



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

"PARTICIPACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DE PLACA DE PEYER INTESTINAL EN LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS EN UN MODELO MURINO"

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. DELIA VANESSA LÓPEZ GUERRERO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. FERNANDO R. ESQUIVEL GUADARRAMA**

**CUERNAVACA, MOR. 2010**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Inmunología Viral de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos bajo la dirección del Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama, contando con el financiamiento SEP-CONACYT (2003-C02-4282-Q) y PROMEP-PIFI (UAEMOR-CA-26), así como la beca para estudios de doctorado CONACYT No. 102187.

*Dedico el presente trabajo a:*

*Mi familia, en especial a mi esposo y compañero, el **Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez** por ser el impulso y la motivación para seguir adelante cada día, por ser mi fuente de inspiración, por darme esta hermosa familia y estos hijos maravillosos, por llenar de felicidad cada uno de los días que hemos estado juntos y sobre todo por el apoyo, la paciencia y el amor que siempre me ha demostrado.*

*A mis hijos, **Iván, Ian** y próximamente **Giancarlo**, por ser quienes son, por existir y por hacer que cada momento a su lado sea maravilloso y que cada meta alcanzada valga más la pena.*

*A mi **mamá**, por todo lo que me ha dado, por su apoyo incondicional que me ha llevado hasta donde estoy, por ser mi compañera y confidente. Gracias mamá.*

*A todas las personas que han creído en mí y me han apoyado en las buenas y en las malas, les doy las gracias por ser parte de esta aventura.*

## **AGRADECIMIENTOS.**

Quiero agradecer a mi director de tesis, el **Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama**, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo y por enseñarme lo emocionante del mundo de la Inmunología. Así mismo, quiero agradecer al Jurado evaluador conformado por el Dr. Eduardo García Zepeda, Dr. Ramón González García Conde, Dr. Gustavo Pedraza Alva y el Dr. José Luis Montiel Hernández, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y sus excelentes sugerencias.

Quiero agradecer también muy especialmente al **Dr. Leopoldo Flores Romo** por su participación en este proyecto, por adoptarme en su grupo de trabajo y por sus enseñanzas acerca de las células dendríticas.

Al **Dr. Ernesto Méndez Salinas** por sus sugerencias, consejos y amistad durante todo este tiempo.

Al **Dr. Vianney Ortíz Navarrete** por sus excelentes sugerencias y propuestas acerca del mejoramiento de este proyecto.

A la **Dra. Selene Meza Pérez** por su disposición y ayuda en la realización de este proyecto, por su entusiasmo y por su amistad.

A la **M.C. Juana Calderón Amador**, por su apoyo y disposición en toda la parte de histología

A la **M.V.Z. Elizabeth Mata Moreno** por su colaboración y apoyo en la disponibilidad de los animales utilizados en este proyecto.

A los miembros del **Cuerpo Académico “Regulación de la respuesta inmune en infección y autoinmunidad”** de la UAEM, por todas las buenas discusiones y sugerencias a este proyecto.

Al **Dr. Carlos Arias Ortíz** y a la **Dra. Susana López Charretón**, por el apoyo brindado para la realización de este proyecto y por enseñarme el fascinante mundo de los rotavirus.

***Muchas gracias.***

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Generalidades del sistema inmune.....	1
1.2 Sistema inmune innato.....	2
1.2.1 Células presentadoras de antígeno.....	3
1.2.1.1 <i>Procesamiento y presentación de antígeno.</i>	5
1.2.1.2 <i>Células B como CPAs.....</i>	9
1.2.1.3 <i>Macrófagos.....</i>	10
1.2.1.4 <i>Células dendríticas.....</i>	11
1.2.1.4.1 <i>Sistema de reconocimiento de las DCs...</i>	14
1.2.1.4.2 <i>Receptores tipo Toll (TLRs).....</i>	15
1.2.2 Principales subpoblaciones de células dendríticas.	17
1.2.3 Células dendríticas plasmacitoides.....	20
1.2.3.1 <i>Producción de IFN-I.....</i>	21
1.2.4 DCs en infecciones virales.....	22
1.3 Sistema inmune de mucosas.....	26
1.3.1 Inmunidad de la mucosa intestinal.....	28
1.3.1.1 <i>Ganglio linfático mesentérico.....</i>	29
1.3.1.2 <i>Placas de Peyer.....</i>	31
1.3.1.3 <i>Criptoplasmas y folículos linfoides aislados...</i>	33
1.3.1.4 <i>Linfocitos intraepiteliales.....</i>	35
1.3.1.5 <i>Células dendríticas intestinales.....</i>	35

<b>1.4 Rotavirus.....</b>	<b>39</b>
<b>1.4.1 Estructura y clasificación de los rotavirus.....</b>	<b>40</b>
<b>1.4.2 Ciclo de replicación de los rotavirus.....</b>	<b>41</b>
<b>1.4.3. Modelo murino de infección por rotavirus.....</b>	<b>46</b>
<b>1.4.4 Respuesta inmune contra la infección por rotavirus....</b>	<b>47</b>
<b><i>1.4.4.1 Inmunidad adaptativa en la infección por</i></b>	
<b><i>rotavirus.....</i></b>	<b>47</b>
<b><i>1.4.4.2 Inmunidad innata en la infección por</i></b>	
<b><i>rotavirus.....</i></b>	<b>49</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>52</b>
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>54</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1 Objetivos particulares.....</b>	<b>55</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
<b>5.1 Animales.....</b>	<b>57</b>
<b>5.2 Virus.....</b>	<b>57</b>
<b>5.3 Inactivación del virus.....</b>	<b>57</b>
<b>5.4 Titulación de rotavirus EDIM <i>in vitro</i> en células MA104.....</b>	<b>58</b>
<b>5.5 Infección de ratones con rotavirus y detección de la</b>	
<b>replicación viral.....</b>	<b>59</b>
<b>5.6 Ensayo de detección de IgAs intestinales específicas</b>	
<b>contra rotavirus en heces de ratones infectados.....</b>	<b>60</b>
<b>5.7 Cortes histológicos de PP e intestino delgado de la región</b>	
<b>del yeyuno.....</b>	<b>60</b>
<b>5.8 Inmunohistoquímica.....</b>	<b>61</b>
<b>5.9 Inmunofluorescencia.....</b>	<b>62</b>

5.10 Obtención de células a partir de PPs.....	62
5.11 Enriquecimiento de DCs por gradiente de flotación utilizando OptiPrep.....	63
5.12 Purificación de DCs por el método de MACS.....	63
5.13 Citofluorometría.....	64
5.14 Tinción de citocinas intracelulares.....	65
5.15 Análisis de la expresión de ARN mensajero para diferentes citocinas en DCs de PPs.....	66
5.16 PCR convencional.....	66
5.17 PCR tiempo real.....	66
5.18 Análisis estadístico.....	67
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>
6.1 Estandarización del modelo de infección de ratón adulto con rotavirus murino silvestre de la cepa EDIM.....	68
6.2 Análisis de las células totales de las PPs de ratones infectados con rotavirus durante las primeras 48 horas p.i.....	70
6.3 Análisis de la distribución in situ de las DCs de las PPs de la región del yeyuno durante las primeras 48 horas p.i.....	78
6.4 Análisis del estado de activación y producción de citocinas de las DCs de las PPs como consecuencia de la infección por rotavirus a las 48 horas p.i.....	88
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>95</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>108</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>109</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>111</b>



<b>11. APÉNDICE.....</b>	<b>118</b>
<b>11.1 Resultados obtenidos del gradiente de Optiprep para el enriquecimiento de las DCs de las PPs.....</b>	<b>118</b>
<b>11.2 Caracterización de las DCs obtenidas de las PPs de la región del yeyuno mediante el método de MACS.....</b>	<b>120</b>
<b>11.3 Publicaciones.....</b>	<b>122</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Principales vías de señalización descritas para los TLRs murinos y sus principales ligandos.....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 2. Diferentes vías de señalización para la producción de IFN-I por las DCs y pDCs.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 3. Estructura básica de una PP murina.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 4. Organización de los órganos y células linfoides de la mucosa intestinal.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 5. Reconstrucción a partir de la criomicroscopía electrónica de rotavirus.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 6. Entrada y del ciclo replicativo de rotavirus descrito en células in vitro MA104.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 7. Curva de excreción de antígeno viral y de producción de IgAs intestinales específicas contra rotavirus en el modelo murino de infección por el rotavirus silvestre de la cepa EDIM.....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 8. Número absoluto de células totales en las PPs durante las Primeras 48 horas p.i. por región anatómica intestinal.....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 9. Porcentaje de células positivas para los marcadores de activación en las PPs.....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 10. Número absoluto de células activadas en las PPs durante las 48 horas p.i. por región anatómica.....</b>	<b>75</b>

<b>Figura 11. Poblaciones de células linfoides presentes en las PPs del yeyuno durante las primeras 48 horas p.i.....</b>	<b>76</b>
<b>Figura 12. Producción de las citocinas IL-10 e IL-12 en células totales provenientes de las PPs de ratones infectados a las 48 horas p.i...</b>	<b>78</b>
<b>Figura 13. Migración de las DCs hacia el domo de las PPs del yeyuno durante las primeras 48 horas de infección.....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 14. Aumento del receptor CCR6 sobre la población CD11c<sup>+</sup> enriquecida mediante el gradiente de OptiPrep proveniente de PPs de ratones control e infectados con rotavirus silvestre a las 48 horas p.i., expresada como IMF.....</b>	<b>82</b>
<b>Figura 15. Distribución de las DCs en las PPs de ratones inoculados con rotavirus silvestre y tratado con luz U.V. y psoraleno a las 48 horas p.i. ....</b>	<b>84</b>
<b>Figura 16. Detección de antígeno viral de rotavirus en las PPs y vellosidades del yeyuno durante las primeras 48 horas p.i.....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 17. Distribución de células CD11c<sup>+</sup> y CD11b<sup>+</sup> en PPs y vellosidades del yeyuno en ratones sin infectar e infectados con rotavirus silvestre a las 48 horas p.i.....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 18. Aumento de las moléculas coestimuladoras sobre la superficie de las DCs de las PPs enriquecidas mediante el gradiente de flotación utilizando medio OptiPrep a las 24 y 48 horas p.i.....</b>	<b>89</b>

<b>Figura 19. Cantidad de moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 sobre la población de las DCs de las PPs de ratones inoculados con el virus tratado con luz U.V., a las 48 horas p.i. expresada como IMF.....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 20. Cantidad de moléculas coestimuladoras sobre las células B220+ de las PPs de la región del yeyuno a las 0, 24 y 48 horas p.i. y a las 0, 24, y 48 horas post-inoculación del virus tratado con luz U.V. expresada como IMF.....</b>	<b>92</b>
<b>Figura 21. Análisis por PCR y PCR tiempo real de los ARN mensajeros de citocinas en DCs purificadas a partir de las PPs de ratones infectados a las 48 horas p.i.....</b>	<b>94</b>
<b>Figura 22. Modelo propuesto del reconocimiento de los elementos de rotavirus por las DCs de las PPs.....</b>	<b>106</b>
<b>Figura 23. Gradiente de enriquecimiento de la población CD11c<sup>+</sup> proveniente de las PPs de la región del yeyuno.....</b>	<b>119</b>
<b>Figura 24. Rendimiento de la purificación por selección positiva de las células CD11c<sup>+</sup> utilizando el método de MACS.....</b>	<b>121</b>

## ABREVIATURAS

**ADN**, ácido desoxirribonucleíco.

**ADNc**, ácido desoxirribonucleíco complementario.

**APRIL**, ligando inductor de proliferación (del inglés: a proliferation-inducing ligand).

**ARN**, ácido ribonucleíco.

**ARNdc**, ácido ribonucleíco de doble cadena.

**ARNm**, ácido ribonucleíco mensajero.

**ARNcs**, ácido ribonucleíco de cadena sencilla.

**AS**, ácido siálico.

**AzNa**, azida de sódio.

**BAFF-R**, receptor para el factor de activación de las células B.

**BALT**, tejido linfoide asociado a la mucosa bronquial (del inglés: bronchus-associated lymphoid tissue).

**BCMA**, antígeno de maduración de las células B.

**BCR**, receptor célula B.

**BLyS**, estimulador de las células B.

**CC**, quimiocina tipo CC.

**CCL**, ligando quimiocina tipo CC.

**CCR**, receptor para quimiocinas tipo CC.

**CP**, criptoplasmas.

**CPA**, célula presentadora de antígeno.

**DC**, célula dendrítica.

**DLP**, partículas de doble capa, (del inglés: Double layer particles).

**DS**, desviación estándar.

**EC**, EDIM-Cambridge.

**EDIM**, diarrea epizoótica de ratón neonato, (del inglés: Epizootic diarrhea of infant mice).

**ES**, error estándar.

**FAE**, epitelio asociado al folículo.

**FDA**, Food and Drug Administration.

**FLA**, folículos linfoides aislados.

**Fit3**, FMS-tipo tirosina-cinasa 3, (del inglés: FMS-like tyrosine kinase 3).

**GALT**, tejido linfóide asociado a intestino, (del inglés: gut-associated lymphoid tissues).

**GLM**, ganglio linfático mesenterico.

**HEV**, vénulas altas endoteliales, (del inglés: high endothelial venules).

**LIE**, linfocitos intraepiteliales.

**Ig**, inmunoglobulina.

**IL**, interleucina.

**IMF**, intensidad media de fluorescencia.

**IFN- $\alpha$** , interferón alfa.

**IFN- $\beta$** , interferón beta.

**IFN-I**, interferón tipo I.

**IRAP**, aminopeptidasa regulada por insulina (del inglés: Insulin-responsive aminopeptidase protein).

**IRF**, factor regulador de interferón.

**KO**, knock out.

**LP**, *lamina propria*.

**LPS**, lipopolisacárido.

**LTi**, célula inductora de tejido linfóide.

**MAD-5**, gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma, (del inglés: melanoma-differentiation-associated gene 5).

**MALT**, tejido linfóide asociado a mucosas (del inglés: mucosa-associated lymphoid tissues).

**MHC**, complejo mayor de histocompatibilidad.

**MHC I**, complejo mayor de histocompatibilidad clase I.

**MHC II**, complejo mayor de histocompatibilidad clase II.

**MyD88**, proteína de respuesta primaria para diferenciación mielóide 88.

**NA**, neuraminidasa.

**NALT**, tejido linfóide asociado a la mucosa nasal, (del inglés: nasal-associated lymphoid tissues).

**NK**, células asesinas naturales, (del inglés: natural killer).

**NLR**, receptores tipo NOD (del inglés: NOD-like receptors).

**NO**, óxido nítrico.

**NOD**, dominio de oligomerización unido a nucleotidos (del inglés: Nucleotid-binding oligomerization domain protein).

**NSP**, proteínas no estructurales, (del inglés: Non-structural proteins).

**PAMPs**, patrones moleculares asociados a patógenos, (del inglés: Pathogens-associated molecular patterns).

**pDC**, célula dendrítica plasmacitoide.

**PP**, placa de Peyer.

**PRR**, receptores de reconocimiento de patrones (del inglés: Patterns recognition receptors).

**RE**, retículo endoplásmico.

**RIG-1**, proteína 1 inducida por ácido retinoico, (del inglés: retinoid-inducible gene 1).

**ROR $\gamma$** , receptor huérfano para retinol gamma (del inglés: retinoid-related orphan receptor gamma).

**SCID**, inmunodeficiencia severa combinada (del inglés: severe combined immunodeficiency).

**SED**, domo sub-epitelial, (del inglés; sub-epithelial dome).

**SFB**, suero fetal bovino.

**STAT**, proteína señalizadora de transcripción, activación y traducción de señales, (del inglés: signal transducers and activators of transcription protein)

**TA**, temperatura ambiente.

**TAP**, proteína asociada al transporte (del inglés: transporter associated with antigen processing).

**Tc**, célula T citotóxica.

**TCR**, receptor de la célula T.

**TD**, timo-dependiente.

**TGF- $\beta$** , factor de crecimiento transformante beta, (del inglés: transforming growth factor beta).

**Th**, célula T cooperadora.

**TI**, timo-independiente.

**TLP**, partícula de triple capa, (del inglés: Triple layer particles).

**TLR**, receptores tipo toll, (del inglés: Toll-like receptors).

**TNF- $\alpha$** , factor de necrosis tumoral alfa (del inglés: Tumoral necrosis factor alpha).

**Treg**, células T reguladoras.

**TRIF**, adaptador que induce IFN- $\beta$  que contiene un dominio TIR, (del inglés; TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ).

**VLP**, pseudopartículas virales, (del inglés: viral like particles).

**VP**, proteína viral, (del inglés: viral protein).



## RESUMEN.

En el presente trabajo, se utilizó el modelo murino de infección por rotavirus usando la cepa murina silvestre EDIM, ésto con la finalidad de analizar *in vivo* la participación de las células dendríticas (DCs) de las Placas de Peyer (PPs) durante las primeras 48 horas p.i. (post-infección). Posterior a la infección, evaluamos de manera general, el porcentaje y el número absoluto para diferentes poblaciones de células presentadora de antígeno (CPAs) en la PPs, encontrando que no hay cambios significativos en el porcentaje de las poblaciones de las CPAs, pero sí un aumento significativo en el número absoluto, principalmente en las células B, los macrófagos y las DCs, siendo más evidente a las 48 horas p.i. en las células de las PPs de la región del yeyuno. Así mismo, se observó un aumento significativo en el número absoluto de células positivas para los marcadores de activación CD40, CD80 y CD86. Se observó una redistribución de DCs hacia la región del domo subepitelial (SED) de las PPs, coincidiendo con un aumento en el número de moléculas coestimuladoras sobre su superficie dada por la intensidad media de fluorescencia (IMF) a las 48 horas p.i. Tanto la migración como la activación observadas sobre las DCs de las PPs, fueron dependientes del tiempo de infección y de la replicación viral. Al analizar la producción de citocinas en las DCs de las PPs, se encontró un aumento significativo en la síntesis de los ARNm para las citocinas pro-inflamatorias IFN- $\beta$ , IL-12/IL-23p40 y TNF- $\alpha$ , y de la citocina reguladora IL-10. Estos resultados sugieren que, en las primeras etapas de la infección, las DCs de las PPs juegan un papel crítico en el control de la infección y al mismo tiempo participan en la regulación de una respuesta inflamatoria excesiva.

## ABSTRACT.

This study used an *in vivo* mouse model to analyze the response of dendritic cells (DCs) in Peyer's patches (PPs) within the first 48 h of infection with the wild-type murine rotavirus EDIM (EDIMwt). After the infection, the absolute number of total cells was increased, without a modification of their relative percentage of the total cell number. This increase was mainly in the B cells, macrophages and DCs populations. Also, the absolute number of total cells for CD40, CD80 and CD86 markers was increased at 48 h postinfection (p.i). more evident in the cells from jejunum PP's. The DCs from PPs of infected mice showed a time-dependent migration to the subepithelial dome (SED) and an increase of the surface activation markers CD40, CD80, and CD86. This response was more evident at 48 h p.i. and depended on viral replication, since DCs from PPs of mice inoculated with UV-treated virus did not show this phenotype. As a result of the activation, the DCs showed an increase in the expression of mRNA for the proinflammatory cytokines interleukin-12/23p40 (IL-12/23p40), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), and beta interferon (IFN- $\beta$ ), as well as for the regulatory cytokine IL-10. These results suggest that, a short time after rotavirus infection, the DCs from PPs play a critical role in controlling the infection and, at the same time, avoiding an excessive inflammatory immune response.

# 1. INTRODUCCIÓN.

## 1.1 Generalidades del sistema inmune.

Los seres vivos se encuentran constantemente asediados por agentes patógenos que incluyen bacterias, hongos, parásitos y virus, organismos causantes de enfermedades que ponen en peligro la vida (Mowat 2003), sin embargo, los animales vertebrados, particularmente los mamíferos, presentan estrategias altamente eficaces para sobrevivir a estos ataques y protegerse de futuras reinfecciones. Estos mecanismos de defensa, los lleva a cabo el sistema inmune, el cual es altamente complejo y se encuentra conformado por órganos, tejidos, células y moléculas que interactúan con la finalidad de salvaguardar la vida del individuo.

Las tres principales funciones del sistema inmune de los mamíferos son: a) la respuesta de defensa, que protege al organismo de procesos infecciosos; b) el mantenimiento de la homeostasis, eliminando desechos celulares y tisulares y c) la vigilancia, que consiste en la eliminación de las células anormales del organismo originadas ya sea por procesos cancerosos o infecciosos. Todos estos mecanismos actúan de manera conjunta e interdependiente para mantener las condiciones óptimas para la vida del organismo.

El sistema inmune se encuentra dividido en dos tipos de respuestas con base a sus características funcionales, a las células que participan en cada una y al tiempo que requieren para activarse. El primer tipo se denomina respuesta inmune innata y es la encargada de generar las respuestas inmediatas al primer contacto con cualquier agente extraño. El segundo tipo es la respuesta inmune adquirida o adaptativa, la cual genera respuestas del tipo antígeno-específicas en un lapso mayor de tiempo y depende de la interacción de las células y elementos de la respuesta inmune innata con las principales poblaciones de células efectoras antígeno-específicas, las células T y las células B. Esta intercomunicación celular

es a través de las CPAs, particularmente a través de las DCs (Stagg and Knight 2001), células de la respuesta inmune innata especializadas en el reconocimiento, procesamiento y presentación de los antígenos a las células T (Steinman and Hemmi 2006, Rescigno, Rotta et al. 2001). Además las DCs participan en la activación y maduración de las células B mediante la secreción de factores de diferenciación que promueven la activación y maduración de éstas células a células plasmáticas productoras de anticuerpos (Steinman 2003; Rodríguez-Pinto 2005).

En conclusión, las interacciones entre los elementos de la respuesta inmune innata y los de la respuesta inmune adquirida son indispensables para salvaguardar la vida, ya que gracias a este complejo sistema de defensa, el individuo se mantiene protegido de los constantes ataques de microorganismos patógenos y en armonía con los antígenos inocuos. Cuando alguna de éstas respuestas falla, o la comunicación entre ambas es deficiente, el individuo se vuelve altamente vulnerable a sufrir un daño potencialmente letal por parte de los organismos patógenos.

