wilkins. pp. 1787-1834.

Kapikian AZ and Chanock. 1996. Rotaviruses. In: Fields., Knipe D. M. (Eds) *Virology.* Raven Press, New York. 1353-1373.

-
- Kappler J, White J, Wegmann D, Mustain E, Marrack P. 1982. Antigen presentation by Ia+ B cell hybridomas to H-2-restricted T cell hybridomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun;79(11):3604-7.
- Kapsenber L., 2003. Dendritic cell control of pathogen-driven T- cell polarization. *Nature Reviews Immunology*. 3,984-993.
- Kato T and Owen R L. 1999. Structure and function of intestinal Mucosal epithelium. Academic Press. 115-132.
- Krug A Luker G D, Barchet W, Leib D A, Akira S and Colonna M. 2004^b. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon- producing cells through toll –like receptors 9. *Blood*. 103: 1433-1437.
- Krug A, French AR, Barchet W, Fischer JA, Dzionek A, Pingel JT, Orihuela MM, Akira S, Yokoyama WM, Colonna M. 2004^a. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity*. Jul;21(1):107-19.
- Kunkel EJ and Butcher EC. 2003. Plasma Cell homing. *Nature* 3:822-829.
- Kurt-Jones E A, Popova L, Kwinn L, Haynes L M, Jones L P, Tripp R A, Walsh E E, Freeman M W, Golenbock D T, Anderson L J, and Finberg R W. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol*. !:5.398-401.
- Kushnir N, Bos N A, Zuercher a W, Coffin S E, Moser C A, and Cebra J J.2001. B2 but no B1cells can contribute to CD4⁺ T-cell-mediated clearance of rotavirus in SCID mice. *Journal of Virology*. 75:5482-90.
- LaMonica R, Kocer SS, Nazarova J, Dowling W, Geimonen E, Shaw RD, Mackow ER. 2001.VP4 differentially regulates TRAF2 signaling, disengaging JNK activation while directing NF-kappa B to effect rotavirus-specific cellular responses. *J Biol Chem*. 2001 Jun 8;276(23):19889-96.
- Langland JO, Pettiford S, Jiang B, Jacobs BL. 1994. Products of the porcine group C rotavirus NSP3 gene bind specifically to double-stranded RNA and inhibit activation of the interferon-induced protein kinase PKR. *J Virol*. 1994 Jun;68(6):3821-9.
- Lauw FN, Caffrey DR, Golenbock DT. 2005. Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol*. Oct;26(10):509-11.
- Lawton J, Estes M, Prasad B. 1997. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat. Struc. Biol*. 4:118-121.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J M, and Hoffmann J A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 86: 973-983.
- Lennon-Dumenil A M, Bakker A H, Maehr R, Fiebiger E, Overkleeft H S, Roseblatt M, Ploegh H L, Lagaudriere-Gesbert C. 2002. Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation. *J Exp Med*. 196:529-540.
- Levin J. 1987. The *Limulus* amebocyte lysate test: perspectives and problems. *Prog Clin Biol Res*. 231 :1-23.

-
- Litinski MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Casali P, Cerutti A. 2002. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through Blys and APRIL. *Nature Immunology*. 3(9):822-828.
- Lopez S. Arias C. 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol*. 12:271-8.
- Lund J M, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams N C, Gale N W Iwasaki A and Flavell R A. 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:5598-5603.
- Lundgren O, and Svensson L. 2001. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes Infect*. 3:1145-56.
- Lundgren O, Peregrin A T, Persson K, Kordasti S, Uhnöo I, Svensson L. 2000. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science*. 287: 491-95.
- Lutz M, Kukutsch N, Ogilvie A, Röβner S, Koch Franz, Nikolaus R, Schuler G. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunol Methods* 223: 77-92.
- Lycke N L. 2002. Mucosal lymphoid tissues. *Encyclopedia of life sciences*. MacMillan Publisher Ltd, Nature Publishing Group. 1-8.
- MacDonald T. 2003. The mucosal immune system. *Parasite Immunology*. 25, 235-246.
- Macpherson A and Lamarre A. 2002. BlySful interactions between DCs and B cells. *Nature Immunology*. Sep 9(3): 798-800.
- Malissen B, Shastri N, Pierres M, Hood L. 1986. Cotransfer of the Ed alpha and Ad beta genes into L cells results in the surface expression of a functional mixed-isotype Ia molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun;83(11):3958-62.
- Marks M S. 1998. Protein sorting within the MHC Class II. Antigen processing pathway. *Immunology Research*; 17/1&2:141-154.
- Martin P, Del Hoyo GM, Anjuere F, Arias CF, Vargas HH, Fernandez-L A, Parrillas V, Ardavin C. 2002. Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood*. Jul 15;100(2):383-90.
- Martínez del Hoyo G, Martin P, Vargas HH, Ruiz S, Arias CF, Ardavin C. 2002. Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature*. Feb 28;415(6875):1043-7.
- Mathieu M, Petitpas I, Navaza J, Lepault J, Kohli E, Pothier P, Prasad BV, Cohen J, Rey FA. 2001. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *EMBO J*. Apr 2;20(7):1485-97.
- Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T. 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol*. Sep 15;171(6):3154-62. Erratum in: *J Immunol*. 2003 Nov 1;171(9):4934.
- Mattion NM, Cohen J and Estes MK. 1994. The rotavirus proteins. *Virus infection of the intestinal track* (2^a edn). (Kapikian, AZ. Ed). Marcel Decker. 169-247.