## **1.2 Sistema inmune innato**

El sistema inmune innato es el más conservado en la mayoría de los seres vivos y sus mecanismos de reconocimiento son más generales que los del sistema inmune adquirido. Este sistema constituye la primera línea de defensa contra los antígenos provenientes del medio ambiente. Consta de barreras físicas como los epitelios y de barreras químicas como la secreción de moco en las vías aéreas, intestinales y reproductivas, la producción de ácido en el estómago, secreción de péptidos antimicrobianos, etc. Por otra parte, el sistema inmune innato cuenta con poblaciones celulares como los macrófagos, las células asesinas naturales (NK), basófilos, eosinófilos y neutrófilos, encargadas de la eliminación de restos celulares y agentes extraños al organismo (Mushegian and Medzhitov 2001) las cuales actúan de manera inmediata ante el agente agresor sin necesidad de

exposiciones previas, sin embargo, sólo confieren una protección de corta duración y no generan memoria inmunológica. Una característica importante de este sistema es que a pesar de ser relativamente poco específico, es capaz de mantener el equilibrio entre la tolerancia hacia los antígenos inocuos y la respuesta hacia los antígenos nocivos, esta característica se establece a través de las CPAs, particularmente por las DCs, células que pueden diferenciar entre los antígenos inofensivos de los potencialmente peligrosos (Stagg and Knight 2001). Los mecanismos de reconocimiento de las células del sistema inmune innato incluyen a una serie de receptores presentes principalmente sobre las células epiteliales y las CPAs capaces de reconocer patrones moleculares distribuidos en la mayoría de los patógenos denominados PAMPs (del inglés: pathogen associated molecular patterns) (Iwasaki and Medzhitov 2004). Estas moléculas incluyen al lipopolisacárido (LPS) presente en las bacterias Gram negativas y al ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc) presente en algunos tipos de virus (ej. rotavirus). El reconocimiento de los PAMPs por parte de las células del sistema inmune innato se lleva a cabo sin requerir de un contacto previo con el antígeno, y en la mayoría de los casos, culminan con la eliminación del patógeno pero sin la generación de memoria inmunológica, por lo que el organismo permanece vulnerable a un segundo ataque del mismo patógeno (Janeway and Medzhitov 2002). A pesar de la efectividad del sistema inmune innato, en algunas ocasiones éste puede ser evadido por los patógenos logrando infectar al individuo y es en este momento, donde la participación de las células del sistema inmune adquirido suele ser indispensable para la eliminación del patógeno, lo que conlleva a la generación de la memoria inmunológica que protegerá al individuo de futuros encuentros con el mismo patógeno (Medzhitov and Janeway 1999).

### **1.2.1 Células presentadoras de antígeno.**

El procesamiento y presentación de antígeno a las células T, consta de una serie de eventos mediante los cuales una proteína es degradada y cortada en pequeños péptidos que posteriormente se asocian a las moléculas del MHC para ser

expuestos sobre la superficie celular. El procesamiento y la presentación de antígenos posee dos principales vías con funciones inmunológicas diferentes: la presentación en el contexto del MHC I, llevada a cabo por todas las células nucleadas, que permite evaluar el estado en que se encuentra la célula, y la presentación en el contexto del MHC II cuya función es activar a las células del sistema inmune adquirido, particularmente a las células Th, proceso que sólo puede ser llevado a cabo por las CPAs, ambas vías se describirán más adelante.

Dentro de las CPAs se consideran las células B, los macrófagos y las DCs, estas últimas destacando por sus propiedades de iniciadoras y moduladoras de la respuesta inmune (Stagg and Knight 2001; Steinman, Hawiger et al. 2003; Rodríguez-Pinto 2005). Estas poblaciones además de poseer la maquinaria necesaria para la presentación de antígenos en el contexto del MHC II, tienen otras características que les permiten interactuar de manera más íntima con las células T, ya que el reconocimiento de los antígenos en asociación con las moléculas del MHC por el TCR de las células T aunado a la unión de sus coreceptores CD8 y CD4 a las moléculas MHC I y MHC II respectivamente, no son suficientes para montar una respuesta inmune. Para que la interacción con las células T conlleve a una activación, se requiere de la unión de moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86, expresadas sobre la superficie de las CPAs con sus ligandos CD40L (CD40 ligando) y CD28 expresados en las células T. Esta interacción desencadena una serie de cambios en las células T provocando su activación, iniciando la diferenciación hacia células efectoras, y por ende a la producción de citocinas, factores importantes en el desarrollo de la respuesta inmune (Sansom, Manzotti et al. 2003; Trombetta and Mellman 2005).

Estructuralmente, las moléculas del MHC son moléculas altamente polimórficas y la mayoría de éstas se encuentran codificadas en distintos genes distribuidos a lo largo del cromosoma 6 en el caso del humano y en el cromosoma 17 en el caso del ratón. De acuerdo a sus funciones y al tipo de antígeno que asocian las moléculas del MHC se agrupan en tres diferentes clases, el MHC clase I, II y III. A

continuación se describirá brevemente la estructura de las moléculas del MHC I y II, las cuales son reconocidas por los receptores de las células Tc (CD8<sup>+</sup>) y Th (CD4<sup>+</sup>) respectivamente. Las moléculas del MHC III son compuestos solubles que se encuentran involucrados en procesos inflamatorios y no directamente en la presentación de antígeno.

El MHC I se encuentra constituido por una larga cadena  $\alpha$  de aproximadamente 45 kDa con tres dominios ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , y  $\alpha 3$ ) y una molécula denominada  $\beta 2$ -microglobulina de 12 kDa la cual se asocia de manera no covalente con la cadena  $\alpha$  a través del dominio  $\alpha 3$ . La asociación entre la cadena  $\alpha$  y la  $\beta 2$ -microglobulina es necesaria para la exportación de este complejo a la superficie celular. El complejo del MHC II, se encuentra constituido por dos diferentes cadenas polipeptídicas, una cadena  $\alpha$  de 33 kDa y una cadena  $\beta$  de 28 kDa, las cuales se asocian de manera no covalente. Cada cadena del MHC II posee dos dominios externos  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , para la cadena  $\alpha$  y  $\beta 1$  y  $\beta 2$  en la cadena  $\beta$ . Al igual que las moléculas del MHC I, las moléculas del MHC II son glicoproteínas transmembranales que poseen un dominio externo, un segmento transmembranal y un ancla citoplasmática. El tipo de péptidos que puede asociarse a cada MHC, depende del origen y de la vía de degradación de las proteínas. Las principales vías de procesamiento y presentación de antígeno se describirán a continuación.

### ***1.2.1.1 Procesamiento y presentación de antígeno***

Existen diferentes vías para el procesamiento y presentación de antígeno; las vías clásicas y la vía no clásica. La vía no clásica comprende la presentación de antígenos no proteícos en donde participan la familia de moléculas CD1 (Sugita, Grant et al. 1999; Odyniec, Barral et al.). Los antígenos presentados sobre las moléculas CD1 son principalmente de naturaleza lipídica y se ha reportado que estos antígenos son reconocidos por una población especial de linfocitos denominados como T $\gamma\delta$  (Cui, Kang et al. 2009). Dentro de las vías clásicas se encuentran: la vía endógena y la vía exógena, o también denominadas como

procesamiento y presentación de antígenos en el contexto del MHC I y en el contexto del MHC II, respectivamente. La vía de procesamiento y presentación de antígeno depende del lugar en donde se sintetizó el antígeno procesado y de la célula que presenta el antígeno. Ambas vías son necesarias para el desarrollo de la respuesta inmune antígeno-específica (Trombetta and Mellman 2005).

**a) La vía endógena de procesamiento y presentación de antígeno o presentación en el contexto del MHC I.**

La vía endógena procesa los antígenos sintetizados dentro de las células. Esta vía se lleva a cabo en todas las células nucleadas del organismo y tiene como finalidad el degradar proteínas propias, presentándolas en la superficie como un mecanismo de vigilancia que permite al sistema inmune evaluar el estado general de la célula, y ante cualquier péptido extraño o anormal expuesto sobre la superficie, iniciar la eliminación de la célula. Los antígenos presentados por esta vía pueden ser propios o bien provenir de la síntesis proteica de patógenos intracelulares (ej. Infecciones virales). Los péptidos presentados bajo este contexto, son generados por degradación enzimática dentro del proteosoma en el citoplasma de la célula y constan de aproximadamente 8 a 9 aminoácidos que son translocados al lumen del retículo endoplásmico (RE) por las moléculas transportadoras TAP (del inglés: transporter associated with antigen processing) 1 y 2. En el RE las moléculas del MHC I son ensambladas y cargadas con los péptidos generados en el proteosoma y posteriormente exportadas a la superficie celular en vesículas exocíticas.

Los complejos MHC I-antígeno son reconocidos por las células Tc (CD8<sup>+</sup>). La principal función de las Tc, radica en el reconocimiento y eliminación de células tumorales o infectadas con patógenos intracelulares a través de citotoxicidad directa, que puede ser mediada por perforina, o inducción de apoptosis a través de la molécula Fas en la membrana celular. Así mismo, las células Tc activadas



secretan citocinas antivirales y promotoras de la presentación de antígeno, como el interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).

### **b) Vía exógena de procesamiento y presentación de antígeno o presentación en el contexto del MHC II.**

La vía exógena de procesamiento de antígeno, denominada como MHC II, es realizada por las CPAs y en algunas patologías por las células epiteliales (Londei, Lamb et al. 1984). Los antígenos presentados por esta vía son captados del medio extracelular por endocitosis y provienen ya sea de los patógenos directamente, productos del mismo o bien de células apoptóticas infectadas. Una vez que el antígeno es captado e internalizado, este es degradado en vesículas endocíticas acidificadas generando péptidos de aproximadamente 13 a 25 aminoácidos. La molécula de MHC II migra a través del tráfico vesicular del RE hacia un compartimiento endocítico donde se asocia con los péptidos. Una vez que se forma el complejo antígeno-MHC II, éste migra a la superficie en vesículas exocíticas y se expone sobre la superficie celular. Las moléculas cargadas de MHC II con péptidos son reconocidas por las células Th (CD4+). La activación de las células Th, induce la secreción de citocinas que favorecen la proliferación y diferenciación de las células B y Tc, ayudando en gran medida al desarrollo de la respuesta antígeno-específica, a la generación de la memoria inmunológica y a la eliminación del patógeno. Las vías de procesamiento y presentación de antígeno anteriormente descritas, son sumamente importantes en la respuesta inmune incluyendo las respuestas antivirales. Sin embargo, durante las infecciones virales, en la mayoría de los casos, no todas las células son susceptibles a la infección, por lo que la presentación en el contexto del MHC I se ve limitada a la célula infectada. No obstante, para que una respuesta antiviral sea eficiente, las DCs tienen que activar a las Tc mediante un mecanismo que les permite procesar y presentar antígenos endocitados en el contexto del MHC I. De tal manera, que los péptidos presentados producto de la degradación de las proteínas virales en el contexto del MHC I no son sintetizados dentro de la DCs, sino que son captados

por endocitosis a partir de células apoptóticas infectadas o bien de antígenos solubles (Fleeton, Contractor et al. 2004; Fleeton, Contractor et al. 2004; Zehn, Cohen et al. 2006). Este complejo mecanismo de doble presentación se denomina presentación cruzada y es exclusivo de las DCs (Heath, Belz et al. 2004).

### **c) Presentación cruzada**

La presentación cruzada es el mecanismo que permite presentar antígenos endocitados en el contexto del MHC I y es exclusivo de las DCs. Aunque los mecanismos del cómo se lleva a cabo no son del todo claros, recientemente se han sugerido tres principales vías que se describen a continuación. La primera vía de presentación cruzada involucra la transferencia de antígenos internalizados del endosoma al proteosoma donde son degradados y procesados para posteriormente seguir la vía clásica de presentación en el contexto del MHC clase I, al igual que los antígenos generados de manera endógena. La segunda vía consiste en la degradación de los antígenos en los compartimentos endosomales independientemente del proteosoma, en donde las moléculas del MHC I son reclutadas selectivamente en endosomas tempranos y posteriormente una enzima denominada aminopetidasa regulada por insulina (IRAP) recorta los péptidos para su subsecuente asociación a las moléculas de MHC I fuera del tráfico del RE (Segura, Albiston et al. 2009). La tercer vía involucra la entrega de los componentes del RE a organelos endocíticos, sin embargo, los mecanismos de este proceso permanecen poco claros (Di Pucchio, Chatterjee et al. 2008). Por lo tanto, la presentación cruzada independientemente de las vías anteriormente mencionadas, permite que las moléculas del MHC I asociadas a péptidos generados de antígenos exógenos, migren a la superficie y sean presentados a las células Tc las cuales, al reconocer estos complejos, serán activadas y transformadas en células efectoras. Este mecanismo de procesamiento y presentación de los antígenos exógenos convierte a las DCs en las células más eficientes para inducir y activar a las células T.

### **1.2.1.2 Células B como CPAs**

Las células B forman parte del sistema inmune adquirido, ya que poseen el BCR capaz de reconocer antígenos solubles de manera directa y son componentes indispensables en la memoria inmunológica. La principal función de las células B, es la producción de anticuerpos específicos contra los antígenos estructurales o bien hacia sustancias derivadas de los organismos patógenos. Los anticuerpos, son proteínas solubles que pueden ser secretadas en el torrente sanguíneo y en la superficie de las mucosas. Estos anticuerpos actúan neutralizando a los microorganismos patógenos y a toxinas potencialmente dañinas al organismo uniéndose a ellos con gran afinidad, formando complejos antígeno-anticuerpo que facilitan su eliminación a través de la fagocitosis y degradación por parte de los macrófagos (Swanson and Hoppe 2004; van Lookeren Campagne, Wiesmann et al. 2007).

Para que una célula B se convierta en célula plasmática productora de anticuerpos específicos, requiere que su BCR reconozca un antígeno y éste sea endocitado (Rodríguez-Pinto 2005). Dependiendo de la naturaleza del antígeno, la activación de las células B puede seguir dos rutas diferentes, una dependiente de la participación de las células Th activadas, respuesta timo-dependiente (TD) y otra independiente de las células T, denominada timo-independiente (TI). En la respuesta TD, los antígenos generalmente son de origen proteico, y la respuesta es sumamente eficiente generando memoria inmunológica. La respuesta a antígenos TD por parte de las células B, requiere de las citocinas y factores de crecimiento secretados por las células Th (Erickson, Vogel et al. 2000), es por esta razón que las células B poseen la maquinaria necesaria para el procesamiento y presentación de antígenos en contexto del MHC II y la síntesis de moléculas coestimuladoras que les permite interactuar directamente con las células Th lo que conlleva al incremento en la expansión clonal de las células B, el cambio de isotipo, la afinidad por su antígeno, maduración y la generación de células

plasmáticas de larga duración (Ahonen, Manning et al. 2002; Rodríguez-Pinto 2005).

### **1.2.1.3 Macrófagos.**

Los macrófagos son células con una gran capacidad fagocítica, cuya función radica en la degradación y eliminación de tejidos, células muertas y microorganismos en ausencia de una respuesta inmune previa. Estas células expresan un repertorio de receptores incluyendo el receptor de manosa y los TLRs que reconocen PAMPs (Stagg and Knight 2001). La unión de los microorganismos con estos receptores induce su fagocitosis y su degradación. Tales mecanismos son particularmente eficaces en la remoción de bacterias. Los macrófagos expresan bajos niveles de MHC II y de moléculas coestimuladoras, pero estos pueden aumentar por el número de productos microbianos detectados. Se han caracterizado varias moléculas microbianas que pueden inducir la presentación de antígeno a las células T, como el caso del LPS. Este reconocimiento induce la destrucción del microorganismo y la presentación a células T específicas. Sin embargo, esta presentación sólo induce la proliferación de células T en el sitio donde se encuentra el daño, es decir el proceso inflamatorio. Los macrófagos pueden ser activados por el IFN- $\gamma$  producido por las células Th antígeno-específicas previamente activadas, que reconocen péptidos en el contexto del MHC II en la superficie del macrófago infectado. La activación, también puede llevarse a cabo por la producción autocrina de TNF- $\alpha$ , seguido de la interacción con las células Th a través de CD40-CD40L. La presentación de antígeno por parte de los macrófagos a las células Th y la producción de citocinas es restringida al microambiente local y la activación que se produce únicamente cuando hay macrófagos infectados (Stagg and Knight 2001). Algunas poblaciones de macrófagos de la mucosa intestinal, principalmente en la *lamina propria* (LP), participan en el mantenimiento controlado de la inflamación gracias a la producción de IL-10 y TGF $\beta$  (Denning, Wang et al. 2007).

Por otra parte, los macrófagos son las células microbicidas por excelencia, para ello, han desarrollado mecanismos que consisten básicamente en la generación de moléculas tóxicas para las bacterias. Estos mecanismos incluyen el estallido respiratorio que consiste en la producción de óxido nítrico (NO) y metabolitos tóxicos del oxígeno como son el superóxido y el peróxido de hidrógeno (Platt and Mowat 2008). Otros mecanismos incluyen la producción de moléculas que degradan la pared de las bacterias Gram-positivas como es la producción de péptidos como defensinas y metabolitos que compiten por micronutrientes como la lactoferrina que se une al hierro, impidiendo que las bacterias tengan acceso al mismo.

#### **1.2.1.4 Células dendríticas.**

En 1973, Ralph Steinman y Zanvil A. Cohn describieron una novedosa población celular presente en los órganos linfoides del ratón con una gran capacidad para activar a células T vírgenes (Banchereau and Steinman 1998). Estas células fueron descritas como una población de células adherentes con una morfología muy característica con grandes prolongaciones citoplasmáticas y fueron denominadas como DCs. Las DCs se encuentran distribuidas en todo el organismo, sin embargo existe una mayor cantidad de ellas en sitios estratégicos con alta exposición antigénica como los son la piel y las mucosas (Steinman and Hemmi 2006).

Las DCs pueden ser encontradas en dos estadios de diferenciación con funciones inmunológicas distintas: el estadio inmaduro y el estadio maduro o activado. En el estadio inmaduro, las DCs, poseen una gran capacidad endocítica y expresan un gran repertorio de receptores capaces de distinguir entre antígenos inocuos y antígenos potencialmente patógenos, entre ellos los TLRs. Las DCs en estadio inmaduro, se encuentran en sitios estratégicos de alta exposición antigénica, así como en los órganos periféricos. Estas células responden ante cualquier señal de peligro, detectan el tipo de agresor o parte de éste, lo endocitan, se activan y se

diferencian a DCs maduras o activadas (Banchereau and Steinman 1998; Nagler-Anderson 2001). Esta diferenciación del estadio inmaduro a DC madura, incluye la expresión de receptores para quimiocinas, como CCR7 que les permite migrar e ingresar a los órganos linfoides más cercanos, sitio en donde interactúan con las células T vírgenes y de memoria. Aunque las células T son capaces de reconocer antígenos procesados y presentados por otras CPAs incluyendo células somáticas, requieren de la interacción con una DC madura para activarse. Para que la activación sea eficiente requiere de tres señales indispensables: 1) el procesamiento y la presentación de antígeno sobre las moléculas de MHC, 2) la interacción de las moléculas CD40L y CD28 de las células T con las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 expresadas en las DCs y 3) la secreción de citocinas de las DCs que ayudará en la diferenciación y proliferación de las células T. Bajo este esquema, la activación eficiente de las células T sólo puede ser mediada por las DCs, las cuales, poseen todos los elementos necesarios para llevar a cabo dicha función (Banchereau and Steinman 1998; Sato and Iwasaki 2005).

La interacción de las células T con las DCs inicia con el reconocimiento del antígeno asociado a moléculas del MHC a través del TCR, posteriormente se llevan a cabo interacciones más complejas a través de las moléculas coestimuladoras y sus ligandos sobre las células T. Una de las interacciones más importantes es la de la molécula CD40 expresada en las DCs con CD40L expresado transitoriamente en la mayoría de las células T activadas, por el reconocimiento del MHC. *In vivo*, la interacción CD40L/CD40 participa en el establecimiento de la memoria inmunológica y en la inducción de la respuesta pro-inflamatoria. Usando modelos animales “knock out” (KO) de estas moléculas o bloqueando la interacción con anticuerpos, estos animales presentan severas infecciones parasitarias, bacterianas y virales. *In vitro* la unión de CD40 a su ligando CD40L, incrementa la expresión sobre las DCs de moléculas coestimuladoras y de MHC, induce la producción de IL-12 e IL-15 y previene la apoptosis (Sun, Celluzzi et al. 2006). Por otra parte, la interacción con CD80 y

CD86 se da a través de dos ligandos capaces de unirse a estas moléculas, CD28 y CD152, ambos expresados en las células T. CD28 se expresa de manera constitutiva, y la expresión de CD152 tiene una cinética más compleja, aunque esta última presenta una mayor afinidad por CD80 y CD86. La baja expresión de CD152 permite la interacción de CD28 más eficientemente con CD80 y CD86 lo que promueve la activación de las células T. Por otro lado CD152, aparece sobre la superficie de las células T para regular su proliferación, actuando como un regulador negativo de la activación (Sansom, Manzotti et al. 2003).

En la actualidad se considera a las DCs como las principales moduladoras de la respuesta inmune adquirida ya que tienen la capacidad de dirigir la respuesta hacia un perfil de citocinas determinado. Dentro de los factores que intervienen en el tipo de citocinas secretadas por las Th activadas por las DCs son: 1) la naturaleza y la cantidad del antígeno captado y presentado por las DCs, 2) la población de DCs que capta el antígeno y su estado de activación, 3) el microambiente circundante y 4) el receptor que reconoció dicho antígeno. Estos factores aunados a la población de células Th que reconoce el antígeno, induce la secreción de citocinas por parte de las células Th con funciones inmunológicas diversas.

Además de interactuar con las células T, se ha reportado que las DCs están involucradas en la activación, maduración y diferenciación de las células B de manera directa. La interacción de las DCs con los linfocitos B se encuentra mediada por la participación de dos moléculas: BCMA y BAFF-R, receptores expresados sobre el linfocito B y las moléculas APRIL y BLyS secretadas por las DCs (Wykes, Pombo et al. 1998). Tanto APRIL como BLyS son factores de diferenciación y supervivencia de las células B humanas y pertenecen a la superfamilia del TNF. En presencia de IL-10 o TGF- $\beta$  (Litinskiy, Nardelli et al. 2002), inducen la recombinación del ácido desoxirribonucleico (ADN) que da origen al BCR. La interacción de las DCs con las células B mediada por estas

moléculas, induce la diferenciación de la célula B a productora de anticuerpos sin la participación de las células Th.

En resumen, las características más destacadas de las DCs que las convierten en el principal vínculo entre la inmunidad innata y la inmunidad adquirida son: a) que poseen una gran capacidad para inducir la activación y expansión de linfocitos T, el tipo de citocinas que producirán y el desarrollo de células de memoria, b) que en respuesta a un estímulo microbiano son las principales productoras de citocinas como la IL-12 e interferones tipo I (IFN-I) y c) que poseen la capacidad de activar a las células B induciendo su maduración y diferenciación hacia células productoras de anticuerpos. Las características de la población de DCs que las convierte en las células más especializadas en el reconocimiento de antígenos son: a) su ubicación en tejidos periféricos y principalmente en sitios de alta exposición antigénica, b) su gran capacidad de captura de antígenos y la maquinaria necesaria para el llevar a cabo la presentación cruzada, c) su capacidad de migrar a los órganos linfoides especialmente a las zonas ricas en células T e iniciar la respuesta inmune y d) su rápida diferenciación y maduración bajo un amplio rango de estímulos, esto gracias a la expresión de gran cantidad de receptores que reconocen una amplia gama de ligandos.

#### ***1.2.1.4.1 Sistema de reconocimiento de las DCs.***

Siendo las DCs una población celular altamente especializada en el establecimiento y dirección de la respuesta inmune, cuenta con diferentes mecanismos de reconocimiento que le permiten diferenciar a los antígenos propios de los potencialmente patógenos. La maquinaria de reconocimiento de antígenos de las células del sistema inmune innato, en general y principalmente de las DCs, incluye la expresión de distintas clases de receptores denominados como PRRs (patterns recognition receptors) que reconocen PAMPs. Los PRRs se dividen según su localización, sus ligandos y sus funciones inmunológicas en dos grandes familias: a) PRRs señalizadores, los cuales incluyen a los TLRs (toll like receptors)



asociados a la membrana celular y los receptores NLR (NOD-like receptors), receptores intracelulares que se encuentran distribuidos en el citoplasma y b) los PRRs endocíticos los cuales reconocen principalmente carbohidratos como los receptores de manosa (Mushegian and Medzhitov 2001; Niess and Reinecker 2006; Iwasaki 2007) .

Otro tipo de PRRs intracelulares presentes en las DCs, son las helicasas de ácido ribonucleico (ARN) como RIG-1, las cuales reconocen ARNdc o ácido ribonucleico de cade sencilla (ARNcs) originado principalmente durante las infecciones virales. Estas helicasas, al reconocer el ARNdc, señalizan y encienden los programas antivirales celulares, como la producción de IFN-I (Cutler and Jotwani 2006; Taylor, Tamura et al. 2006).

A pesar de que la maquinaria de reconocimiento antigénico es tan compleja, la familia de los TLRs resalta del resto debido a la amplia gama de ligandos presentes en los organismos patógenos que son capaces de reconocer, así como de su permanencia en el reino animal (Pasare and Medzhitov 2004).

#### **1.2.1.4.2 Receptores tipo Toll (TLRs).**

Los receptores TLRs fueron inicialmente descritos en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, como un grupo de moléculas necesarias durante el desarrollo embrionario. Posteriormente, fueron asociados a su sistema inmune, ya que participan en la activación y estimulación de la secreción de péptidos antifúngicos (Takeda, Kaisho et al. 2003). Actualmente, se han descrito genes homólogos a estos receptores en la mayoría de las especies animales. En el ratón y el humano se han descrito al menos 13 de estos receptores, denominados del TLR-1 al TLR13, todos involucrados con el sistema inmune innato. Estos receptores son de gran importancia en el reconocimiento de diversos PAMPs incluyendo algunos elementos constituyentes de los virus, por lo que son

indispensables en el desarrollo de las respuestas anti-virales (Pasare and Medzhitov 2004).

Estructuralmente, los TLRs son proteínas transmembranales tipo I que han sido ampliamente estudiados en las células del sistema inmune innato de los mamíferos. Sin embargo, algunos de estos receptores, han sido descritos en células no linfoides como fibroblastos, adipocitos, epitelios respiratorio e intestinal, osteoblastos, astrocitos y células del parénquima (Cario 2008; Mishra, Gundra et al. 2008; Abreu; Schaffler and Scholmerich). La función principal de los TLRs, es la del reconocimiento de PAMPs, lo que promueve la activación de las células del sistema inmune. En la actualidad se tiene conocimiento de los ligandos para la mayoría de los TLRs con excepción de los TLR10, TLR12 y TLR13 de los cuales se desconoce su ligando natural (Takeda, Kaisho et al. 2003; Kawai and Akira 2005; Takeda and Akira 2005).

El primer TLR identificado en el ratón fue el TLR4, el cual se ha demostrado que une con gran afinidad al LPS, componente de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. El TLR2, reconoce peptidoglicanos, componentes de la pared de las bacterias Gram-positivas. El TLR2 se asocia con TLR1 o con TLR6 y discrimina estructuras moleculares diacil y triacil lipopeptídicas, respectivamente. El TLR3 se encuentra involucrado en el reconocimiento del ARNdc del genoma de algunos virus y el generado durante la replicación viral. TLR5, reconoce flagelina, una proteína presente en los flagelos de las bacterias. El TLR11, reconoce productos de bacterias uropatógenas, y en el humano no es funcional debido a que el gen posee un codón de término prematuro que impide su expresión. El TLR7 y TLR8 reconocen en conjunto, moléculas de imidazoquinolina y ARNcs de origen viral. El TLR9 reconoce secuencias no metiladas de ADN con las secuencias citidina-fostato-guanosina (CpG) presentes en el ADN de bacterias y virus. Los TLRs se encuentran expresados sobre la membrana celular, con excepción de los TLR3, TLR7/TLR8 y TLR9 los cuales reconocen ácidos

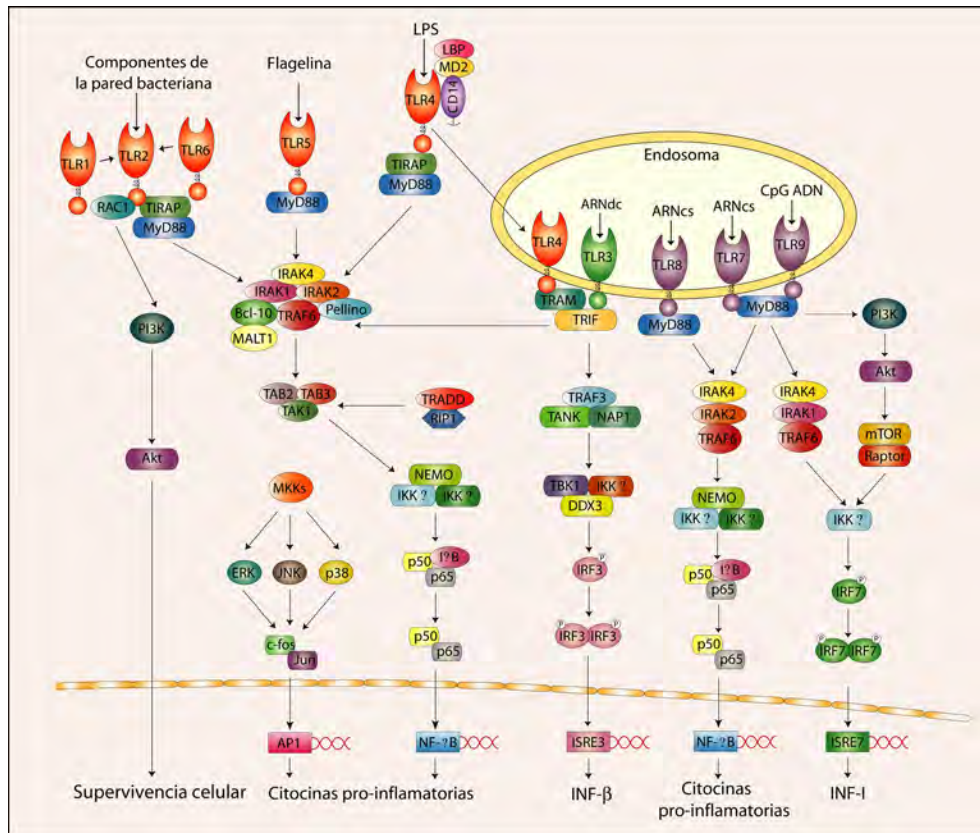
nucleicos, y por tanto se encuentran en compartimentos endosomales dentro de las células (Pasare and Medzhitov 2004; Kawai and Akira 2005).

El reconocimiento de alguno de los PAMPs por su TLR, promueve un cambio conformacional en los receptores y el reclutamiento de moléculas río abajo iniciando así la vía de señalización que culminará en la activación del sistema inmune. Posterior a la interacción con su ligando, los TLRs comienzan el reclutamiento de moléculas de señalización MyD88, TRIF y TRAM, provocando la liberación de NF $\kappa$ -b. La vía de señalización de la mayoría de los TLRs depende de la molécula adaptadora MyD88, con excepción del TLR3, el cual posee una vía de señalización independiente de MyD88 dependiente de la molécula TRIF y del TLR4, el cual puede señalar tanto por la vía dependiente de MyD88 como por una dependiente de TRIF (Mushegian and Medzhitov 2001; Underhill 2003; Kawai and Akira 2005). El reconocimiento de alguno de los PAMPs por parte de los TLRs concluye en la producción de citocinas pro-inflamatorias tales como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-18, en un aumento en las moléculas del MHC y moléculas coestimuladoras sobre la superficie celular y particularmente en el caso de la señalización a través del TLR3, en la dimerización de los factores de transcripción IRF lo que provoca la producción de IFN- $\beta$ . Las vías de señalización y los principales ligandos para los TLRs se esquematizan en la siguiente figura (Fig. 1) (Medzhitov and Janeway 1999; Medzhitov 2001; Kawai and Akira 2005; Kawai and Akira 2005).

### **1.2.2 Principales subpoblaciones de células dendríticas.**

La población de las DCs en el ratón, ha sido ampliamente estudiada, debido al fácil acceso a los órganos y tejidos linfoides, y a los modelos celulares que permiten la generación de grandes cantidades de DCs *in vitro* a partir de progenitores extraídos de medula ósea (Lutz, Kukutsch et al. 1999). Estos modelos han permitido el estudio de las DCs tanto *in vivo* como *in vitro*, bajo condiciones de reto antigénico, infección o tolerancia, lo que ha generado una

gran cantidad de información con respecto a la ontogenia, fenotipo y función de las mismas.



**Figura 1.** Principales vías de señalización descritas para los TLRs murinos y sus principales ligandos. Modificado de Kawai et al., 2005.

En el ratón, las DCs han sido caracterizadas utilizando la expresión de la integrina CD11c como marcador, sin embargo, dicha integrina no es exclusiva de las DCs, existen otras poblaciones celulares como monocitos, macrófagos y neutrófilos que expresan diferentes niveles de CD11c, pero sólo en las DCs de ratón se encuentra constitutivamente. A pesar de no tener un marcador exclusivo, las DCs pueden diferenciarse del resto de las células por presentar la expresión de otros marcadores como MHC II, cuya co-expresión sólo se presenta en la población de DCs. Una DC clásica de ratón presenta el siguiente fenotipo CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup>. Bajo este esquema, las DCs pueden o no expresar una serie de otros marcadores y

receptores propuestos para clasificar a las DCs en subtipos. Las principales moléculas descritas para la clasificación de las DCs en subtipos son: MHC II, CD11b, CD8 $\alpha$ , DEC-205, PDA-1, CD4, B220, F4/80, CD103, CX3CR1, Gr-1, CCR6, CCR7, CD40, CD80 y CD86 entre otros. Aunque existen moléculas que se encuentran de manera constitutiva sobre las DCs, como es el caso de las moléculas del MHC II, existe una gran cantidad de moléculas que son inducibles bajo ciertas condiciones patológicas o de activación, así como del microambiente en el cual se desarrolle la DCs, esto ha generado que la clasificación de las DCs se convierta en un tema bastante complejo. A continuación mencionaremos algunas de las generalidades para la clasificación y origen propuesto para este tipo celular.

Las DCs tanto en humano como en ratón, derivan de un progenitor hematopoyético de la médula ósea CD34+. Este progenitor CD34+ inicialmente da origen a dos precursores, uno linfoide y otro mieloides. Ambos precursores dan origen a DCs inmaduras, las cuales una vez activadas, serán capaces de interactuar con las células T y B (Ardavin 2003). Las DCs derivadas del progenitor mieloides expresan además de la molécula CD11c la molécula CD11b, mientras que las DCs de origen linfoide expresan el marcador CD8 $\alpha$ . Si bien estos marcadores se han establecido como marcadores ontogénicos de las DCs, esta clasificación ya no es del todo válida, ya que ambas subpoblaciones pueden ser reconstituidas *in vivo* a partir de progenitores tanto linfoides como mieloides, sin embargo, para fines prácticos, la clasificación de las DCs se basa en la expresión o ausencia de las moléculas CD11b y CD8 $\alpha$  independientemente de su origen (Manz, Traver et al. 2001) . Así mismo, se ha descrito una tercera subpoblación de DCs denominada DCs plasmacitoides (pDCs), cuyos precursores pueden ser tanto linfoides como mieloides (Nakano, Yanagita et al. 2001). Además de ser parte fundamental en el desarrollo de la respuesta antiviral, esta población posee características que las distinguen de las DCs convencionales. Debido a su importancia en las infecciones virales, los rasgos más importantes de esta población se describen a continuación.

### 1.2.3 Células dendríticas plasmacitoides.

Las pDCs fueron descritas inicialmente en el humano como las principales productoras de IFN-I  $\alpha$  y  $\beta$  cuando eran activadas vía TLRs. Estas células fueron encontradas principalmente en sangre periférica y en órganos linfoides. Posteriormente se identificó una población similar en el ratón con el siguiente fenotipo: CD11c<sup>bajo</sup> CD11b<sup>-</sup> B220<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup>, expresando bajos niveles de moléculas del MHC II (Asselin-Paturel, Boonstra et al. 2001; Nakano, Yanagita et al. 2001; Colonna, Trinchieri et al. 2004), pero con una alta capacidad de producción de IFN-I bajo estímulos antigénicos (Asselin-Paturel, Boonstra et al. 2001). Las pDCs difieren de las DCs no sólo por su fenotipo, sino también en sus patrones de migración. Las pDCs activadas son reclutadas en el sitio de infección y entran a los órganos linfoides a través de las vénulas endoteliales altas (HEV) (Nakano, Yanagita et al. 2001), mientras que las DCs entran a los órganos linfoides a través de los vasos linfáticos (Banchereau and Steinman 1998). En el estadio inmaduro, las DCs se encuentran en sitios de alta exposición antigénica, como la piel y las mucosas, en cambio las pDCs se encuentran principalmente en la circulación periférica y en algunos órganos linfoides. Las DCs cuando se activan, migran a los órganos linfoides para activar a las células T. En cambio las pDC activadas en la periferia comienzan a producir grandes cantidades de IFN-I lo que favorece el desarrollo de una respuesta antiviral sistémica. Otra diferencia notable entre ambas poblaciones, es que expresan distintos TLRs y por tanto reconocen diferentes grupos de patógenos. Los TLR expresados en las pDCs se encuentran asociados con el reconocimiento de material genómico ADN o ARN de origen bacteriano o viral, TLR7/8 (ARNcs viral) y TLR9 (ADN de origen bacteriano), y la señalización para la producción de IFN-I, depende de la molécula MyD88 (Fig. 2). Mientras que las mDCs expresan relativamente altos niveles de TLR3 y TLR4, y la respuesta para la producción de IFN-I es a través de TRIF, y es de manera MyD88 independiente (Phita 2007) .

Aunque el IFN-I puede ser producido en cualquier célula infectada, este se produce en muy bajos niveles y por lo general actúa de manera autócrina y protege únicamente a las células que se localizan muy próximas al sitio de infección. En el caso de las pDCs, la producción de IFN-I promueve la respuesta antiviral sistémica, activando a las células B, células T, NKs y DCs (Tailor, Tamura et al. 2006).

Cuando las pDCs son activadas *in vitro*, ya sea a través de CD40L o bien vía TLRs-ligandos, son capaces de activar a las células T de memoria. Sin embargo, la capacidad de activar a células T vírgenes permanece poco claro. En algunos estudios con pDCs murinas, se ha reportado que las pDCs activadas tienen poca o nula capacidad de activar a las células Th comparadas con las DCs activadas. Por otro lado, las pDCs humanas activadas, pueden inducir la activación de las células T siempre y cuando el antígeno sea exógeno y no cuando es endógeno. Esta característica, denota la relativa ineficiencia para llevar a cabo la presentación cruzada por esta subpoblación, sin embargo, amplifican la presentación cruzada sobre las DCs por efecto del IFN-I. (Nakano, Yanagita et al. 2001). Por otra parte, existen otros reportes donde se demuestra el papel inhibitorio de las pDCs a través de la generación de células T reguladoras, esto dependiendo del tiempo de activación de las pDCs (Di Pucchio, Chatterjee et al. 2008).

### **1.2.3.1 Producción de IFN-I.**

Varios son los factores que contribuyen a la producción de IFN-I por las pDCs y de las DCs, sin embargo, dentro de los más importantes está el reconocimiento de ácidos nucleicos de origen viral o bacteriano reconocidos ya sea a través de los TLRs o bien de las helicasas como RIG-1 (del inglés: retinoid-inducible gene 1) o MDA-5 (del inglés: melanoma-differentiation-associated gene 5) (Tailor, Tamura et al. 2006). Otro elemento indispensable es la expresión de los factores de transcripción IRF7 e IRF3. Las células pDCs expresan constitutivamente altos

niveles del factor de transcripción IRF-7, y producen tanto IFN- $\alpha$  como IFN- $\beta$  cuando son estimuladas vía TLR7/8 o TLR9, sin la necesidad de retroalimentación autócrina de IFN. Esta vía de activación induce la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6 IL-1 $\beta$  e IL-12p40. En las DCs convencionales se expresa el factor de transcripción IRF-3 y cuando son activadas vía TLR3, se induce la producción de IFN- $\beta$ , la cual requiere de una retroalimentación autócrina para mantener la producción de IFN- $\beta$  de manera activa (Tailor, Tamura et al. 2006; Phita 2007). Ambos mecanismos de producción de IFN-I favorecen la maduración de las DCs, provocando el aumento en la expresión de las moléculas coestimuladoras, la presentación de antígeno en el contexto del MHC I principalmente y la producción de factores de crecimiento y de sobrevivencia. Las vías de señalización para la producción de IFN-I para las DCs y las pDCs se muestran en la siguiente figura (Fig. 2).

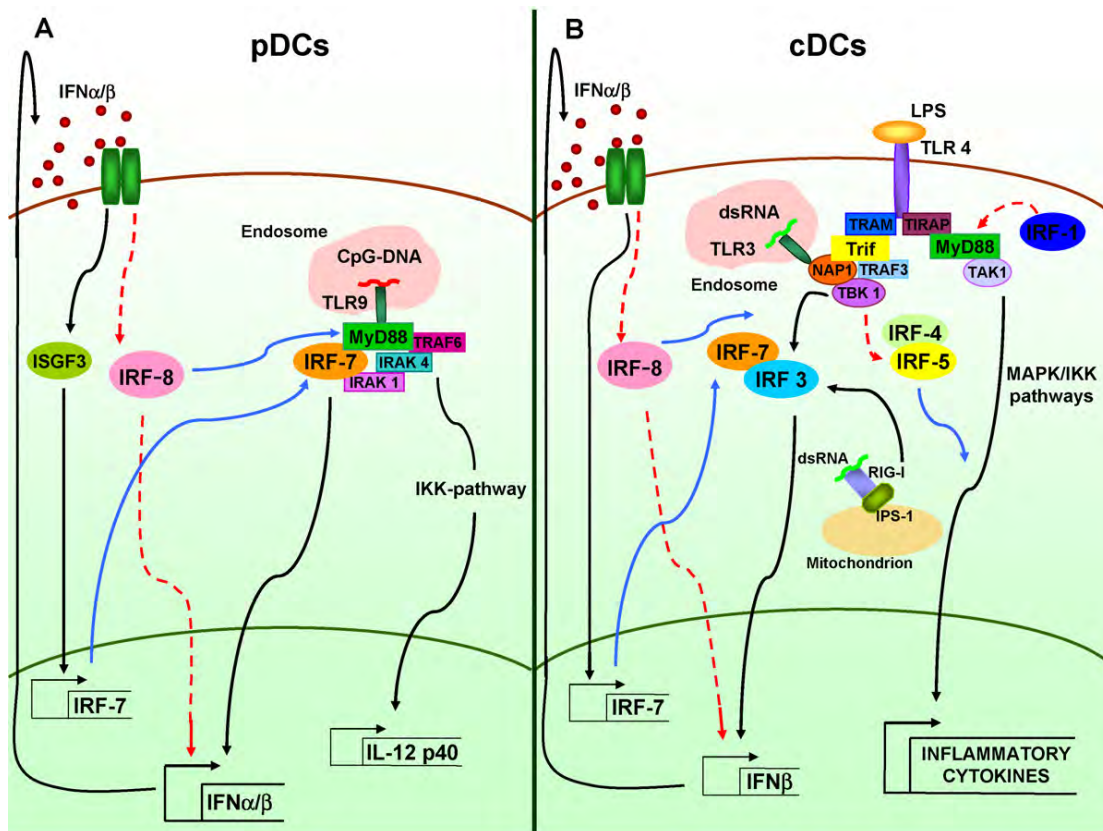
Si bien las DCs y las pDCs poseen diferencias notables, ambas son de gran importancia en la generación de la respuesta antiviral, ya que ambas subpoblaciones actúan de manera conjunta optimizando la presentación de antígeno y la producción de citocinas para activar a otras poblaciones celulares (Gabriele and Ozato 2007).

#### **1.2.4 DCs en infecciones virales.**

Los virus constituyen el mayor reto para el sistema inmune de los vertebrados, son altamente diversos y evolucionan mucho más rápido que la mayoría de los patógenos. Paradójicamente, los virus son parásitos obligados que dependen totalmente de la célula hospedera para sobrevivir utilizando la maquinaria de síntesis proteica de la célula infectada para llevar a cabo su ciclo replicativo. Sin embargo, los virus al ser detectados por el sistema inmune, son generalmente eliminados del organismo. Por esta razón, algunos tipos de virus han desarrollado estrategias que permiten la evasión de la respuesta inmune y la generación de una infección productiva. Los mecanismos de evasión de la respuesta inmune pueden llevarse a cabo en diferentes niveles de la respuesta inmune, ya sea



evitando su reconocimiento por parte de las células del sistema inmune innato (Bowie and Unterholzner 2008), apagando la maquinaria de activación y de producción de citocinas (Fernandez-Sesma, Marukian et al. 2006), modificando la presentación de antígeno, o bien de manera indirecta mediante la generación de mutaciones exitosas que favorecen el rearrreglo antigénico sobre las partículas virales recién sintetizadas (Bowie and Unterholzner 2008). Todos estos mecanismos permiten el establecimiento de las infecciones virales dentro de las células y por lo tanto la generación de nueva progenie viral.



**Figura 2.** Diferentes vías de señalización para la producción de IFN-I por las pDCs y DCs. A) En las pDCs la unión de MyD88 con IRF-7 activa una cascada de señalización donde participan varias cinasas entre ellas IRAK1 e IRAK4, este complejo desencadena la producción de IFN- $\alpha$  y  $\beta$ , así como por IL-12p40 mediada por la vía de IKK. B) En las DCs convencionales, IRF3/7 son activados por TLR3 y TLR4 a través de una vía dependiente de TRIF y estimula la transcripción de IFN- $\beta$  (Gabriele and Ozato 2007).