-
- McGhee J R and Kimono H. 1999. The mucosal immune system. *Fundamental Immunology*. 909-994.
- McNeal M, Rae M and Ward R. 1997. Evidence that resolution of rotavirus infection in mice is due to both CD4 and CD8 cell-dependent activities. *J. Virol.* 71:8735-8742.
- McPherson AJ, Gatto D, Sansbury E, Harrinam, GR, Hengartner H and Zinkernagel, RM. 2000. A primitive T-cell independent mechanism of intestinal mucosal IgA response to commensal bacteria. *Science*. 288: 2222-2226.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P and Janeway C A Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptative immunity. *Nature* 388: 394-97.
- Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2001 Nov;1(2):135-45.
- Mellman I, Steinman M. 2001. Dendritic cells: Specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106:255-258.
- Mena JA, Ramirez OT, Palomares LA. Quantification of rotavirus-like particles by gel permeation chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005 Sep 25;824(1-2):267-76.
- Mendez E, Arias CF, Lopez S. 1993. Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *Journal of Virology*. 67.9:5253-9.
- Miyake K. 2004. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiology*. 12.4.186-192.
- Moron G, Rueda P, Casal I and Leclerc C. 2002. CD8 α^- , CD11b $^+$ dendritic cells present exogenous virus like particles to CD8 $^+$ T cells and subsequently express CD8 α and DEC-205 molecules. *J. Exp Med*. 1233-1245.
- Narvaez CF, Angel J, Franco MA. 2005. Interaction of rotavirus with human myeloid dendritic cells. *J Virol*. Dec;79(23):14526-35.
- Niedergang F, Didierlaurent A, Kraehenbuhl J, Sirard J. 2004. Dendritic Cells: the host Achille's heel for mucosal pathogens?. *Trends in Microbiology*. Vol. 2 No 2.
- O' Ryan L, Matson D, and Pickering L. 1991. In Spector S. (ed.) *Viral gastroenteritis. Manual of Virology*. W B Saunders.
- O'Sullivan B and Ranjery T. 2003. CD40 and Dendritic cell function. *Critical Reviews in Immunology*. 23(1-2):83-107.
- Offit PA, Coupar BE, Svoboda YM, Jenkins RJ, McCrae MA, Abraham A, Hill NL, Boyle DB, Andrew ME, Both GW. 1994. Induction of rotavirus-specific cytotoxic T lymphocytes by vaccinia virus recombinants expressing individual rotavirus genes. *Virology*. Jan;198(1):10-6.
- Oshiumi, H, Sacia M, Shida K, Fujita T, Matsumoto M, Seya T. 2003. TIR-containing Adapter Molecule (TICAM)-2 a bridging Adapter Recruiting to Toll Like Receptor 4 TICAM-1 That induces interferon- β . *J Bio Chem*. Dec 12;278(50): 49751-49762.
- Padilla-Noriega L, Mendez-Toss M, Menchaca G, Contreras JF, Romero-Guido P, Puerto FI, Guiscafre H,

Mota F, Herrera I, Cedillo R, Munoz O, Calva J, Guerrero ML, Coulson BS, Greenberg HB, Lopez S, Arias CF. 1998. Antigenic and genomic diversity of human rotavirus VP4 in two consecutive epidemic seasons in Mexico. *J Clin Microbiol.* Jun;36(6):1688-92.

Palomares L. 1999. Estudio del proceso de producción y ensamblaje de proteínas multiméricas a través del sistema células de insecto-baculovirus. Tesis de doctorado. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Palsson-McDermott E, and O'Neil L. 2004. Signal transduction by lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology.* 113. 153-162.

Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC. 1999. Lipopolysaccharide can block the potential of monocytes to differentiate into dendritic cells. *J Leukoc Biol.* Feb;65(2):232-40.

Parashar U D, Hummelman E G, Bresse J S, Millar M A, and Glass R I. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* 9.5: 565-72.

Pfeifer JD, Wick MJ, Roberts RL, Findlay K, Normark SJ, Harding CV. 1993. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature.* Jan 28;361(6410):359-62.

Philnott DJ, Giardin SE, and Sansonetti. 2001. Immune response of epithelial cells following infection with bacterial pathogens. *Curr Opin. Of immunology.* 13. 410-416.

Prasad BV, Wang, GJ, Clerx JP and Chiu W. 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Bio.* 199: 296-275.

Puig-Kroger A, Sanz-Rodriguez F, Longo N, Sanchez-Mateos P, Botella L, Teixido J, Bernabeu C, Corbi AL. 2000. Maturation-dependent expression and function of the CD49d integrin on monocyte-derived human dendritic cells. *J Immunol.* Oct 15;165(8):4338-45.

Pulendran B, Maraskovsky E, Banchereau J, Maliszewski C. 2001. Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends in Immunol.* 22:41-47.

Ramachandra L, Noss E, Bomm H and Harding C. 1999. Phagocytic processing of antigens for presentation by class II histocompatibility complex molecules. *Cellular Microbiology* 1 (3), 205-214.

Ramig RF. 2004. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol.* Oct;78(19):10213-20.

Raming R F. 2004. Patogénesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *Journal of virology.* 78.19: 10213-10220.

Rassa JC, Meyers JL, Zhang Y, Kudaravalli R and Ross SR. 2002. Murine retroviruses activate B cells via interaction with Toll-like receptor 4. *PNAS.* 99.2281-2286.

Rescigno M. 2002. Dendritic cells and the complexity of microbial infection. *Trends in Microbiology.* Vol 10 No 9. 425-431.

Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* Apr;2(4):361-7.

-
- Reis e Sousa C. 2004. Toll-like receptors and dendritic cells: for Whom the bug tolls. *Seminars in Immunology*. 16, 27-34.
- Rivest P, Proulx M, Lonergan G, Lebel M, and Bédard L. 2004. Hospitalisations for gastroenteritis: the role of rotavirus. *Vaccine* 22. 2013-2017.
- Roake J A, Rao A S, Morris P J, Larsen C P, Hankins D F and Austyn J M. 1995. Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J Exp Med*. 181, 2237-2247.
- Rodriguez A, Regnault A, Kleijmeer M, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. 1999. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol*. Oct;1(6):362-8.
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*. 1994 Jul 1;180(1):83-93.
- Rotta G, Edwards EW, Sangaletti S, Bennett C, Ronzoni S, Colombo MP, Steinman RM, Randolph GJ, Rescigno M. 2003. Lipopolysaccharide or whole bacteria block the conversion of inflammatory monocytes into dendritic cells in vivo. *J Exp Med*. Oct 20;198(8):1253-63.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. Apr 1;179(4):1109-18.
- Sanchez-San Martin C, Lopez T, Arias CF, Lopez S. 2004. Characterization of rotavirus cell entry. *J Virol*. Mar;78(5):2310-8.
- Sansonetti PJ. 2004. War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol*. Dec;4(12):953-64.
- Sharma R, Hudak MI, Premachandra B R. 2002. Clinical manifestation of rotavirus infection in the neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J*. 21: 1099-105.
- Shaw R D, Greenberg H B, Estes M K. 1999. Rotaviruses (*Reoviridae*). Acad. Press.
- Staats H F, Jackson RJ, Marinaro M, Takahashi I, Kimono H, McGhee J R. 1994. Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. *Curr Opin Immunol*. 6: 572-583.
- Steinman R M, and Cohn Z A. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-1162.
- Sutterwala F S, Noel G J, Clynes R, Mosser D M. 1997. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J Exp Med*. 185:1977-1985.
- Sutterwala F S, Noel G J, Salgame P, Mosser D M. 1998. Reversal of proinflammatory response by ligating the macrophage Fcγ receptor type I. *J Exp Med*. 188:217-222.
- Svensson M, Marsal J, Ericsson A, Camarramolino L, Broden T, Marquez G and Agace W. 2002. CCL25 Mediate the localization of recently activated CD8αβ⁺ lymphocytes to the small-intestinal mucosa. *J. Clin. Invest*. 110(8):1113-1121.