Debido a que las DCs son las encargadas de llevar a cabo los primeros reconocimientos de componentes virales y de inducir la respuesta inmune contra éstos, la cantidad de investigaciones sobre la participación de las DCs en infecciones virales ha cobrado una mayor relevancia. De tal manera que los modelos *in vitro* utilizando DCs derivadas de precursores de médula ósea han sido considerados como modelos predictivos de la respuesta de dichas células ante los elementos presentes en una infección viral *in vivo*. Sin embargo, algunos modelos animales como el murino también han sido ampliamente utilizados con este fin. Dentro de las infecciones virales en las que se ha demostrado la participación de las DCs en la iniciación de la respuesta inmune murina incluyen al virus Sendai, al virus de la leucemia Moloney (MMLV), al virus herpes simplex (HSV) y al virus de la influenza A, siendo en éste último en donde se demostró la importancia de las DCs en iniciar la respuesta T citotóxica (Fernandez-Sesma, Marukian et al. 2006; Bowie and Unterholzner 2008). Así mismo, en la infección por reovirus, infección que comienza en las PPs, se ha demostrado que las DCs de las PPs, son capaces de endocitar células epiteliales apoptóticas con antígeno viral generado de la infección y de hacer presentación cruzada a células Tc (Fleeton, Contractor et al. 2004), iniciando así una respuesta contra éstos virus.

Si bien las DCs son las encargadas de iniciar la respuesta inmune, muchos tipos de virus, aprovechando la naturaleza intrínseca endocítica y de migración de las DCs, han desarrollado mecanismos que permiten infectarlas para posteriormente infectar a otros tipos celulares, hecho que las convierte en las principales diseminadoras de la infección, tal es el caso del virus murino mamario tumoral (MMTV), del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y del virus del dengue en el caso del humano, por mencionar algunos (Pollara, Kwan et al. 2005; Courreges, Burzyn et al. 2007).

En el caso de los rotavirus, el estudio de la participación de las DCs ha sido abordada desde dos perspectivas diferentes, una es la del reconocimiento de los

componentes virales y la activación de las DCs, y la otra se refiere a los mecanismos de evasión de la respuesta inmune innata mediante la inhibición de la producción de IFN-I, un mecanismo dependiente de la interacción de la proteína NSP1 de rotavirus con los factores de traducción IRF (Barro and Patton 2005; Barro and Patton 2007).

Existen algunos trabajos realizados en DCs derivadas de progenitores de médula ósea de ratón, en donde se demuestra que rotavirus provoca un aumento de las moléculas coestimuladoras CD40 (Douagi, McInerney et al. 2007) y CD86 (Istrate, Douagi et al. 2007) en presencia del virus infeccioso, indicando que estas células son capaces de activarse y de reconocer los elementos del virus completo, además de producir TNF- $\alpha$  en respuesta a este reconocimiento. Por otro lado, en DCs humanas derivadas de sangre periférica principalmente en estadio inmaduro, se corroboró que rotavirus es capaz de replicarse dentro de estas células mediante la detección de la proteína NSP4 como indicador de la infección, sin embargo esta replicación no inhibe la maduración de las DCs (Narvaez, Angel et al. 2005). En nuestro laboratorio, utilizando DCs derivadas de progenitores de médula ósea de ratón, fue posible detectar NSP5 dentro de las células, demostrando nuevamente que rotavirus es capaz de replicarse dentro de las DCs, pero con una incidencia menor al 1% (dato no publicado). Sin embargo a pesar de esta replicación, las DCs se activan y aumentan la expresión de la molécula CD40.

La presencia de las NSP dentro de las DCs, hace latente la hipótesis de la posible participación de las DCs en la diseminación del virus a otros sitios extraintestinales ya que en trabajos recientes se han reportado casos de viremia y antigenemia tanto en ratones como en niños infectados con rotavirus (Fenaux, Cuadras et al. 2006; Blutt, Matson et al. 2007).

Siendo la producción de IFN-I uno de los principales elementos de protección en infecciones virales, no es de sorprenderse que varios virus presenten mecanismos de evasión de la respuesta inmune a este nivel, tal es el caso del virus de la

Influenza A, capaz de modular la respuesta inmune innata impidiendo la producción de IFN-I e inhibiendo la maduración de las DCs (Fernandez-Sesma, Marukian et al. 2006). En el caso de rotavirus, como se mencionó antes, recientemente se ha reportado un mecanismo que altera la producción de IFN-I en fibroblastos infectados por rotavirus *in vitro*, siendo la proteína NSP1 responsable de tal inhibición induciendo la degradación del factor de transcripción IRF3 necesario para la síntesis de IFN-I. Sin embargo, a pesar de la presencia de rotavirus, las DCs derivadas de médula ósea *in vitro*, maduran y producen IFN-I, tanto en presencia de virus infeccioso como con virus inactivado, lo que refuerza el papel de las DCs como principales productoras de IFN-I durante las infecciones virales (Douagi, McInerney et al. 2007). Por otro lado, utilizando células epiteliales y pDCs, se demostró que NSP1 no sólo puede inducir la degradación de IRF3, sino de IRF5 e IRF7, éste último expresado constitutivamente en pDCs (Barro and Patton 2007). Sin embargo, la infección de las DCs por rotavirus es muy ineficiente, por lo que aún en presencia de NSP1, la producción de IFN-I y la maduración no se ven inhibidas por este mecanismo, sugiriendo que *in vivo* el mecanismo de degradación de los factores IRF se lleva a cabo en las células epiteliales infectadas y no en las DCs. Sin embargo, este mecanismo de evasión de la respuesta inmune innata no ha sido evaluado en un modelo *in vivo* en el curso de una infección natural.

### **1.3 Sistema inmune de mucosas**

La superficie de mucosa se encuentra formada principalmente por células epiteliales especializadas en funciones indispensables para la vida del organismo tales como la absorción, el transporte y la secreción de moléculas, sin embargo, también funciona como una barrera que protege al individuo de posibles agresiones medioambientales manteniendo una estrecha comunicación con el medio exterior.

La superficie de la mucosa, por su ubicación anatómica, se encuentra continuamente expuesta a millones de antígenos que incluyen antígenos alimenticios pero también de microorganismos comensales, además es considerada como el principal portal de entrada para organismos patógenos. Por esta razón, las mucosas poseen un sistema inmune propio altamente especializado que mantiene el balance entre la respuesta y la tolerancia hacia los antígenos (Iwasaki and Kelsall 1999; Johansson and Kelsall 2005). En los mamíferos, el tejido linfóide asociado a las mucosas MALT (del inglés: mucosa-associated lymphoreticular tissues), se encuentra localizado en el tracto respiratorio y digestivo, en el tracto urogenital, en la conjuntiva del ojo y en oído interno. Para su estudio, los MALT se subdividen a su vez según su localización en BALM (del inglés: bronchus-associated lymphoid tissues) en el caso de vías aéreas inferiores, en NALT (del inglés: nasal-associated lymphoid tissues) en las vías aéreas superiores y en GALT (del inglés: gut-associated lymphoid tissues) en el intestino, el cual se describe más adelante (Iwasaki 2007).

Debido a la complejidad y la gran cantidad de antígenos de diversos orígenes que entran en contacto con la mucosa, los MALT se encuentran organizados en sitios inductores y sitios efectoros de la respuesta inmune, ambos sitios mantienen estrecha comunicación y poseen diversas poblaciones celulares, en distintos estadios de diferenciación y con funciones inmunológicas diferentes.

Los sitios inductores de la respuesta inmune en las mucosas, constan de pequeños órganos denominados folículos linfoides, y en el caso particular de la mucosa intestinal se denominan PPs, sitios en donde se concentran a la mayoría de las células T y B vírgenes del sistema inmune adquirido de la mucosa intestinal. Estos órganos poseen una gran comunicación con los antígenos que entran en contacto con el epitelio en las mucosas, esto gracias a la presencia de células epiteliales especializadas en el transporte de antígenos denominadas como células M (del inglés: microfold) y a algunas poblaciones de DCs capaces de muestrear el lumen directamente mediante proyecciones citoplasmáticas que

pasan a través de las uniones estrechas del epitelio (Milling, Yrlid et al. 2010). Los antígenos transportados a través de las células M a los folículos linfoides son captados por las CPAs y pueden activar a las células B residentes de los folículos (Niedergang and Kweon 2005). Este muestreo constante de antígenos, permite mantener un estado de vigilancia continuo para que, ante cualquier señal de peligro, el potencial organismo patógeno pueda ser rápidamente eliminado. Otro órgano importante en el mantenimiento de la respuesta inmune intestinal es el ganglio linfático mesentérico (GLM), que a diferencia de las PPs no se encuentra en contacto íntimo con los antígenos del lumen intestinal, por lo que depende de la migración continua de células de la LP al GLM, este órgano es el principal inductor de tolerancia hacia los antígenos orales (Macpherson and Smith 2006).

El sitio efector de la respuesta inmune de mucosas es la LP. La LP es una delgada capa de tejido conectivo que se encuentra por debajo de las células epiteliales y posee una gran cantidad de células que mantienen una estrecha comunicación con los folículos linfoides vecinos a través de los vasos linfáticos. En la LP, las células del sistema inmune previamente activadas en los sitios inductores llevan a cabo su función: la secreción de citocinas por parte de las células Th, la eliminación de células infectadas en el caso de las células Tc, y la producción de anticuerpos por parte de las células B. Así mismo, en la LP se encuentran células CPAs y dentro de estas las DCs y los macrófagos encargados de mantener el delicado balance entre la respuesta y la tolerancia. Las fallas en el sistema inmune de mucosas conllevan a la aparición de enfermedades inmunes tales como alergias, hipersensibilidad e inflamación crónica (Neurath, Finotto et al. 2002).

### **1.3.1 Inmunidad de la mucosa intestinal**

Por su naturaleza, la mucosa intestinal se encuentra en contacto continuo con millones de antígenos de origen alimenticio y de bacterias comensales por lo que su sistema inmune realiza funciones sumamente complejas de diferenciación entre los antígenos inocuos de los potencialmente patógenos. La mucosa intestinal es la

primera barrera de defensa contra múltiples patógenos intestinales, incluyendo los virus, con los cuales está en contacto permanente. (Iwasaki and Kelsall 1999; Johansson and Kelsall 2005).

En el caso de los GALT existen dos órganos principales que llevan a cabo el mantenimiento del balance entre la respuesta y la tolerancia, las PPs y GLM, ambos considerados como los principales sitios inductores de la respuesta, sin embargo, existen otras pequeñas estructuras linfoides asociadas entre las que se encuentran los folículos linfoides aislados (FLAs) y las criptoplasmas (CPs) que participan en conjunto con las PPs y el GLM (Nagler-Anderson, Terhoust et al. 2001; Williams 2006) en el mantenimiento del balance de la respuesta inmune en la mucosa intestinal (Fig. 4). Las células T y B activadas por las DCs intestinales en los sitios inductores como las PPs y el GLM adquieren la expresión de diferentes “homing receptors” en su superficie que les permite migrar a la LP, sitio efector en la mucosa intestinal. Estos receptores incluyen a la integrina  $\alpha 4\beta 7$  la cual se une a la molécula MadCAM-1 expresada en las HEV en el intestino, y el receptor CCR9 que responde a la quimiocina CCL25 expresada constitutivamente en el intestino delgado (Kelsall 2008). Así mismo, la superficie de mucosas cuenta con una línea de defensa bajo la capa de moco constituida por los linfocitos intraepiteliales (LIE) (Nonaka, Naito et al. 2005). Estos linfocitos se encuentran distribuidos entre las células epiteliales y funcionan manteniendo la homeostasis y la integridad del epitelio cuyas características se describen más adelante.

### ***1.3.1.1 Ganglio linfático mesentérico.***

Debido a que la presentación de antígenos orales se lleva a cabo principalmente en el GLM, éste se considera como el principal órgano en la inducción de tolerancia hacia proteínas alimenticias y de antígenos provenientes de organismos comensales. Esta tolerización hacia los antígenos alimenticios se lleva a cabo gracias a la estrecha comunicación que mantiene el GLM con el lumen intestinal mediante la migración de DCs cargadas con antígeno provenientes de la LP. La

función tolerizante del GLM fue comprobada utilizando ratones sin GLM y con ganglios linfáticos periféricos en donde no era posible inducir tolerancia hacia los antígenos orales (Bilsborough and Viney 2004). Sin embargo, a diferencia de los anteriores, en ratones sin PPs, la tolerancia hacia antígenos orales no se ve afectada, corroborando así que el GLM es el principal sitio inductor de la tolerización de las células T hacia antígenos alimenticios y de bacterias comensales.

Por otra parte, los antígenos alimenticios no son la única carga antigénica del intestino, además existe una gran cantidad de antígenos no patogénicos provenientes de las bacterias comensales. La tolerancia oral no es tan efectiva para antígenos particulados como lo es para proteínas solubles, aun más difícil para bacterias vivas las cuales son extremadamente inmunogénicas. Afortunadamente, el sistema inmune se mantiene ignorante ante estos antígenos a pesar de la gran cantidad de bacterias están presentes en el intestino.

La tolerancia hacia antígenos orales se lleva a cabo gracias a la compartimentalización de la respuesta inmune de mucosas, ya que gracias a la función de barrera del GLM, no se requiere de la tolerización sistémica hacia antígenos microbianos intestinales que pudiera suprimir la habilidad de responder ante una sepsis. El GLM es capaz de detener la entrada constante de antígenos de microorganismos intestinales, los cuales podrían desencadenar una respuesta sistémica. Si alguna bacteria escapa de las DCs cargadas del lumen intestinal, ésta es eliminada por los macrófagos residentes del GLM. Esto fue corroborado en ratones sin GLM, los cuales fueron retados con bacterias comensales de manera sistémica o utilizando DCs cargadas con bacterias que pasan al ducto torácico. Estos ratones rápidamente desarrollaron esplenomegalia y linfadenopatías. Por lo anteriormente expuesto, el GLM es considerado como un sitio clave dentro de la fisiología del sistema inmune, ya que actúa como una barrera que preserva la ignorancia sistémica hacia los antígenos orales actuando como un sitio de inducción de tolerancia inmunogénica, más que un órgano exclusivo de inducción



de una respuesta contra los antígenos por sí mismo (Macpherson and Smith 2006).

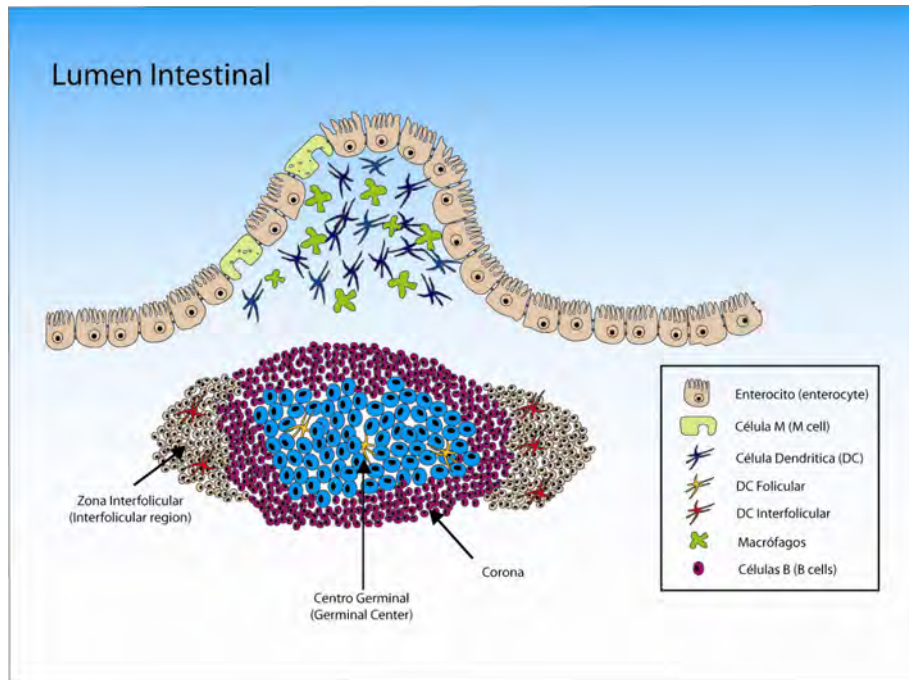
#### **1.3.1.2 Placas de Peyer.**

Las PPs constituyen una serie de pequeños órganos distribuidos a lo largo del intestino delgado que participan de manera muy importante en la detección y eliminación de patógenos, en el establecimiento de la simbiosis con diversos microorganismos, así como en la producción de anticuerpos IgA que actúan bloqueando la entrada y el ataque de organismos patógenos al organismo (Sakaguchi, Brand et al. 2001).

Morfológicamente, las PPs se separan en tres regiones principales: el área folicular, el área parafolicular y el epitelio asociado a folículo (FAE) (Fig. 3). Los enterocitos del FAE expresan constitutivamente la quimiocina CCL20. En condiciones normales, CCL20 es producida por células intestinales del FAE pero no por células de las vellosidades (Tanaka *et al.* 1999; Iwasaki and Kelsall 2000; Cook *et al.* 2000). El hecho de que CCL20 tenga una actividad quimiotáctica para células B vírgenes y linfocitos T y DCs que expresan el receptor CCR6 sugiere que puede estar involucrada en la formación y/o mantenimiento de tejidos mucosos linfoides organizados. El FAE mantiene una comunicación estrecha entre los contenidos del lumen intestinal y el sistema inmune residente en las PPs, esta comunicación se da gracias a células especializadas llamadas células M, enterocitos especializados, los cuales han perdido sus microvellosidades y se encargan del transporte de antígenos lumbinales hacia el interior de las PPs (Niedergang and Kraehenbuhl 2000). Las células M optimizan la adherencia y el transporte de antígenos indiscriminadamente, y son sitios vulnerables para la entrada de varios patógenos al organismo (Niedergang and Kraehenbuhl 2000; Gullberg and Soderholm 2006; Kyd and Cripps 2008).

Las PPs poseen un gran número de folículos de linfocitos B rodeados por un área de linfocitos T, donde además de células T se encuentran DCs y macrófagos (Fig. 3). Histológicamente se ha descrito una capa única de células epiteliales que recubren los folículos, formando un domo debajo de las vellosidades denominado FAE. Este epitelio mantiene una comunicación directa entre los contenidos luminales y el sistema inmune presente en las PPs y es en este sitio anatómico donde se encuentran las CPAs captando antígeno del lumen intestinal. Una vez dentro, los antígenos, patógenos o no, interactúan con las CPAs (Sakaguchi, Brand et al. 2001) las cuales se alojan por debajo del FAE en el SED (Shreedhar, Kelsall et al. 2003) la región subyacente al FAE (Shreedhar, Kelsall et al. 2003), iniciando así la respuesta inmune en las PPs debido a que las DC presentan el antígeno a las células del sistema inmune adquirido (células T y B).

Dentro de las PPs, se lleva a cabo la inducción de la producción de IgAs intestinales gracias a la interacción de los linfocitos B con las DCs intestinales. Como se describió anteriormente, las DCs intestinales inducen el cambio de isotipo en los linfocitos B a través de la secreción de las moléculas BLyS y APRIL, que se unen a sus ligandos expresados en los linfocitos B (BCMA y BAFF-R), en presencia de IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CD40L o LPS (Litinskiy, Nardelli et al. 2002), proceso potenciado en presencia de IL-15. Estas células B activadas recirculan a través de los ganglios y la sangre periférica y por la expresión de los "homing receptors", regresan a la LP intestinal como células plasmáticas productoras de IgA. La inducción de células B ocurre mayoritariamente en las PPs, por lo que en ratones donde el GLM ha sido removido, la producción de IgA contra los organismos comensales *in vivo* no se ve alterada (Macpherson and Smith 2006).



**Figura 3.** Estructura básica de una PP murina. Las PPs se encuentran por debajo del epitelio del intestino delgado y son sitios inductores de la respuesta inmune, por tanto tienen una gran concentración de células T y B vírgenes, así como una serie de CPAs que incluyen diferentes subpoblaciones de DCs. Así mismo, cuentan con las células M, células encargadas de traslocar antígenos al interior de las PPs para ser captado por las DCs ahí presentes. Figura tomada y modificada de Mowat, 2003.

### **1.3.1.3 Criptoplasmas y folículos linfoides aislados.**

Las CPs fueron descritas en 1996 por Ischikawa y sus colegas como pequeños racimos de linfocitos cercanos a las criptas intestinales (Kanamori, Ishimaru et al. 1996). El número de estas criptas puede ser de varios cientos a lo largo del intestino del ratón y se sugiere que participan como sitios extratímicos de generación de linfocitos intraepiteliales (LIEs) (Suzuki, Oida et al. 2000; Eberl and Sawa 2009). Estos pequeños órganos poseen poblaciones celulares que expresan fenotipos asociados a progenitores linfoides,  $c\text{-kit}^+$   $IL\text{-}7R^+$   $Thy1^+$ . Así mismo, no sólo se han propuesto como generadoras de LIEs, sino como precursoras de los FLA, ya que en presencia de la microbiota, las CPs se desarrollan a FLAs por reclutamiento de células B. Otra evidencia de que las CPs funcionan como

precursoras de tejidos linfoides es que poseen células inductoras de tejidos linfoides (LTi), estas células también son encontradas dentro del GLM y las PPs. Por lo tanto, en la actualidad existen dos vertientes sobre las funciones de estas CPs, la primera es que son generadoras de otros tejidos linfoides (ej. IFLs) y por otro lado que se especializan en el desarrollo de los LIEs ya que se encuentran constituidas con un microambiente similar al de un tejido linfoide primario. Las CPs poseen un tipo de células innatas NKp46+ productoras de IL-22 (Luci, Reynders et al. 2009), estas células son críticas en la inmunidad intestinal y en la reparación de daño tisular y expresan el receptor ROR $\gamma$ . Este receptor es esencial en la organogénesis de los tejidos linfoides asociados al intestino como lo son las PPs, las CPs y los IFLs, y se expresa constitutivamente en las células LTi y en las células Th17 (Jetten and Joo 2006; Eberl and Sawa 2009; Luci, Reynders et al. 2009) .

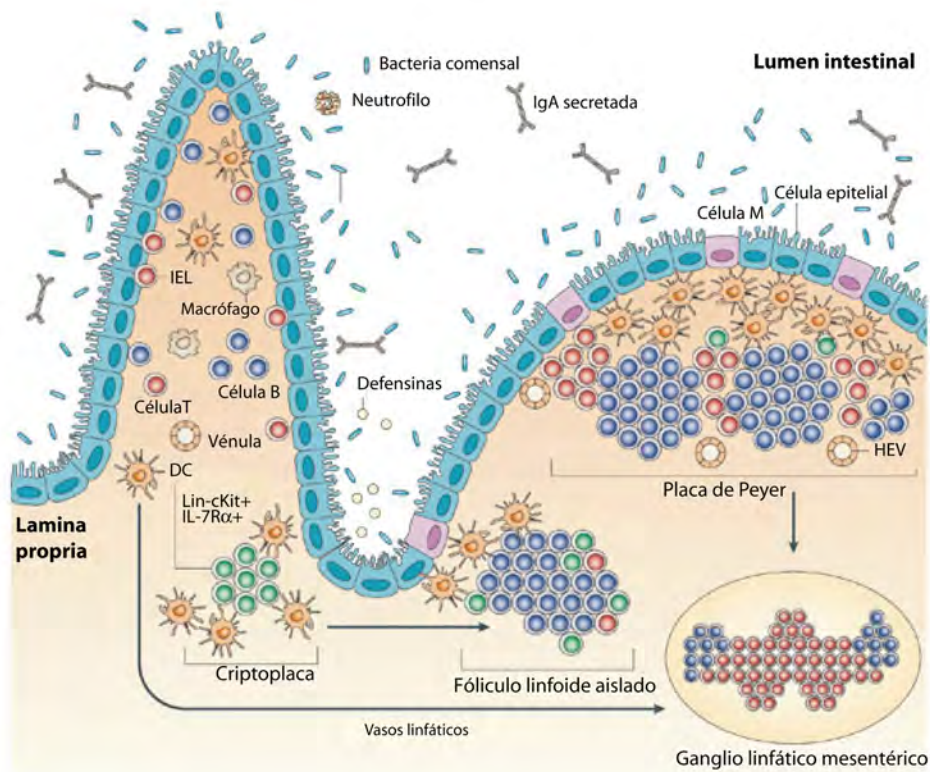
Los IFLs son órganos linfoides asociados a la mucosa y se han descrito principalmente en la LP. Estos pequeños órganos se encuentran en la submucosa por debajo de las vellosidades intestinales. Tienen los elementos de órganos linfoides secundarios, sin embargo, con una estructura morfológica más sencilla, ya que no se encuentran encapsulados. Sus funciones no son muy claras, sin embargo se sugiere que su origen es a partir de las CPs y que funcionan como sitios donde se concentran células B productoras de IgA (Kelsall 2008), células T, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, CPAs y mastocitos (Fagarasan and Honjo 2004). Además existen evidencias de que estos sitios funcionan como sitios de generación de LIE $\gamma\delta$  ya que en ratones atímicos y deficientes de todos los ganglios linfáticos y de las PPs (*nu/nu*) con excepción de los IFLs, la población de LIE $\gamma\delta$  permanece intacta (Nonaka, Naito et al. 2005).

### **1.3.1.4 Linfocitos intraepiteliales**

Los LIEs fueron descritos en 1970 por Guy-Grand y sus colegas y son considerados como células T aunque con características y fenotipo diferentes de las células T convencionales (Hayday, Theodoridis et al. 2001). Los LIEs tienen orígenes tanto tímico como extratímico, son grupos heterogéneos de linfocitos T con un fenotipo sumamente complejo que incluye  $TCR\alpha\beta$  y  $T\gamma\delta$  y expresan el homodímero  $CD8\alpha\alpha$ . Su dependencia a las citocinas como IL-7 e IL-15 es muy variable (Nonaka, Naito et al. 2005). Aunque se conoce muy poco acerca de esta población celular, algunas subpoblaciones de LIEs  $TCR\alpha\beta$  secretan grandes cantidades de granzima A y B cuando están involucradas en procesos citolíticos. Por otro lado los  $TCR\gamma\delta$  de LIEs se encuentran implicados en la maduración de las células epiteliales, así mismo, participan de manera importante en la inducción de la producción de las IgA por parte de los linfocitos B que se encuentran en la LP (Nonaka, Naito et al. 2005; Eberl and Sawa 2009). Recientemente se ha descrito que los linfocitos  $T\gamma\delta$  humanos purificados de sangre periférica son capaces de fagocitar bacterias opsonizadas por anticuerpos (Wu, Wu et al. 2009). Por las características anteriormente mencionadas, los LIEs son considerados una población celular entre la inmunidad innata y la inmunidad adquirida, y de gran importancia en el mantenimiento de la homeostasis del epitelio intestinal, así como de vigilancia ante posibles agentes patógenos (Hayday, Theodoridis et al. 2001).

### **1.3.1.5 Células dendríticas intestinales.**

Las DCs intestinales se presentan a lo largo de toda la mucosa intestinal, se encuentran distribuidas tanto en sitios efectores como en sitios inductores de la respuesta con diferentes fenotipos. Diversas subpoblaciones de DCs han sido descritas en LP (Coombes and Powrie 2008), en las capas musculares y serosa frente al peritoneo (Flores-Langarica, Meza-Perez et al. 2005) y concentradas en órganos linfoides asociados al intestino como las PPs, los FLAs y en el GLM (Johansson and Kelsall 2005; Kelsall 2008).



Nature Reviews | Immunology

**Figura 4.** Organización de los órganos y células linfoides de la mucosa intestinal. Modificado de Eberl, 2005.

La mucosa intestinal posee un microambiente único que hace que las DCs intestinales sean diferentes tanto en fenotipo como en función con respecto a las de las DCs convencionales. Las DCs intestinales producen y responden a diferentes quimiocinas presentes constitutivamente en las mucosas como CCL25, cuyo receptor CCR9 se encuentra presente en las DCs intestinales. Así mismo, las DCs intestinales en estado inmaduro expresan CCR5 y CCR6, y una vez activadas expresan CCR7 y CCR9 que les permiten migrar y entrar a los órganos linfoides asociados a la mucosa como el GLM (Iwasaki 2007).

Recientemente, las subpoblaciones de DCs de LP han sido ampliamente estudiadas y se diferencian del resto porque además de expresar la integrina CD11c, expresan la integrina  $\alpha E\beta 7$  (CD103) y la molécula CX3CR1. Estas subpoblaciones tienen precursores y funciones diferentes que se complementan para el buen funcionamiento del sistema inmune de la mucosa intestinal (Bogunovic, Ginhoux et al. 2009).

Las DCs CD11c<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> tienen una alta capacidad de inducir la expresión de “homing receptors” hacia el intestino sobre los linfocitos T y B por un mecanismo dependiente del ácido retinoico (Kelsall 2008) y promueven la generación de células Treg FoxP3<sup>+</sup> a través de la secreción de TGF- $\beta$ . Su origen se ha determinado que es a partir de un precursor de origen no monocítico denominado pre-cDC y su desarrollo y diferenciación responden al factor de crecimiento Flt3 (FMS-like tyrosine kinase 3) (del Rio, Bernhardt et al. 2010).

Por otro lado, las células CD11c<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup> provienen de un precursor monocítico que responde al M-CSF (Factor monocítico estimulante de colonias) y éstas a su vez se subdividen en dos subpoblaciones gracias a la presencia o ausencia de CX3CR1. La expresión de CX3CR1 juega un papel importante en la captura directa de antígenos del lumen intestinal (Fleeton, Contractor et al. 2004) y en la activación de las células Th17. Por otro lado las células CD11<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup> CX3CR1<sup>-</sup> expresan TLR5 y promueven la producción de IgA por parte de las células B a través de la molécula APRIL (a proliferation inducing ligand) en la LP (Banchereau and Steinman 1998; Niedergang, Didierlaurent et al. 2004; Sato and Iwasaki 2005); así mismo, las DCs intestinales producen una variedad importante de citocinas y otros mediadores solubles implicados en el cambio de isotipo hacia IgA que incluyen la secreción de IL-10 y TGF- $\beta$  principalmente (Kelsall 2008; Tezuka and Ohteki 2010).

Las DCs CD103<sup>+</sup> han sido encontradas también en GLM y representan la mayoría de las DCs que presentan antígenos orales a los linfocitos T, lo que sugiere que

estas DCs se originan en LP, capturan antígeno y migran al GLM para activar a las células T (Johansson and Kelsall 2005; Coombes and Powrie 2008; Jaensson, Uronen-Hansson et al. 2008). Las DCs intestinales migran constitutivamente al GLM con antígenos de bacterias comensales y células apoptóticas. Este tráfico depende de la expresión del receptor CCR7 (Bogunovic, Ginhoux et al. 2009). De tal manera que las DCs de la LP participan activamente en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, así como en la inducción de tolerancia principalmente.

Por otra parte, en las PPs se han caracterizado diferentes subpoblaciones de DCs residentes en dichos órganos, estas células se encuentran distribuidas en la zona del FAE por debajo del SED. Las DCs de las PPs se encuentran en íntimo contacto con las células M, lo que permite la captura de antígenos provenientes del lumen intestinal. Estas DCs son productoras de IL-10 en presencia de productos bacterianos y su fenotipo es CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, lo que conlleva al desarrollo de células Treg (Iwasaki and Kelsall 2001; Iwasaki 2007). Por otro lado, existen otras subpoblaciones como CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> y una doble negativa CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> que producen IL-12 cuando son activadas vía TLR. Las células de la PPs pueden presentar también la expresión de los receptores CX3CR1 y CCR6. Las poblaciones CX3CR1<sup>+</sup> se encuentran cercanas al FAE que expresa grandes cantidades de CCL20, CCL9 y CXCL16 (Iwasaki and Kelsall 2000). Las DCs CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CCR1<sup>+</sup> se encuentran principalmente asociadas con el SED debido a que sus ligandos CCL20 y CCL9 son expresados por el FAE (Cook, Prosser et al. 2000; Coombes and Powrie 2008). Una subpoblación de DCs intestinales muy importante en el intestino y en las PPs particularmente en la región interfolicular (IFR) (Iwasaki 2007), son las pDCs intestinales, las cuales presentan baja expresión de la integrina CD11c y expresan el marcador B220. Estas células son la principal fuente de IFN-I  $\alpha$  y  $\beta$  durante infecciones virales, sin embargo se ha reportado, que en ambientes altamente regulados como el intestino y las PPs donde hay una gran cantidad de IL-10 y TGF- $\beta$ , las pDCs producen bajas cantidades de IFN-I bajo estímulo antigénico (Contractor, Louten et al. 2007). Por otro lado se ha reportado que las pDCs de



las PPs son capaces de inducir la producción de IL-10 en células Th *in vitro* y recientemente, se ha sugerido que podrían estar involucradas en la activación *de novo* de células de las Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Kelsall 2008).

Tomando en cuenta lo anterior, y destacando la participación de las DCs en las infecciones virales, en el presente trabajo evaluaremos cual es la participación de las DCs intestinales en un modelo de infección por rotavirus, ya que éstas células representan un elemento esencial en el desarrollo de la respuesta inmune intestinal. A continuación se describen, las características de rotavirus, el modelo de infección y los antecedentes de la respuesta inmune contra este patógeno intestinal.

#### **1.4 Rotavirus.**

Las gastroenteritis infantiles son de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años, tanto en países desarrollados como en países en desarrollo, siendo rotavirus el causante de aproximadamente el 40% de los cuadros diarreicos severos, los cuales de no recibir atención médica oportuna pueden tener consecuencias fatales. Se ha estimado que los rotavirus son causantes de aproximadamente 600,000 muertes al año en niños menores de 5 años en países en desarrollo (Perez-Vargas, Isa et al. 2006; Ward, McNeal et al. 2008), .

Además de la mortalidad que se presenta cada año debido a la infección por rotavirus en países subdesarrollados, los gastos médicos directos e indirectos asociados a esta enfermedad son considerables. Se ha estimado que tan sólo en los Estados Unidos se gasta alrededor de mil millones de dólares al año por esta causa (Kreusch, 1997). Cabe mencionar que rotavirus infecta también a animales neonatos de otras especies de mamíferos y aves (Burns, Krishnaney et al. 1995; Vajdy 2008), lo que también conlleva a pérdidas económicas en el área pecuaria.

Los rotavirus infectan los enterocitos maduros de las puntas de las microvellosidades del intestino delgado, provocando diarrea acompañada por vómito y fiebre, por lo que el riesgo de una deshidratación severa es muy alto. De tal forma, que el desarrollo de una vacuna capaz de proteger o al menos disminuir la severidad de la infección ha sido una prioridad en materia de salud pública (Ward, McNeal et al. 2008). En la actualidad existen dos vacunas aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration) de los EU para su aplicación en humanos, la vacuna Rotateq (Sanofi Pasteur MSD) que contiene rotavirus rearreglantes humano-bovinos de los serotipos G1, G2, G3, G4 y P1, crecidos en la línea celular Vero y la vacuna Rotarix (GlaxoSmithKline) constituida de un rotavirus humano de la cepa RIX4414 del serotipo G1 atenuado en células Vero. Sin embargo, a pesar de que estas dos vacunas han demostrado su efectividad en la disminución de la severidad en la infección y en el ingreso hospitalario por la sintomatología de la infección, sólo protegen contra algunos serotipos, limitando su protección a los serotipos más comunes. Además de que en el uso de virus con capacidad infectiva como agentes vacunales, cabe la posibilidad de que reviertan a su capacidad virulenta causando la enfermedad de la cual son responsables, por lo que la tendencia actual en el desarrollo de vacunas, es la creación de nuevas tecnologías que permitan el uso de vacunas no replicativas, cada vez más seguras y con menos efectos secundarios para los individuos vacunados (Cunliffe and Nakagomi 2005; Matthijnssens, Bilcke et al. 2009)

#### **1.4.1 Estructura y clasificación de los rotavirus.**

Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae*, son virus sin envoltura lipídica, con geometría icosaédrica, y miden aproximadamente 75 nm de diámetro. El genoma viral consiste de 11 segmentos de ARNdc que codifican para 6 proteínas no estructurales (NSP) y para 6 proteínas estructurales (VP) (Tabla 1). Las partículas virales se encuentran formadas por tres capas concéntricas de proteínas envolviendo al genoma viral. La capa más externa del virus está constituida por 260 trímeros de la proteína VP7 (37 kDa) de la cual se proyectan 60 espículas formadas por dímeros de la proteína VP4 (86 kDa). Ambas proteínas

han sido relacionadas con los eventos tempranos de la infección, específicamente con la entrada del virus a la célula. Además, son blancos de anticuerpos neutralizantes, propiedad que ha permitido clasificar a los rotavirus en diferentes serotipos. La capa intermedia del virus está formada por 260 trímeros de la proteína VP6 (45 kDa), la cual es la más abundante del virus y constituye aproximadamente el 40% del total de la proteína viral. Con base en esta proteína, los rotavirus se han clasificado en 7 grupos que se denominan de la A-G, siendo los grupos A, B y C los de mayor prevalencia en humanos, el resto se han encontrado únicamente infectando especies animales (Ramig 2004).

Epidemiológicamente, los rotavirus del grupo A son los más importantes y con base en la reactividad de anticuerpos contra las proteínas VP7 y VP4, se clasifican en 13 serotipos de la proteína VP4 (serotipo P) y 14 serotipos de la proteína VP7 (serotipo G). De igual forma, dependiendo de la presencia o ausencia de dos epítopes en VP6, se clasifican en dos subgrupos antigénicos I y II (Vajdy 2008).

La capa más interna de la partícula, se encuentra constituida principalmente por 60 dímeros de la proteína VP2 (102 kDa), esta proteína interactúa con las proteínas VP1 (125 kDa) y VP3 (88 kDa) formando el “core” del virión envolviendo al genoma viral (Fig. 5). Las 6 NSPs, se encuentran implicadas tanto en la replicación como en la morfogénesis del virus dentro de las células infectadas (Arias and López 2001) (Tabla 1).

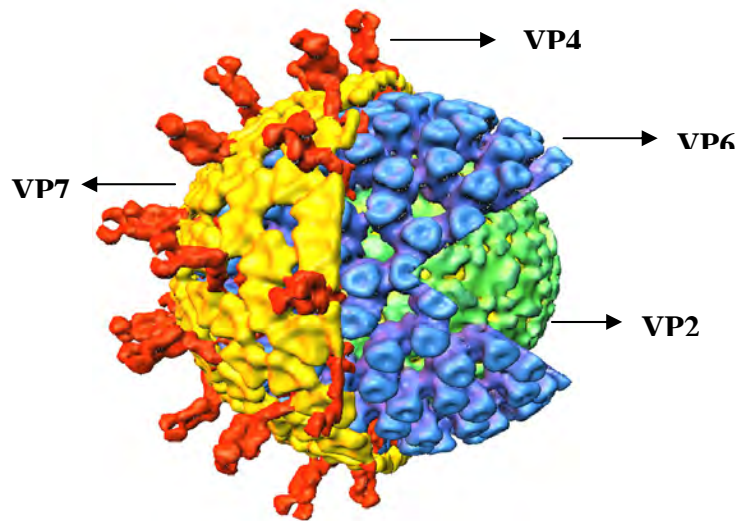
#### **1.4.2 Ciclo de replicación de los rotavirus.**

Los eventos necesarios para que se lleve a cabo una infección exitosa por rotavirus son: la unión del virus a la célula, la penetración de la partícula viral, el desensamblaje de la capa externa de la partícula viral para dar origen a partículas de doble capa (DLP), la transcripción y traducción del genoma viral y por último el ensamblaje y liberación de nuevas partículas virales. Los mecanismos del cómo se llevan a cabo cada uno de estos eventos han sido estudiados principalmente en

modelos *in vitro*. Estos modelos han permitido la la identificación y caracterización de los receptores celulares para rotavirus (Lopez and Arias 2004).

**Tabla 1.** Proteínas codificadas por los 11 segmentos de ARNdc del genoma de rotavirus y sus principales características. Basado en Arias et al., 2001.

Segmento de RNA	Proteína codificada	Función
1	VP1	Proteína interna localizada en el “core” del virión Se une al RNA RNA-Transcriptasa
2	VP2	Capa interna del virión Se une a RNA
3	VP3	Capa interna del virión Guaniltransferasa Metiltransferasa
4	VP4	Capa externa del virión Hemaglutinina Blanco de anticuerpos neutralizantes Se une a los receptores celulares Proteína fusogénica
5	NSP1	Proteína no estructural Se une al RNA Regula al factor de transcripción IRF
6	VP6	Proteína estructural de la capa intermedia del virus Proteína mas abundante Con gran homología entre las diferentes cepas de rotavirus Altamente inmunogénica
7	NSP3	Proteína no estructural Se une al RNA Controla la transcripción
8	NSP2	Proteína no estructural Se une al RNA y a NSP5 Participa en la formación de viroplasmos
9	VP7	Proteína estructural de la capa externa del virus Blanco de anticuerpos neutralizantes
10	NSP4	Glicoproteína transmembranal no estructural Enterotoxina
11	NSP5	Proteína no estructural fosforilada Se une a NSP2 y NSP6
11	NSP6	Proteína no estructural, Se une a NSP5



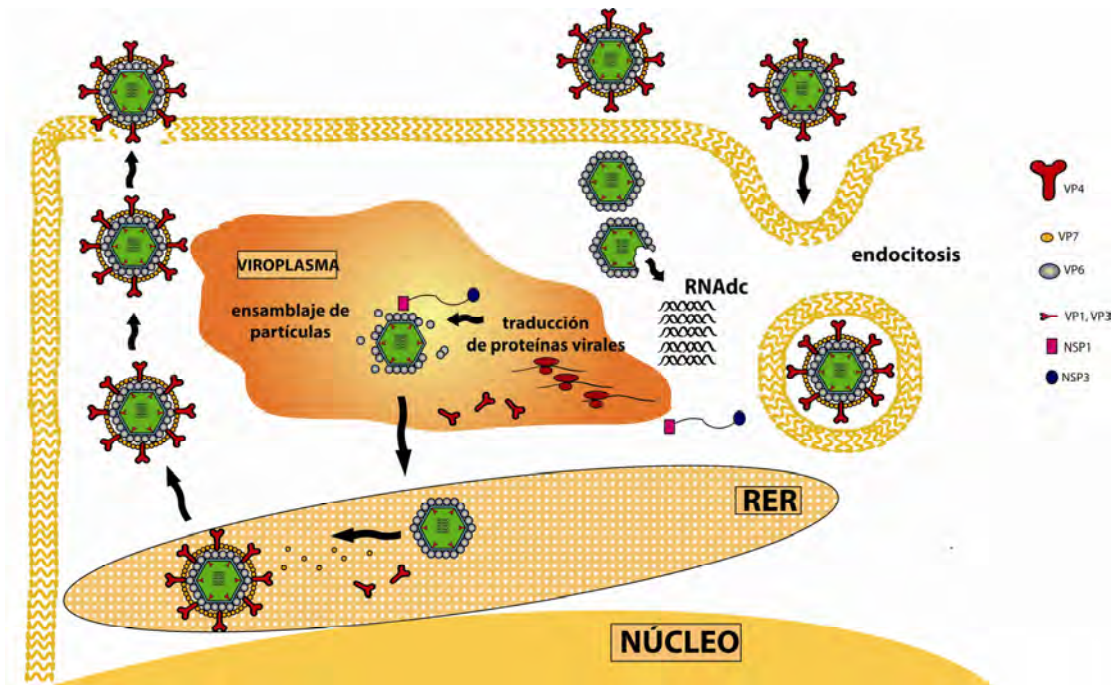
**Figura 5.** Reconstrucción a partir de la criomicroscopia electrónica de rotavirus. Partícula viral de tres capas de proteínas. La capa más externa se encuentra conformada por las proteínas VP4 y VP7, la capa intermedia por la proteína VP6 y el “core” del virión por las proteínas VP2, VP1 y VP3 (Patton and Spencer 2000).