-
- Takeda K and Akira S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*. 17:1, 1-14.
- Taniguchi T and Tanaka N. 2002. The interferon α /beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr Opin Immunol*. 14: 111-116.
- Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL. 2000. Development of CD8 α -positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science*. Dec 15;290(5499):2152-4
- Trinchieri G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. Feb;3(2):133-46.
- Trombetta S E, Mellma I. 2005. Cell Biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol*. 23:975-1028.
- Tsubery H, Ofek I, Cohen S, Eisenstein M and Fridkin M. 2002. Modulation of the hydrophobic domain of Polymyxin B nonapeptide: Effect on outer-membrane permeabilization and lipopolysaccharide neutralization. *Molecular Pharmacology*. 62.5: 1036-1042.
- Underhill D M, Gantner B. 2004 Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailores immunity. *Microbes and Infection*. 6: 1368-1373.
- Underhill D M, Ozinsky A. 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev Immunol*. 20. 825-852.
- Vaidya S, and Cheng G. 2003. Toll-like receptors and innate antiviral responses. *Curr Opin Immunol*. 15:402-407.
- Valdespino JG, García MG, Del Río AZ, Giono SC, Salcedo RA and Sepúlveda JA. 1994. Epidemiología y etiología de diarreas infecciosas. El caso de México. *Rev. Lat-Amer. Microbiol*. 36, 307-324.
- Van Kooten C, Banchereau J. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*. Jan;67(1):2-17.
- Vancott J, McNeal M, Choi A and Ward R. 2003. The role of interferons in rotavirus infections and protection. *J. Interferon Cytokine Res*. 23,163-170.
- Velazquez FR, Garcia-Lozano H, Rodriguez E, Cervantes Y, Gomez A, Melo M, Anaya L, Ovalle JC, Torres J, Diaz De Jesus B, Alvarez-Lucas C, Breuer T, Munoz O, Kuri P. 2004. Diarrhea morbidity and mortality in Mexican children: impact of rotavirus disease. *Pediatr Infect Dis J*. Oct;23(10 Suppl):S149-55.
- Viau M and Zouali M. 2004. B-Lymphocytes, innate immunity and autoimmunity. *Clinical Immunology*. 114, 17-26.
- Vijay-Kumar M, Gentsch JR, Kaiser WJ, Borregaard N, Offermann MK, Neish AS, Gewirtz AT. 2005. Protein kinase R mediates intestinal epithelial gene remodeling in response to double-stranded RNA and live rotavirus. *J Immunol*. May 15;174(10):6322-31.
- Villadangos J A, Ploegh H L. 2000. Proteolysis in MHC class II antigen presentation: Who's in charge? *Immunity*. 12:233-239.

Vogel S, Fitzgerald K, and Matthew F. 2003. TLRs Diferencial adapter utilization by Toll-like receptors Mediates TLR-specific Patterns of gene expresión. *Molecular Interventions*. 3.8.466-477.

Ward RL, McNeal MM and Sheridan JF. 1990. Development of an adult mouse model for studies on protection against rotavirus *J. Virol.* 64, 5070-5075.

Ward RL. 1996. Mechanisms of protection against rotavirus in humans and mice. *J Infect Dis. Sep*;174 Suppl 1:S51-8.

Weissman, Travel et al., 2000. Developmente of CD8 α positive dendritic cells from a common myeloid progemitor *Science* 2152-2154.

Weistein E, Peeva E, Putterman C and Diamond B. 2004. B cell Biology. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 30,159-174.

Wells J W, Darling D, Farzaneh F, Galea-Lauri J. 2005. Influence of interleukin-4 on the phenotype and function of bone marrow-derived murine dendritic cells generated under serum-free conditions. *Scandinavian Journal of Immunology*. 61, 251-259.

Yamaguchi Y, Tsumura H, Miwa M, Inaba K. 1997. Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells*.15(2):144-53.

Youngman KR, Franco MA, Kuklin NA, Rott LS, Butcher EC and Greenberg HB. 2002. Correlation of the tissue distribution, developmental phenotype and intestinal homing receptor expression of antigen-specific B cells during the murine anti-rotavirus immune response. *J. Immunol.* Mar 1; 168(5): 2173-81.

Zal T, Volkman A, Stockinger B. 1994. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med.* Dec 1;180(6):2089-99.

Zhou H R, Yan D, Pestka JJ. 1997. Differential cytokine mRNA expreassion in mice after oral exposure to the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol): dose response and time course. *Toxicology and applied pharmacology*. 144:294-305.