El proceso de unión y de entrada de rotavirus a las células consiste de una serie de pasos que involucran a las proteínas de la capa externa del virus VP4 y VP7, al corte de la proteína VP4 con tripsina generando dos dominios denominados como VP5 y VP8 y a la participación de varias moléculas celulares, incluyendo al ácido siálico (AS), las integrinas  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha x\beta 2$ , la proteína de choque térmico (hsc) 70 y algunos gangliósidos. El AS externo es requerido por algunas de las cepas de rotavirus (neuraminidasa (NA)-sensibles) para unirse a la superficie celular, ésta unión es mediada por la proteína VP8. Una vez establecida la unión con el AS, VP5 se une a la integrina  $\alpha 2\beta 1$ . Recientemente se ha reportado, que sin importar la molécula que utilizan los virus sensibles o no sensibles al tratamiento con NA en su primera interacción con la célula, ambos tipos de virus interaccionan en un paso posterior a la unión inicial con la integrina  $\alpha v\beta 3$  y con la proteína de choque térmico Hsc70, aunque su papel en la penetración del virus hacia el interior de la célula no ha sido determinado, y tampoco se ha determinado si existen otras moléculas involucradas en este proceso. En la actualidad se sabe de la existencia de microdominios funcionales de lípidos en la membrana celular conocidos como balsas lipídicas o “rafts”. Estas balsas se encuentran constituidas principalmente por colesterol, gangliósidos y algunas glicoproteínas específicas, y

son necesarias para la infección por rotavirus, ya que al remover el colesterol presente en estos dominios, las células ya no son infectadas, razón por la cual, se sugiere que los receptores de rotavirus se encuentran concentrados en este tipo de estructuras dependientes de la presencia de colesterol (Isa, Gutiérrez et al. 2008). Posterior a la unión, el virus penetra hacia el interior de la célula huésped. Mediante observaciones de microscopía electrónica se han sugerido dos posibles vías de entrada, la endocitosis y la penetración directa (Sanchez-San Martín, Lopez et al. 2004). Recientemente, se ha demostrado que independientemente de la cepa de rotavirus, la proteína hsc 70, la dinamina y el colesterol, se requieren para la entrada de rotavirus a la célula, y que las cepas humana Wa, la porcina TRF-41 y la bovina UK entran a la célula mediante endocitosis mediada por clatrina (Gutiérrez, Isa et al. 2010). Por otra parte, utilizando células polarizadas MDCKII (células de riñón de perro) infectadas con diferentes cepas de rotavirus, se demuestra que rotavirus tiene la capacidad de infectar tanto de manera apical como de manera basolateral, teniendo preferencia por ésta última, ya que las integrinas utilizadas como receptores por el virus se encuentran en las uniones estrechas de las células epiteliales en la región basolateral (Realpe, Espinosa et al. 2010).

Independiente al proceso de entrada del virus, una vez dentro de la célula éste pierde su capa externa, capa formada por las proteínas VP4 y VP7, quedando una partícula de doble capa (DLP) transcripcionalmente activa. Los ARNm virales son sintetizados dentro de estas partículas, gracias a las proteínas VP1 y VP3. Los ARNs sintetizados en las DLPs funcionan como plantillas para la traducción de las proteínas virales y también para la síntesis de los ARN complementarios para la replicación del genoma. La traducción de los ARNm de los rotavirus se efectúa tanto en polisomas libres como unidos al RE. Posteriormente, se lleva a cabo el empaquetamiento y morfogénesis de las DLPs, este proceso se lleva a cabo en los viroplasmos, sitios electrodensos en el citoplasma con una alta concentración de proteínas virales. Las DLPs formadas abandonan el viroplasma y mediante la gemación al RE adquieren una membrana externa en donde finalmente se

formaran las partículas maduras o de triple capa (TLPs). El ciclo replicativo anteriormente descrito, ha sido caracterizado principalmente en las células MA104 *in vitro*. Esta línea celular, derivada de células epiteliales de riñón de mono, es una de las más susceptibles a la infección por rotavirus y ha sido ampliamente utilizada para caracterizar bioquímicamente a estos virus (Fig. 6) (Arias and López 2001).



**Figura 6.** Entrada y del ciclo replicativo de rotavirus en células MA104 *in vitro*. El primer evento para que se lleve a cabo la infección por rotavirus es el reconocimiento de sus receptores por parte de las proteínas de la capa externa, posteriormente la entrada, de la cual se han sugerido dos vías, una la penetración directa y la segunda, mediada por endocitosis. Posteriormente, las TLPs pierden su capa externa dando origen a las DLPs, partículas transcripcionalmente activas. Las proteínas virales así como el ARNdc de las nuevas partículas virales recién sintetizadas son ensamblados en los viroplasmata formando DLPs las cuales posteriormente geman al RE donde adquieren la capa externa. Modificado de Arias y López, 2001.

### **1.4.3. Modelo murino de infección por rotavirus.**

Rotavirus infecta varias especies de mamíferos, tales como, ratones, conejos, cerdos y bovinos, los cuales se han propuesto como modelos predictivos del desarrollo de la inmunidad que se presenta durante la infección con rotavirus en el humano (Feng, Franco et al. 1997).

El modelo murino de infección por rotavirus en ratones adultos fue desarrollado y descrito por Richard Ward en 1990 (Ward, McNeal et al. 1990). Este modelo ha permitido el estudio detallado de los elementos de la respuesta inmune que participan en la resolución de la infección tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, cabe mencionar que en los ratones, tanto el neonato como el adulto son susceptibles a la infección, pero sólo en los neonatos se desarrolla diarrea. En el ratón adulto el virus, a pesar de no presentar los síntomas de una gastroenteritis por rotavirus, es excretado en las heces en grandes cantidades. Esta característica permite medir de manera indirecta la replicación viral en el intestino, funcionando como un parámetro para determinar la infección. Así mismo, en el ratón adulto, todos los elementos de la respuesta inmune participan activamente en la eliminación del virus, lo que ha permitido el estudio detallado de la respuesta inmune contra la infección tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por otra parte, los ratones son susceptibles a infectarse por rotavirus tanto por cepas homólogas, es decir especie-específicas, como por cepas heterólogas, que generalmente infectan otras especies como lo son el simio, el bovino y el humano. Esta flexibilidad ha permitido el análisis de una amplia variedad de elementos y de respuestas en diferentes contextos de infección y de edad, permitiendo establecer condiciones ideales de infección y de selección de cepas potencialmente vacunales (Vajdy 2008).

El modelo murino de infección por rotavirus permite el estudio de una infección natural bajo condiciones controladas llevando un seguimiento de la infección mediante la detección de antígeno viral excretado en heces y por último realizar



ensayos de reto y de protección. Al ser una infección aguda, de rápida resolución y que genera protección en ratones adultos normales, permite el estudio detallado de la respuesta inmune intestinal y sistémica generada contra este virus, antes, durante y después de la infección. Por otra parte, la gran cantidad de cepas de ratones transgénicos y KO, permiten determinar la participación de proteínas y tipos celulares de manera más específica (Vajdy 2008). Sin embargo, los conocimientos generados en este modelo han sido básicamente sobre la respuesta protectora, es decir de la participación de la inmunidad adquirida, mientras que los elementos de la respuesta inmune innata han sido poco estudiados en el modelo *in vivo*.

#### **1.4.4 Respuesta inmune contra la infección por rotavirus.**

##### **1.4.4.1 Inmunidad adaptativa en la infección por rotavirus.**

Los mecanismos inmunológicos que intervienen en la resolución de la infección por rotavirus no son del todo claros, sin embargo, en una infección por rotavirus se induce una potente respuesta de anticuerpos séricos e intestinales tanto en humanos como en los diferentes modelos animales, siendo la producción de anticuerpos uno de los factores más importantes en la protección, ya que la presencia de anticuerpos IgA's en mucosas, se correlacionan con la respuesta protectora probablemente por un efecto neutralizante, ya sea de manera homotípica o heterotípica. Así mismo, se ha sugerido que las IgA's específicas contra VP6, anticuerpos no neutralizantes, podrían estar bloqueando la infección dentro de la célula epitelial durante el proceso de transcitosis necesario para ser vertidos al lumen intestinal (Burns, Siadat-Pajouh et al. 1996), ya que en ratones (cadena J $\gamma$ ) que poseen un defecto en el receptor polimérico de Ig (pIgR) responsable de la transcitosis de las IgG e IgM al lumen de las mucosas, cuando son inmunizados intranasalmente con VLPs compuestas por las proteínas VP2 y VP6, no desarrollan protección al reto con rotavirus silvestre en comparación con

los ratones normales, los cuales presentan una protección completa ante el reto con rotavirus (Schwartz-Cornil, Benureau et al. 2002).

En lo que respecta al papel que juegan las células Th en el modelo del ratón, se ha encontrado que VP6 es un antígeno blanco importante en ratones BALB/c inmunizados con rotavirus (Burns, Siadat-Pajouh et al. 1996; Banos, Lopez et al. 1997). En 2000, Banos et. al, determinaron que las regiones que van de los aminoácidos 1-192 y 176-397 contienen al menos dos epítopes de células Th y que la particularmente la secuencia 289-302aa se encuentra altamente conservada en las diferentes cepas de rotavirus, lo que genera un reconocimiento heterotípico por parte de las células Th (Banos, Lopez et al. 1997). A nivel funcional se sabe que las células Th son importantes en la inducción de células B secretoras de IgA contra rotavirus (Franco and Greenberg 1999) y que células Th de memoria específicas para VP6 pueden potenciar la producción de anticuerpos neutralizantes por parte de las células B con especificidad para las proteínas de la capa externa de rotavirus (Esquivel, Lopez et al. 2000).

En ratones deficientes de células B y T (SCID), el 40% de ellos resuelve la infección de manera espontánea (Vajdy 2008), indicando la posible participación de los elementos de la respuesta inmune innata en la contención y en la eliminación de la infección, sin embargo en el resto permanece como infección persistente, la cual puede ser resuelta mediante la transferencia de células Tc anti-rotavirus, sin embargo, cuando las células Tc son cotransferidas con células Th específicas de rotavirus, la resolución de la enfermedad es más eficiente (McNeal, Rae et al. 1997). Así mismo, se demostró que las células Th específicas contra rotavirus pueden ejercer una función protectora directa cuando son transferidas en ratones SCID con infección crónica (Franco and Greenberg 1997).

Dado lo anterior, podemos concluir que la infección por rotavirus induce una respuesta inmune muy compleja y multifactorial, en donde participan: la producción de anticuerpos, la actividad por parte de las células Th y Tc y,

elementos de la respuesta inmune innata. Todos estos elementos al parecer son compensatorios uno del otro, sin embargo, la participación de cada mecanismo de la respuesta inmune es necesario en una infección natural para la resolución rápida y eficaz de la enfermedad y para la generación de memoria inmunológica protectora.

#### **1.4.4.2 Inmunidad innata en la infección por rotavirus.**

Los IFN-I,  $\alpha$  y  $\beta$  son producidos por todas las células somáticas nucleadas del organismo como mecanismo de defensa ante una infección viral, sin embargo, se sabe que durante un proceso infeccioso, son las pDC las principales productoras de estas citocinas (Cao and Liu 2006; Barro and Patton 2007). En el caso de la infección por rotavirus, la participación de los interferones fue evaluada utilizando ratones KO de la molécula STAT<sup>-/-</sup> molécula señalizadora indispensable de la vía de interferones. Cuando estos ratones fueron infectados con un rotavirus silvestre presentaron 100 veces más antígeno viral excretado que los ratones normales, resolviendo la infección en el mismo tiempo. Estos datos demuestran que la producción de IFN es importante en el control de la replicación viral como parte de la respuesta inmune innata, pero no en el proceso de resolución de la infección (Vancott, McNeal et al. 2003; Niedergang, Didierlaurent et al. 2004). Así mismo, la participación de los interferones ha sido evaluada en células epiteliales intestinales provenientes de ratones normales y deficientes de células T y B infectados con rotavirus, en estos casos se observó un aumento en el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) del gen de IFN- $\beta$  y de otras proteínas dependientes de IFN como IP-10 en los ratones infectados, por lo que se resalta que la producción de IFN-I por las células epiteliales infectadas, es parte importante de la respuesta inmune innata (Rollo, Kumar et al. 1999). En células en cultivo, estimuladas con VLPs o con virus completos, hay una activación en la transcripción de de NF $\kappa$ b e IFN- $\alpha$  (Rollo, Kumar et al. 1999).

Con lo que respecta a la participación de las CPAs, particularmente de la población de las DCs en presencia de rotavirus, existen algunos reportes que indican que estas células son capaces de activarse y de tomar el antígeno viral, y en algunos casos presentan replicación viral dentro de ellas, tanto *in vivo* como *in vitro*. En ensayos con DC derivadas de precursores de médula ósea en presencia de rotavirus completo y VLPs, ambos son internalizados pero sólo en presencia de partículas infecciosas se ha observado un aumento de la molécula CD86, indicando que estas células son capaces de activarse y de reconocer los elementos del virus completo, además de que induce la producción de TNF- $\alpha$  (Istrate, Douagi et al. 2007). Este resultado ha sido corroborado en nuestro laboratorio, en donde las DCs derivadas de progenitores de médula ósea en presencia de rotavirus infeccioso, aumentaron de manera significativa la molécula CD40 sobre su superficie, y se detectó la presencia de proteínas no estructurales virales dentro de las DCs, aunque en una proporción menor al 1%. En otros reportes se ha descrito que tanto macrófagos como las DCs pueden presentar replicación viral (Mesa, Rodriguez et al. 2007), sin embargo, no se ha demostrado que estas células produzcan progenie viral infecciosa, y por otra parte que sean las responsables de la viremia o antigenemia reportada en niños infectados y para algunas cepas de rotavirus en el caso del modelo murino (Fenaux, Cuadras et al. 2006; Blutt, Matson et al. 2007).

Existen muy pocos reportes que involucren a las DCs o elementos relacionados con esta población *in vivo* durante la infección por rotavirus, sin embargo, uno de ellos muestra que el receptor de quimiocinas CCR6, es importante en la generación de anticuerpos IgA específicos contra rotavirus, ya que utilizando ratones KO para esta molécula, ratones CCR6<sup>-/-</sup>, los niveles de este anticuerpo en heces son significativamente menores a los de un ratón normal infectado. Este receptor para quimiocinas se expresa en las DCs y su ligando CCL20 se expresa en el epitelio de las PPs induciendo la migración de DCs inmaduras a la región del SED. Los ratones CCR6<sup>-/-</sup> pierden la población CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> de la región del SED, sugiriendo que particularmente esta población de DCs es importante en la

inducción de la respuesta de anticuerpos intestinales contra rotavirus (Cook, Prosser et al. 2000). Por otra parte, existen algunos reportes en donde se demuestra la presencia de NSPs dentro de CPAs, particularmente en células B220<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup> y CD11b<sup>+</sup> en el GLM de ratones inoculados con rotavirus, sugiriendo una replicación viral dentro de estas células en sitios extraintestinales, aunque no descartan la posibilidad de que estas NSPs provengan de células infectadas apoptóticas tomadas por las CPAs como lo que ocurre en la infección por reovirus (Brown and Offit 1998; Fleeton, Contractor et al. 2004; Fenaux, Cuadras et al. 2006). Otro de los reportes que involucra a las CPAs sugiere la posible participación de los TLRs, particularmente el TLR4 en el reconocimiento de las proteínas virales durante la infección por rotavirus. Este ensayo involucró el uso de células B, las cuales poseen un defecto en el ensamblaje de su BCR y por lo tanto no pueden reconocer antígeno específicamente. Estos ensayos fueron realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, sugiriendo la posible participación del TLR4, señalización y activación de las células B por una vía independiente al BCR. En estas células, la presencia de rotavirus induce un aumento en la expresión del marcador de activación CD69 sobre las células B sin BCR. Utilizando ratones TLR4<sup>-/-</sup>, los niveles de CD69 después de la exposición con el virus son sumamente bajos en comparación con las células B de los ratones normales. Por otro lado, al estimular células B *in vitro* con VLPs (pseudopartículas virales) constituidas por diferentes proteínas estructurales de rotavirus (2/6, 2/6/7, 2/6/4/7), la proteína VP7 fue indispensable en la activación de las células B, sugiriendo una interacción entre TLR4 y VP7 (Blutt, Warfield et al. 2002).

De tal manera que con los antecedentes anteriores, podemos concluir que la participación de las CPAs, específicamente de las DCs resulta necesaria tanto en el reconocimiento de los elementos virales, como en la participación activa en el control de la infección por rotavirus.

## 2. JUSTIFICACIÓN.

El estudio de la respuesta inmune contra rotavirus se ha enfocado principalmente a la caracterización de la respuesta inmune adquirida y de los elementos protectores de la misma. En la actualidad se ha demostrado que tanto los anticuerpos IgA secretores como las células Tc rotavirus-específicas son importantes en la contención y resolución de la infección, así mismo, las células Th específicas son necesarias en la inducción de una eficiente respuesta de células B y Tc. Por otro lado, poco se sabe acerca de la participación de las células de la respuesta inmune innata durante el transcurso de esta infección, y siendo rotavirus un patógeno intestinal, resulta de vital importancia el estudio de los mecanismos por los cuales este virus es reconocido por el sistema inmune innato del intestino durante las etapas iniciales de la infección, ya que de este reconocimiento depende en gran medida la eficiente activación de las células del sistema inmune adquirido y por lo tanto la resolución de la infección y el desarrollo de la respuesta protectora. Dentro de las células del sistema inmune innato del intestino, destacan las DCs de las PPs. Estas células participan activamente en el reconocimiento de los patógenos intestinales, iniciando la respuesta antiviral mediante la secreción de citocinas y en la activación de las células T vírgenes presentes en las PPs.

Por otra parte, en el caso de la infección por rotavirus se ha descrito un mecanismo de evasión de la respuesta inmune innata en células infectadas *in vitro*. Este mecanismo consiste en la degradación de los factores de transcripción IRFs, (IRF3, IRF5 e IRF7) necesarios en la producción de IFN-I, por la proteína NSP1 sintetizada durante el ciclo replicativo del virus. Los factores IRFs son sintetizados en las DCs de manera constitutiva, característica que las convierte en las principales productoras de IFN-I durante las infecciones virales. Sin embargo, el mecanismo propuesto de evasión no ha sido demostrado durante una infección *in vivo*. De tal manera que el estudio de la activación y la producción de citocinas de las DCs intestinales, así como su susceptibilidad a la infección por rotavirus en

nuestro modelo, sugeriría la posibilidad de que rotavirus es capaz de degradar los factores IRFs inhibiendo la producción de IFN-I debilitando la respuesta antiviral. Por esta razón, el estudio de las DCs intestinales *in vivo* durante la infección por rotavirus resulta de gran importancia para entender los mecanismos de la respuesta inmune intestinal, así como de los elementos protectores anteriormente descritos tanto en modelos *in vitro* como en nuestro modelo.

### **3. HIPÓTESIS.**

Las células DCs intestinales de las PPs son capaces de reconocer los componentes de rotavirus durante las etapas tempranas de la infección *in vivo*. Este reconocimiento conlleva a cambios en las DCs reflejados en un aumento en el número absoluto dentro de las PPs, a una redistribución dentro de las PPs y al aumento en la cantidad de moléculas coestimuladoras sobre su superficie. Así mismo, posterior a la activación, las DCs de las PPs aumentarán su producción de citocinas, proinflamatorias y reguladoras. Estos cambios sobre las DCs de las PPs son dependientes del tiempo de infección y de la replicación viral.



## 4. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el número absoluto, porcentaje y distribución de las DCs dentro de las PPs del intestino delgado, así como el estado de activación y producción de citocinas por dichas células como consecuencia de la infección por el rotavirus silvestre murino EDIM durante las primeras 48 horas en un modelo *in vivo*.

### 4.1 Objetivos particulares.

1. Determinar el porcentaje y número de las células totales de las PPs de las diferentes regiones anatómicas del intestino delgado, dudodeno, yeyuno e íleon de ratones infectados con rotavirus silvestre de la cepa murina EDIM, a las 0, 24 y 48 horas p.i.
2. Establecer el porcentaje y número absoluto de las principales poblaciones de células linfoides de las PPs por región anatómica del intestino, provenientes de ratones infectados con rotavirus silvestre de la cepa murina EDIM, a las 0, 24 y 48 horas p.i.
3. Establecer el porcentaje y número absoluto de las principales poblaciones activadas en las PPs por región anatómica del intestino, provenientes de ratones ratones infectados con rotavirus silvestre de la cepa murina EDIM, a las 0, 24 y 48 horas p.i.
4. Determinar el porcentaje y número de DCs en las PPs por región anatómica en ratones infectados o inoculados con virus inactivado con luz U.V., a las 0, 24 y 48 horas p.i.
5. Establecer la cinética de activación de las DCs de las PPs por región anatómica del intestino en ratones infectados o inoculados con virus

inactivado con luz U.V., a las 0, 24 y 48 horas p.i. evaluando la cantidad de moléculas coestimuladoras sobre su superficie.

6. Determinar mediante microscopía la distribución de las DCs en las PPs de la región del yeyuno de ratones infectados o inoculados con virus inactivado con luz U.V., a las 0, 12, 24 y 48 horas p.i.
7. Determinar por ensayos de inmunofluorescencia la replicación viral en las DCs de las PPs durante las primeras 48 horas p.i.
8. Purificar las DCs provenientes de las PPs de ratones infectados a las 24 y 48 horas p.i. y determinar los niveles de ARNm para las citocinas IFN- $\beta$ , IL-10, IL-12/IL-23p40 y TNF- $\alpha$ .

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 5.1 Animales.

Se utilizaron ratones hembras BALB/c (H-2<sup>d</sup>) de 4-8 semanas de edad, mantenidos libres de patógenos (Bioterio IBT-UNAM), los cuales se mantuvieron en contenedores de policarbonato en condiciones estándares de luz/oscuridad, con alimento y agua *ad libitum*. Mediante un ELISA se comprobó la ausencia de anticuerpos séricos específicos contra rotavirus para descartar infecciones previas.

### 5.2 Virus.

La cepa de rotavirus murino silvestre EDIM fue donada gentilmente por el Dr. Richard Ward (Children's Medical Center, Cincinnati, OH). El virus fue propagado infectando ratones neonatos de tres días de nacidos con  $1 \times 10^4$  unidades formadoras de focos (uff) del reservorio original. Al día 5 p.i. los ratones fueron sacrificados y los intestinos fueron extraídos y homogenizados en TNC (10 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>). Los homogenizados intestinales fueron titulados en células MA104 (ATCC: CRL-2378<sup>TM</sup>) (células epiteliales de riñón de macaco) mediante la técnica de conteo de focos por peroxidasa (Arias, Lizano et al. 1987). Una vez obtenido el título viral, el virus fue inoculado en ratones libres de patógenos y de infecciones previas de rotavirus para corroborar la infectividad del homogenizado *in vivo* y establecer la dosis infectiva media (ID<sub>50</sub>).

### 5.3 Inactivación del virus.

El inculo viral fue preparado a una concentración de  $10^4$  uff/100  $\mu$ l de TNC en frío. Se agregó psoraleno a una concentración final de 40  $\mu$ g/ml. Posteriormente, la suspensión fue colocada sobre hielo a 10 cm de distancia de una fuente de luz U.V. de onda corta (Lamp, UVP Inc., San Gabriel, California) durante 30 minutos,

mezclando ocasionalmente con ayuda de una pipeta. El virus tratado con luz U.V., fue titulado en células MA104 en cultivo estático, siguiendo el protocolo de conteo de focos por peroxidasa (Arias, Lizano et al. 1987), obteniendo una inactivación de aproximadamente 95%. El virus sometido al tratamiento con luz U.V. más psoraleno fue inoculado en la misma dosis y condiciones que el virus silvestre no tratado.

#### **5.4 Titulación de rotavirus EDIM *in vitro* en células MA104.**

Para obtener el título viral de los homogenizados intestinales obtenidos de ratones neonatos infectados, se siguió el protocolo de conteo de focos por peroxidasa. Este protocolo fue modificado a partir del método estándar anteriormente reportado (Arias, Lizano et al. 1987). Las células MA104 fueron sembradas en placas de 96 pozos en medio MEM Advance (Gibco, Invitrogen) al 2% de SFB (suero fetal bovino). Una vez alcanzada la confluencia del 90-100%, el medio fue retirado y se procedió a la infección. El inóculo viral fue preparado incubando los homogenizados intestinales con y sin tratamiento con luz U.V. en presencia de 5µg/ml de tripsina (Sigma-Aldrich) e incubados por 30 min a 37°C. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas del inóculo e inmediatamente fue incubado por 1 hora a 37°C sobre la monocapa de células, tiempo en el cual se da la adsorción del virus. A continuación, las monocapas fueron lavadas con PBS, para retirar el virus no adsorbido, e incubadas durante 16 a 18 horas en medio MEM sin suero. Para la tinción de los focos infecciosos, las placas fueron lavadas y fijadas con acetona al 20% en PBS durante 10 minutos. Posteriormente, fueron lavadas e incubadas durante 1 hora en presencia de un suero policlonal hiperinmune de conejo contra las partículas virales de triple capa (TLPs) de la cepa porcina de rotavirus YM (1:1000) (donado por el Dr. Carlos Arias, Instituto de Biotecnología, UNAM, México) a 37°C. Al término de la incubación, las placas fueron lavadas dos veces con PBS e incubadas a 37°C durante 1 hora con un anticuerpo secundario de cabra anti-Inmunoglobulina G (IgG) de conejo acoplado a peroxidasa (Santa Cruz, Biotechnology, Inc.) (1:2500). Finalmente, las monocapas fueron lavadas

cuidadosamente y reveladas utilizando el 3-amino-9-etilcarbazol (Sigma, Aldrich) como sustrato precipitable. Las células infectadas presentaban precipitado de color café y fueron contadas bajo un microscopio óptico (Nikon, Eclipse TE300), y el número de unidades formadoras de focos (uff) fue calculado.

### **5.5 Infección de ratones con rotavirus y detección de la replicación viral.**

Grupos de 4 ratones fueron inoculados con  $10^4$  uff del rotavirus EDIM en 100  $\mu$ l de MEM libre de suero, o solamente con MEM libre de suero en el caso de los animales control por medio de una cánula gastroesofágica. Previo a la inoculación del virus, se administraron 100 $\mu$ l de bicarbonato al 1.3% por vía oral para neutralizar los jugos gástricos. Para determinar la replicación viral en los ratones inoculados, se colectaron muestras de heces en tubos eppendorf a las 0 horas (antes de la inoculación) y cada 24 horas por 8 días. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C conforme se fueron colectando y hasta su análisis. Posteriormente, las muestras fueron resuspendidas al 5% (peso/volumen) en una solución amortiguadora disolvente (10 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5% de suero fetal de bovino, 0.05% Tween-20, 10 mM AzNa) durante toda la noche a 4°C para su disgregación. Las partículas virales contenidas en las heces fueron liberadas por agitación vigorosa en un “vórtex” y la suspensión obtenida fue centrifugada a 13000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante conteniendo las partículas se analizó mediante un ELISA de captura. Para esto, las placas de 96 pozos para ELISA (Costar, alto enlace), se incubaron durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal hiperinmune de cabra diluido 1:5000 en PBS con 0.05% de AzNa, después de 2 lavados con TNC (10mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) con 0.05% Tween-20, las placas fueron bloqueadas con una solución de leche descremada en polvo (Carnation, libre de grasa) al 5% en PBS con 0.05% de AzNa por 2 horas a TA (temperatura ambiente). Posteriormente, se agregó el sobrenadante del homogenizado de las heces por duplicado y las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C. Después de varios lavados, se adicionó un anticuerpo policlonal hiperinmune contra

rotavirus de simio de la cepa RRV producido en conejo, diluido 1:2000 en solución de bloqueo y se incubó por una hora a 37°C. Posteriormente, se utilizó un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina 1:2000. Las placas se incubaron por 1 hora a 37°C. Se agregó el sustrato (p-nitrofenil fosfato disodio) y las placas se incubaron durante 30 y 45 minutos a 37°C tomando lecturas a 405nm de absorbancia en el lector de placas (Labsystem, Original Multiskan). En este ensayo la absorbancia obtenida es directamente proporcional a la cantidad de antígeno viral excretado.

### **5.6 Ensayo de detección de IgAs intestinales específicas contra rotavirus en heces de ratones infectados.**

Para detectar la presencia de IgA's anti-rotavirus intestinales en las heces, se realizó un ELISA de captura en donde las placas de 96 pozos (Costar, High binding) fueron sensibilizadas durante toda la noche a 4°C con 50 µl de anticuerpo policlonal hiperinmune de cabra diluido 1:5000 en PBS con 0.05% de AzNa. Se realizaron dos lavados con TNC-0.05% Tween 20 y posteriormente la placa fue bloqueada con 150 µl de leche en polvo descremada (Carnation) al 5% en TNC-0.05% Tween 20 durante dos horas a TA. Seguido de dos lavados, se agregaron 50 µl de lisado proveniente de células MA104 infectadas con rotavirus de la cepa RRV, como antígeno. Las placas fueron incubadas durante 2 horas a TA. Se realizaron 4 lavados con TNC-0.05% Tween-20 y se agregaron 50µl por duplicado del sobrenadante obtenido del homogenizado de las heces anteriormente mencionado. Las placas fueron incubadas durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, las placas fueron lavadas 4 veces e incubadas con 50 µl de una dilución 1:1000 de anticuerpo de cabra anti-IgA de ratón conjugado a peroxidasa (Kirkegaard and Perry Labs) por 1 hora a 37°C. Después de lavar 4 veces, se adicionaron 50 µl del sustrato o-fenilenediamina (Sigma-Aldrich) en buffer de acetatos y se incubó por 10-15 minutos a TA, posteriormente se agregaron 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M para detener la reacción. Las placas fueron leídas en el lector de placas (Labsystem, Original Multiskan) con una longitud de onda de 492nm.

## **5.7 Cortes histológicos de las PPs e intestino delgado de la región del yeyuno.**

Se colectaron PPs e intestino de la región del yeyuno a partir de ratones infectados con rotavirus silvestre de la cepa EDIM a las 0, 12, 24, 48 horas y de las PPs de ratones inoculados con el mismo virus pero tratado con luz U.V. a las 0 y 48 horas p.i. Los órganos fueron incluidos en medio de conservación y congelación Jung (Leica Microsystems, Nussloch, Alemania) y congelados rápidamente en nitrógeno líquido. Las muestras fueron almacenadas a -80°C. Posteriormente, se realizaron cortes de 6 µm de grosor mediante el uso de un microtomo de congelación (LeicaCM1850). Los cortes histológicos fueron colectados sobre laminillas previamente tratadas con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). Posteriormente, fueron descongelados y fijados con acetona:cloroformo en proporción 1:1 durante 20 minutos, para su posterior análisis histológico por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

## **5.8 Inmunohistoquímica.**

Para el bloqueo de la peroxidasa endógena, los cortes fueron incubados durante 1 hora a TA con una solución de suero humano al 2 % en PBS/9% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/0.1% de AzNa. Los receptores Fc, fueron bloqueados incubando durante 1 hora a TA en PBS conteniendo 2% de suero humano o de conejo. La detección de las células CD11c+, se llevó a cabo utilizando el anticuerpo monoclonal anti-CD11c de ratón hecho en hámster (N481) (donado por el Dr. Lourival Domingos Possani, Instituto de Biotecnología, UNAM, México) y se utilizó un anticuerpo policlonal de cabra anti-hámster-peroxidasa (eBioscience) como anticuerpo secundario. Los cortes fueron revelados utilizando etil-carbazol como sustrato y contrateñidos con el colorante Verde de metilo al 1%. Los cortes fueron analizados utilizando un microscopio óptico (Nikon, Eclipse TE300)

## **5.9 Inmunofluorescencias.**

Los cortes fueron bloqueados con PBS/9% de H<sub>2</sub>O/0.1% de AzNa para bloquear las peroxidases endógenas y eliminar la autofluorescencia del tejido. Para bloquear los receptores Fc, los cortes fueron incubados durante 1 hora a TA con PBS al 2% de suero humano o de conejo. Para bloquear la biotina endógena, los cortes fueron lavados con una solución TBS 0.05M pH 7.5 (0.05M Trizma Base, 0.9% NaCl, pH 7.5), posteriormente fueron incubados en una solución bloqueadora (PBS, 2% de clara de huevo, 1% de AzNa) durante 30 minutos, los tejidos fueron lavados con TBS y posteriormente incubados con los anticuerpos marcados. Los anticuerpos utilizados fueron los monoclonales anti-CD11c-FITC, anti-CD11b PE (BD Pharmigen), anticuerpo monoclonal hecho en ratón 288 contra la proteína VP6 y el el suero hiperinmune anti-NSP5 hecho en conejo (donados por el Dr. Carlos Arias, Instituto de Biotecnología, UNAM, México), detectados con los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón Alexa Fluor 568 (Molecular Probes), y el anti-IgG conejo Alexa Fluor 568 (Molecular Probes) respectivamente. Los anticuerpos fueron incubados 1 hora a TA. Los lavados se realizaron con PBS-0.2% BSA. Para teñir núcleos se utilizo DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) (Invitrogen). Los cortes fueron analizados en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axiovert 200 M), y las imágenes fueron capturadas utilizando una AxioCam MRM y procesadas mediante el programa Axiovision 3.1 (Carl Zeiss, Inc.).

## **5.10 Obtención de células a partir de las PPs.**

Las PPs fueron disectadas a las 0, 24 y 48 horas p.i. y colocadas en cajas petri en medio Hank's (sin Ca<sup>++</sup> y sin Mg<sup>++</sup>). Posteriormente fueron incubadas con DNAsa 5 µg/ml y Colagenasa VIII 0.150 µg/ml (Sigma, Aldrich) en Medio Hank's con 5mM de EDTA a 37°C durante 20 minutos con agitación suave. Posterior a la incubación, las PPs fueron disgregadas mecánicamente con ayuda de un émbolo y de mallas metálicas de bajo calibre (Sigma-Aldrich). La suspensión celular



obtenida se colectó en tubos de 15 ml (Costar) y se centrifugó a 2000 rpm durante 7 minutos. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en solución salina Hank (Gibco) con 5mM EDTA.

### **5.11 Enriquecimiento de DCs por gradiente de flotación utilizando OptiPrep.**

Las células obtenidas a partir de las PPs fueron sometidas a un gradiente de flotación utilizando OptiPrep (Axis-Shield, Oslo, Norway) (1.077 a 1.080 g/ml) siguiendo las recomendaciones del fabricante en la hoja de aplicación C-20. A continuación se describe brevemente el procedimiento: Las células obtenidas de las PPs, fueron resuspendidas en 3ml solución de Hank (sin Ca<sup>++</sup> y sin Mg<sup>++</sup>) con 5mM de EDTA. Se preparó una solución de OptiPrep al 11.5% (peso/volumen) (1:4.2) agregando 1 ml de Optiprep con 4.2 ml de solución diluyente (0.88% NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% BSA, 10 mM Hepes-NaOH, pH 7.4). Los 3 ml de la suspensión celular fueron colocados en tubos de 15 ml y mezclados suavemente con 1 ml de OptiPrep. Para formar el gradiente, se colocaron 5 ml de la solución de optiprep al 11.5% sobre la suspensión celular. Posteriormente, sobre esta solución se colocaron 3 ml de solución de Hank. Se centrifugó, a 600g a TA durante 20 minutos. Una vez formado el gradiente, se colectó la interfase superior entre la solución de Hanks y la solución de OptiPrep al 11.5%. El contenido de esta banda fue lavado dos veces con solución de Hank y posteriormente las células obtenidas fueron contadas en un hemocitómetro utilizando el método de exclusión por tinción con azul de tripano. Las células enriquecidas por este método fueron analizadas por citofluorometría o bien para la purificación de DCs por el método de MACS detallado más adelante. Los resultados obtenidos sobre la población de DCs enriquecida mediante este protocolo se muestran en el Apéndice 11.1 (Fig. 23).

### **5.12 Purificación de DCs por el método de MACS.**

Las células enriquecidas mediante el gradiente de OptiPrep, fueron resuspendidas en la solución amortiguadora MACS (PBS, 0.5% BSA, 5mM EDTA). Los

receptores Fc (FcγRIII/II) fueron bloqueados utilizando 1 μg del anticuerpo monoclonal CD16/CD32 (eBiosciences). Las DCs fueron purificadas por selección positiva utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CD11c de ratón unido a perlas magnéticas (clona N418) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) incubando durante 20 minutos a 4°C. Las muestras fueron lavadas y seleccionadas utilizando las columnas (mini) de separación de MACS de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La pureza de células CD11c<sup>+</sup> fue determinada mediante citofluorometría tiñendo contra CD11c. Mediante esta técnica la eficiencia de purificación fue de aproximadamente 90%. Las células obtenidas fueron utilizadas para la obtención de ARNm para su posterior análisis por PCR convencional y PCR tiempo real. El rendimiento y la caracterización de las células obtenidas mediante este protocolo se muestran en el Apéndice 11.2 (Fig. 24).

### **5.13 Citofluorometría.**

Tanto las células totales como las obtenidas mediante el gradiente de enriquecimiento fueron analizadas por citofluorometría. Para ello, las células fueron resuspendidas en la solución amortiguadora MACS y los receptores Fc fueron bloqueados incubando durante 20 minutos en presencia del anticuerpo anti-CD16/CD32 de ratón (eBiosciences). Posterior al bloqueo, las células fueron teñidas utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales de la marca BD Biosciences: CD11c-isocianato de fluoresceína (FITC), CD11c- alofococianina (CPA), CD8-FITC, TCR-FITC, B220-FITC, CD11c biotinilado, CD80 biotinilado, CD11b-ficoeritrina (PE), CD40-PE, CD40 biotinilado, CD86 PE y CD4- proteína clorofila peridinina (PerCP) (eBiosciences) y F4/80 biotinilado (Serotec). Se utilizaron las estreptavidinas acopladas a Alexa Fluor 647 (Molecular Probes) y PerCP (BD Biosciences) para la detección de los anticuerpos biotinilados. Así mismo se utilizó el anticuerpo monoclonal hecho en rata contra el complejo mayor de histocompatibilidad MHC II (clona NIM R4), el cual fue gentilmente donado por el Dr. Vianney Ortiz Navarrete (CINVESTAV, México), y el anticuerpo monoclonal hecho en rata contra CCR6 de ratón donado por el Dr. Eduardo García Zepeda

(Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México), los cuales fueron detectados utilizando un anticuerpo policlonal de cabra contra IgG de rata acoplado a FITC (Zymed). Se utilizaron los controles de isotipos correspondientes en cada experimento. Las suspensiones celulares fueron fijadas en paraformaldehído al 2% (Sigma-Aldrich). Las células fueron analizadas utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, California), adquiriendo 50,000 o 100,000 eventos en cada experimento. El análisis de citofluorometría se realizó utilizando el programa FlowJo (Tree Star, Inc.). Las células muertas fueron descartadas del análisis por tinción con yoduro de propidio (Invitrogen).

#### **5.14 Tinción de citocinas intracelulares.**

Las células totales fueron obtenidas de las PPs de ratones control e infectados con rotavirus EDIM silvestre a las 48 horas p.i. Una vez disgregadas y lavadas, fueron puestas en placas de 24 pozos (Costar) a una densidad de  $2 \times 10^6$ /ml en medio de cultivo RPMI al 10% de SFB e incubadas durante 12 horas a 37°C en presencia de 1 µl/ml de medio de cultivo de BFA (GolgiPlug™, BD). Al concluir la incubación, las células despegadas y transferidas a tubos de 15 ml (Costar) y lavadas dos veces con solución amortiguadora de tinción (PBS, 0.5% BSA, 2 mM EDTA). Posteriormente fueron fijadas y permeabilizadas agregando 100 µl de Citofix/Citoperm™ (Beckton Dickinson), e incubando durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente se realizaron dos lavados con PermWash™ (Beckton Dickinson), y posteriormente se agregaron los anticuerpos correspondientes para cada citocina IL-12 e IL-10 ambos acoplados a PE, utilizando una dilución 1:50. Las células fueron incubadas durante 30 minutos a 4°C con los anticuerpos, posteriormente lavadas con PermWash™ (Beckton Dickinson) y analizadas por citofluorometría.

### **5.15 Análisis de la expresión de ARN mensajero para diferentes citocinas en DCs de las PPs.**

El ARNm total fue aislado a partir de  $2 \times 10^5$  células CD11c<sup>+</sup> purificadas por el método de MACS obtenidas de las PPs. El ARNm total fue extraído utilizando TRIzol (Invitrogen) según el protocolo establecido por el fabricante. La integridad del ARNm fue determinada mediante el análisis visual de los ARNs ribosomales 28S y 18S en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Posteriormente, se llevó a cabo una reacción de transcripción reversa para sintetizar ADN complementario (ADNc) utilizando 500 ng de ARNm, usando el kit First Strand cDNA Synthesis (MBI Fermentas) utilizando oligo (dT) y la enzima Revert Aid H Minus de acuerdo al protocolo del fabricante.

### **5.16 PCR convencional.**

El ARNm para IFN- $\beta$  y  $\beta$ -actina fue determinado por PCR convencional utilizando una enzima Taq DNA polimerasa (MBI Fermentas) utilizando la solución amortiguadora con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  usando los oligos 5'-CACAGCCCTCTCCATCAAC y 3'-TCTCTGCTCGGACCACCATC para IFN- $\beta$  y 5'-ATGAGGTAGTCTGTCAGGT y 3'-ATGGATGACGATATCGCT para  $\beta$ -actina. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador (MultiGene Gradient Thermal Cycler, Labnet) teniendo un ciclo inicial de desnaturalización de 92°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 min a 62°C, y 1 min a 72°C, y un ciclo de extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de la PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transluminador de U.V. (BioDoc-It Imaging System).

### **5.17 PCR tiempo real.**

El ARNm para IL-12/23p40, TNF- $\alpha$ , e IL-10 fueron analizados por PCR tiempo real. Para esto, el cDNA fue diluido 1:10 y 2 $\mu$ l de esta dilución fueron usados para

la amplificación utilizando el 5700 Gene Amp (Applied Biosystems) con 15 minutos de desnaturalización y ciclos de 1 minuto de alineamiento, 1 minuto de extensión. La expresión fue normalizada contra el gen de ARN ribosomal 18S. Los reactivos utilizados fueron diseñados para la amplificación de citocinas por Applied Biosystems utilizando PDAR y TaqMan. Todos los oligos tienen temperaturas de fusión ( $T_m$ ) similares y se obtienen amplicones de 100 a 120 pb.

### **5.18 Análisis estadístico.**

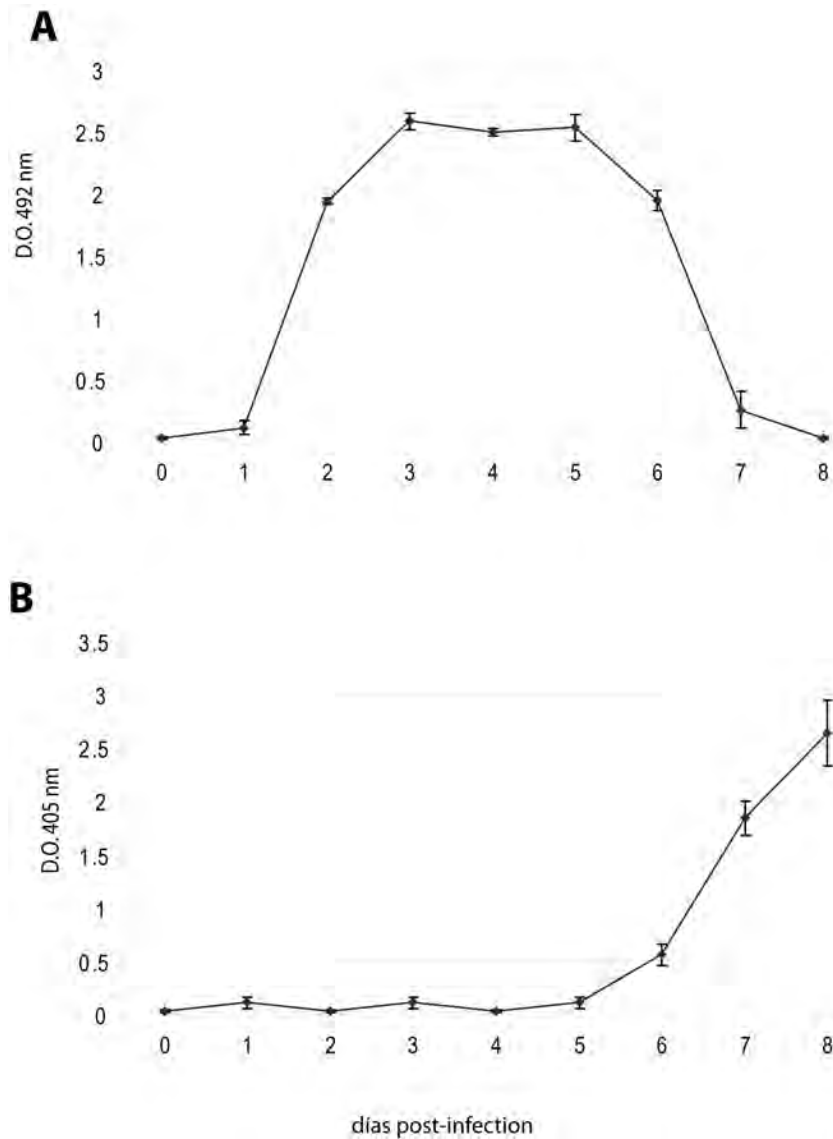
La significancia estadística fue determinada utilizando la prueba t-Student's en el programa SPSS 17.0 con un intervalo de confianza de 99%.

## 6. RESULTADOS.

### **6.1 Estandarización del modelo de infección de ratón adulto con la cepa murina de rotavirus silvestre EDIM.**

Durante el desarrollo del presente trabajo, se utilizó el modelo murino de infección por rotavirus descrito por Feng *et al.* (Feng, Franco et al. 1997), utilizando ratones hembras de la cepa BALB/c *H-2<sup>d</sup>* de 6-8 semanas de edad, los cuales fueron infectados con  $10^4$  ufc de la cepa murina de rotavirus silvestre EDIM. Los resultados obtenidos mostraron la curva clásica de excreción de antígeno viral en las heces de los ratones infectados (Fig. 7A) (Franco and Greenberg 1997). Esta curva es una medida indirecta de la replicación que se lleva a cabo en el intestino delgado, y es considerada como un parámetro de infección. El virus excretado es detectado por un ELISA de captura y la cantidad de virus excretado es directamente proporcional a la densidad óptica neta. Durante el desarrollo de la infección, no es sino hasta el día 2 p.i. que se detecta un aumento drástico de antígeno viral, el cual se mantiene hasta el día 6, presentando una caída drástica al día 7 y siendo indetectable al día 8 p.i.

Una de las características de la respuesta inmune durante la infección por rotavirus en el modelo murino, es la producción de anticuerpos IgA intestinales antígeno-específicas que ayudan a la erradicación de la infección. De tal manera, que dentro de las mismas muestras de heces se determinó, mediante un ELISA de captura, la presencia de IgA específicas contra rotavirus, encontrando que estos anticuerpos son detectables entre los 5-6 p.i., aumentando de manera drástica a los días 7 y 8 (Fig. 7B), aumento que coincide con la erradicación del virus y que se corrobora con los reportes previos en este modelo (Burns, Siadat-Pajouh et al. 1996; Feng, Franco et al. 1997)



**Figura 7. Curva de excreción de antígeno viral y de producción de IgAs intestinales específicas contra rotavirus en el modelo murino de infección por el rotavirus silvestre de la cepa EDIM.** A) El antígeno viral fue determinado en heces de ratones infectados oralmente con  $10^4$ uff del rotavirus silvestre de la cepa EDIM, por medio de un ELISA de captura. El ensayo fue revelado con sustrato para peroxidasa y leído a 492 nm. B) Los anticuerpos intestinales IgA específicos contra rotavirus presentes en las heces de los ratones infectados, fueron analizados por un ELISA de captura. Las barras representan la DS entre 5 experimentos independientes.

## **6.2 Análisis de las células totales de las PPs de ratones infectados con rotavirus durante las primeras 48 horas p.i.**

Rotavirus infecta predominantemente a los enterocitos de las puntas de las vellosidades del intestino delgado, razón por la que se decidió evaluar la respuesta inmune temprana contra esta infección en las PPs, órganos linfoides asociados a la mucosa intestinal considerados como sitios inductores de la respuesta inmune ante los patógenos intestinales. Las PPs poseen una serie de mecanismos que permiten la entrada constante de antígenos provenientes del lumen intestinal, por lo que es probable que durante las primeras 48 horas p.i., el antígeno viral producido en lumen intestinal, sea internalizado y reconocido por las diferentes poblaciones de células linfoides de las PPs. Con la finalidad de determinar la respuesta de las células linfoides ante la infección por rotavirus, se evaluó tanto el número absoluto como el porcentaje de células totales y activadas en las PPs.

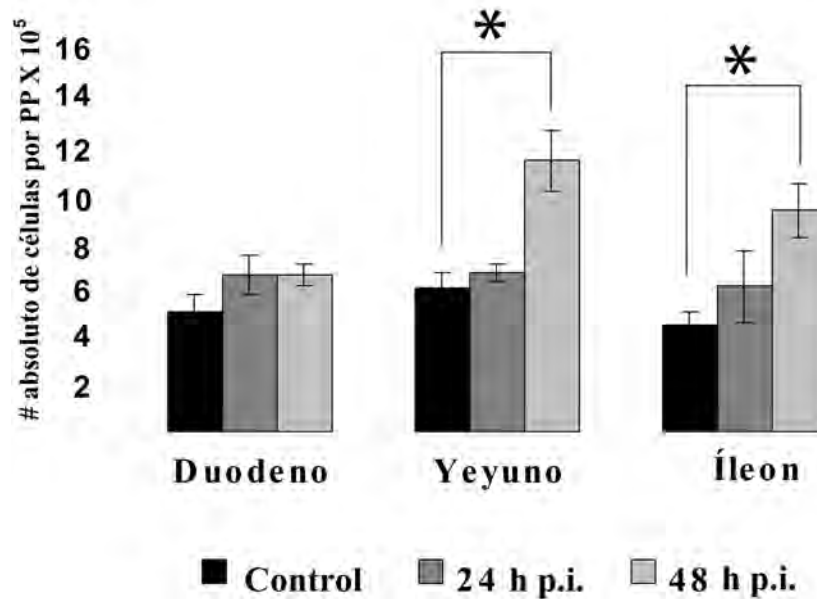
### ***a) La infección por rotavirus induce un aumento en el número absoluto de células totales en las PPs de las diferentes regiones anatómicas del intestino delgado durante las primeras 48 horas p.i.***

Se infectaron ratones oralmente con el rotavirus silvestre EDIM y las PPs fueron extraídas de las diferentes regiones anatómicas del intestino delgado: duodeno, yeyuno e íleon a las 24 y 48 horas p.i. Mediante observación directa, se pudo constatar que las PPs de los ratones infectados mostraron una evidente hipertrofia a las 48 horas p.i., condición que se mantuvo durante el curso de la infección, siendo este aumento de tamaño más evidente en las PPs en la región media del intestino, correspondiente a la región yeyuno-íleon (dato no mostrado).

Una vez obtenidas, las PPs fueron disgregadas mecánica y enzimáticamente y las células totales de dichos órganos fueron contadas directamente usando un hemocitómetro. Los resultados obtenidos muestran un aumento significativo en el número absoluto de células totales por cada PP (Fig. 8), siendo las PPs del yeyuno e íleon las que presentan los mayores cambios a las 48 horas p.i., hecho



que coincide con la hipertrofia de las PPs observada durante este lapso de tiempo. Por esta razón, se decidió hacer énfasis en las PPs provenientes de la región del yeyuno para el posterior análisis de las diferentes poblaciones celulares.



**Figura 8. Número absoluto de células totales en las PPs durante las primeras 48 horas p.i. por región anatómica intestinal.** Grupos de 4-5 ratones hembras BALB/c fueron infectados oralmente con  $10^4$  u.f.f. de rotavirus silvestre EDIM. A las 24 y 48 horas p.i. las PPs fueron colectadas por región anatómica: duodeno, yeyuno e íleon. Las células totales fueron obtenidas y contadas en un hemocitómetro utilizando el método de exclusión tiñendo con azul de tripano. \*Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

***b) La infección por rotavirus induce un aumento en el número de células activadas en las PPs de las diferentes regiones anatómicas del intestino delgado durante las primeras 48 horas p.i.***

Si bien el número absoluto total de células aumentó dentro de las PPs como consecuencia de la infección, el estado de activación de las mismas demostraría que efectivamente se ha iniciado una respuesta inmune en el intestino contra el virus. Por esta razón, se evaluaron los niveles de las moléculas CD40, CD80 y CD86 sobre la superficie celular. Estas moléculas son encontradas en las CPAs

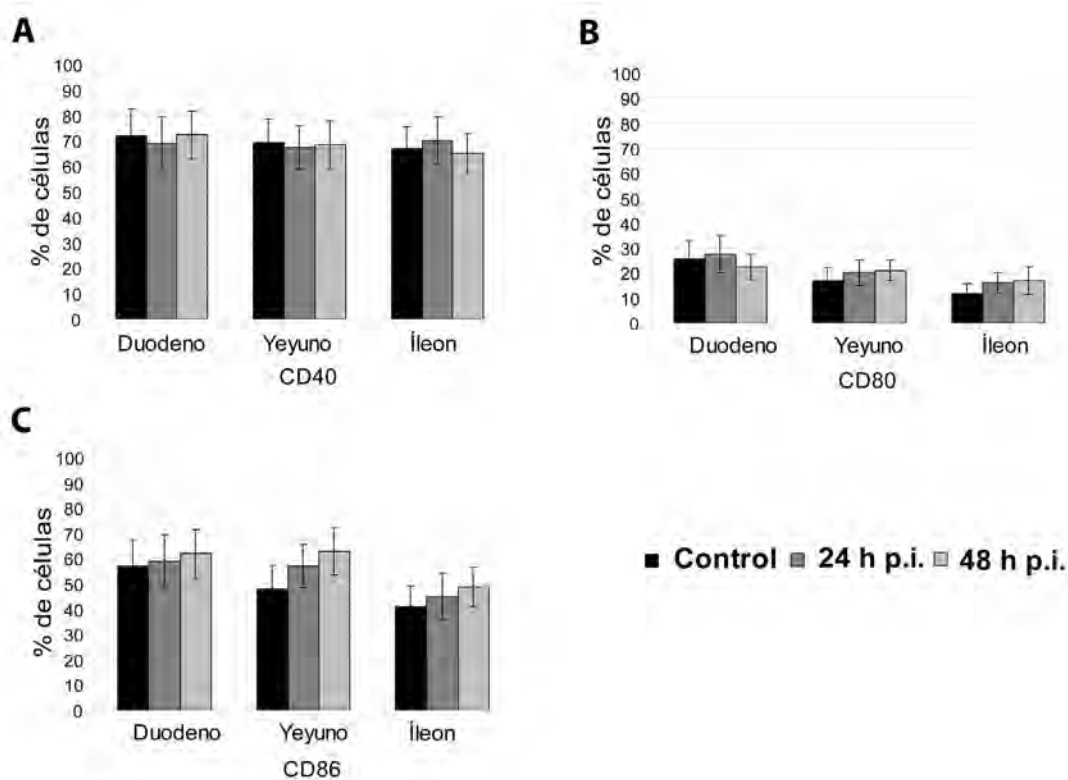
de manera constitutiva, sin embargo, una vez que éstas se activan por presencia de algún estímulo antigénico aumentan sobre la superficie celular para llevar a cabo la interacción con las células T y por lo tanto su activación.

De esta manera, siguiendo el protocolo de infección anteriormente descrito, las PPs de las diferentes regiones anatómicas del intestino fueron colectadas a las 24 y 48 horas p.i., y las células totales obtenidas fueron analizadas por citofluorometría para las moléculas CD40, CD80 y CD86. Se encontró que el porcentaje de células CD40<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup> y CD86<sup>+</sup> no cambió significativamente durante las primeras 48 horas p.i. (Fig. 9A, 9B, 9C). Sin embargo, cuando se analizó el número absoluto de células positivas para estos tres marcadores, se encontró que hay un aumento significativo a las 24 y 48 horas p.i., en las células CD40<sup>+</sup> provenientes de todas las regiones anatómicas, con excepción del duodeno, donde el aumento se observó hasta las 48 horas p.i. Así mismo, las células CD80<sup>+</sup> y CD86<sup>+</sup> de las diferentes regiones anatómicas, mostraron aumentos importantes a las 24 y 48 horas p.i., siendo las células provenientes de las PPs del yeyuno e íleon las que mostraron un mayor aumento en el número absoluto (Fig. 10A, 10B, 10C). Estos resultados claramente indican que la infección por rotavirus induce la activación de las células de las PPs durante las primeras 48 horas p.i., y que los mayores cambios se dan en la región del yeyuno, sugiriendo que la región comprendida entre el yeyuno y la primera porción del íleon es el sitio de establecimiento de la infección.

***c) Análisis del porcentaje y número absoluto de las diferentes poblaciones de células linfoides en las PPs de la región del yeyuno durante las primeras 48 horas p.i.***

En trabajos previos, empleando un modelo *in vivo* semejante al nuestro, utilizando otra cepa de rotavirus murina EC, se sugirió que el aumento de tamaño de las PPs, a tiempos tempranos posteriores a la infección, se debía principalmente al aumento drástico en el número de células B activadas. Asimismo, se sugirió que

las células T tenían una participación secundaria a estos tiempos ya que casi no aumentaron su número, ni su nivel de activación (Blutt, Warfield et al. 2002). En este trabajo se decidió corroborar estos resultados y ampliar el análisis a otras poblaciones celulares de las PPs.

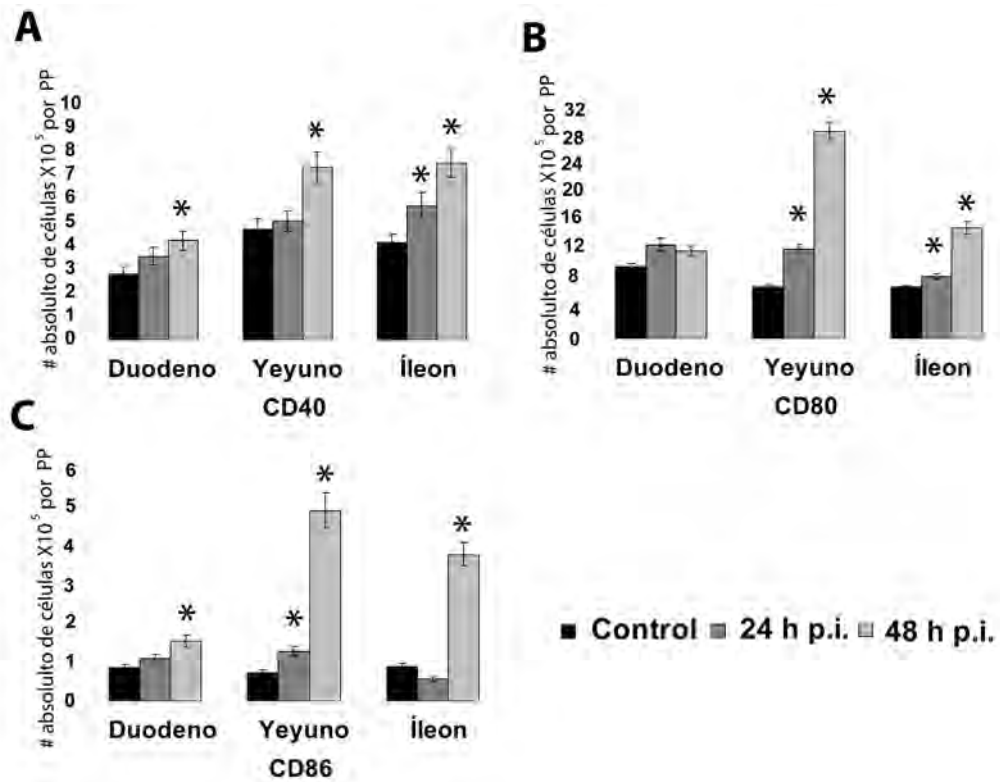


**Figura 9. Porcentaje de células positivas para los marcadores de activación de las PPs.** Grupos de 4-5 ratones hembras BALB/c fueron infectados oralmente con  $10^4$ uff de rotavirus silvestre EDIM. A las 24 y 48 horas p.i. Las PPs fueron colectadas por región anatómica: duodeno, yeyuno e íleon. Las células totales fueron teñidas con mAbs contra las moléculas CD40, CD80 y CD86 y analizadas por citofluorometría. A) Porcentaje de células positivas para: el marcador CD40<sup>+</sup>, B) para CD80<sup>+</sup> y C) para el marcador CD86<sup>+</sup>. Las barras representan la DS de cuatro experimentos independientes.

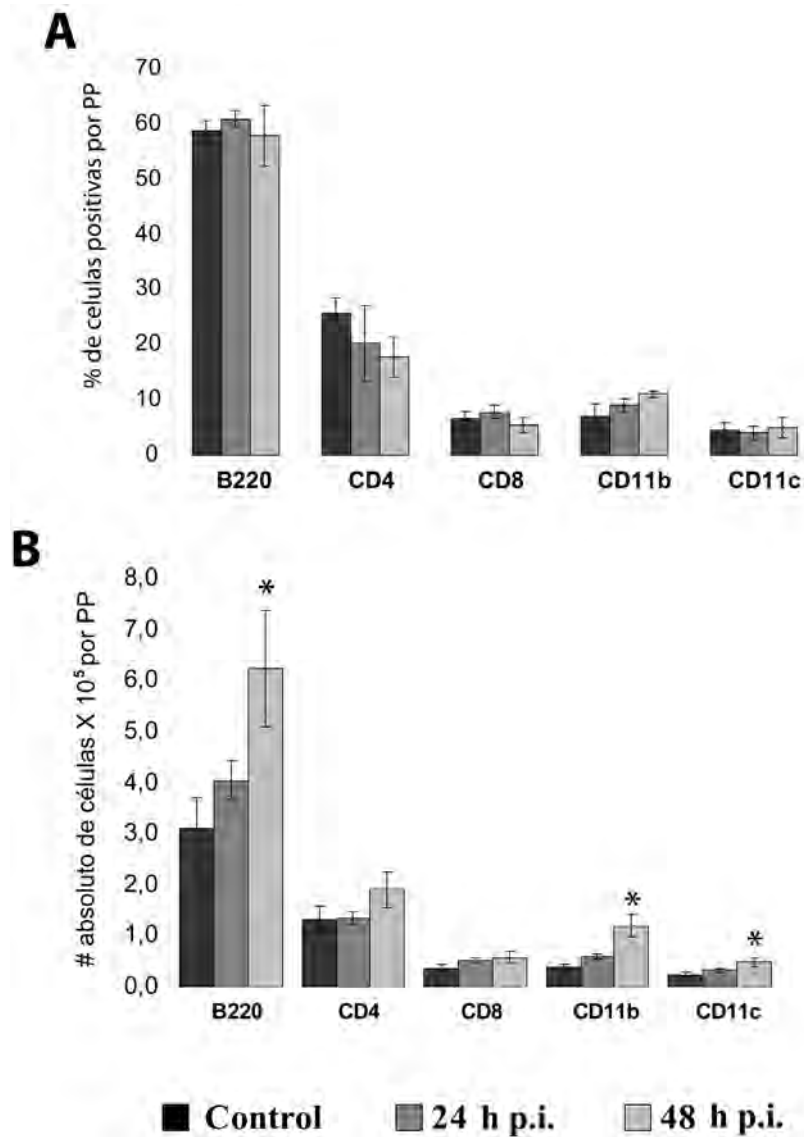
En este contexto, se evaluaron las poblaciones celulares presentes en las PPs de yeyuno, de ratones infectados a las 24 y 48 horas p.i. para lo cual se utilizaron mAbs contra los marcadores celulares CD4, CD8, B220, CD11b y CD11c, que corresponden principalmente a células Th, Tc, B, macrófagos y DCs, respectivamente.

Es importante mencionar que aunque estos marcadores son expresados mayoritariamente en estas poblaciones celulares, estas moléculas no son exclusivas de dichas células y pueden encontrarse expresadas en combinación con otros marcadores en otros grupos celulares, pero en menor proporción. Para cada población se determinó tanto el porcentaje como el número absoluto por PP. Consistente con los estudios previos, las células B (B220<sup>+</sup>) fue la población con el mayor porcentaje de células en las PP con un 60 %, seguida por las células Th (CD4<sup>+</sup>) que presentaron una proporción del 20-25 %, mientras que las células Tc (CD8<sup>+</sup>) mostraron un menor porcentaje, 5-8 % (Blutt, Warfield et al. 2002). Por su parte, los macrófagos constituyeron el 8-10 % y las DCs representaron el 4.5-6 % (Fig. 11). Sin embargo, tanto a las 24 como a las 48 horas p.i., los porcentajes de las poblaciones celulares se mantuvieron similares. Por el contrario, al evaluar con base al número absoluto de los linajes celulares se observó un aumento significativo en el número de células B, macrófagos y DCs a las 48 horas p.i. (Fig. 12). Por su parte, el número de las células Th y Tc aumentaron después de 48 horas p.i., aunque la diferencia no fue significativa con el número basal de células.

Este resultado indica que la proporción de las diferentes poblaciones celulares dentro de las PPs durante la infección por rotavirus permanece constante, sin cambios aparentes en la proporción de sus poblaciones celulares. Sin embargo, el aumento en el número absoluto sugiere que hay proliferación celular, hecho ya reportado para la población de células B (Blutt, Warfield et al. 2002), o bien migración de las células provenientes de la circulación periférica hacia las PPs como consecuencia del estímulo antigénico.



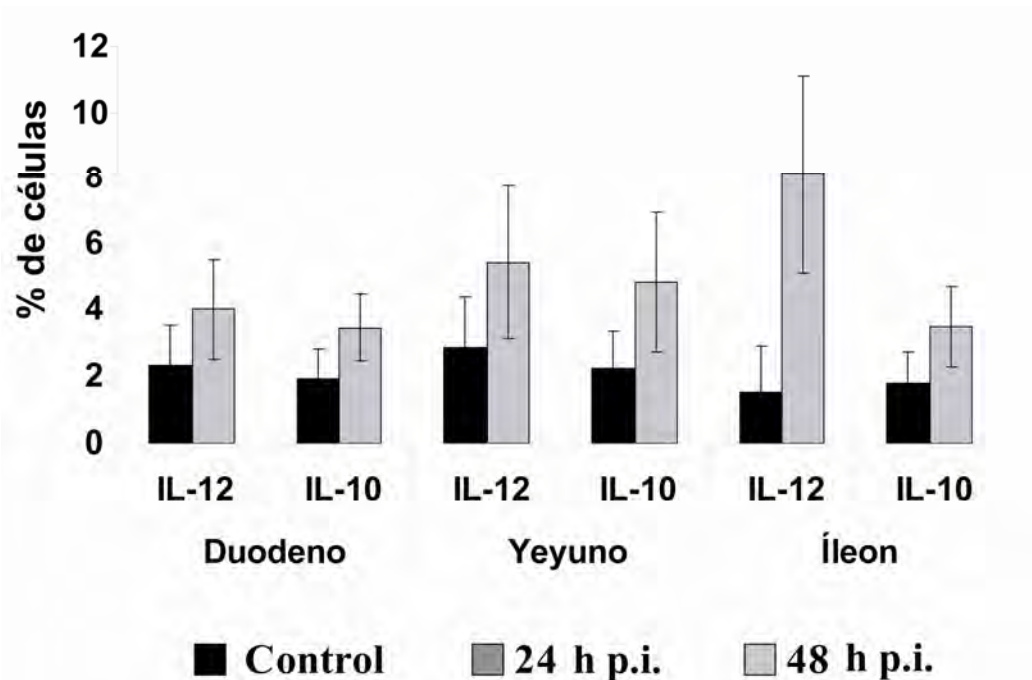
**Figura 10. Número absoluto de células activadas en las PPs durante las 48 horas p.i. por región anatómica.** Grupos de 4-5 ratones hembras BALB/c fueron infectados oralmente con  $10^4$  u.f. de rotavirus silvestre EDIM. A las 24 y 48 horas p.i. Las PPs fueron colectadas por región anatómica: duodeno, yeyuno e íleon. Las células totales fueron teñidas con mAbs contra las moléculas CD40, CD80 y CD86 y analizadas por citofluorometría. A) Número absoluto de células CD40<sup>+</sup>. B) CD80<sup>+</sup> y C) CD86<sup>+</sup>. Las barras representan la DS de cuatro experimentos independientes. \*Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 11. Poblaciones de células linfoides presentes en las PPs del yeyuno durante las primeras 48 horas p.i.** Grupos de 4-5 ratones hembras BALB/c fueron infectados oralmente con  $10^4$  ufc de rotavirus silvestre EDIM. A las 24 y 48 horas p.i. Las PPs de la región del yeyuno fueron colectadas y las células totales fueron teñidas con mAbs contra las moléculas B220, CD4, CD8, CD11b y CD11c y analizadas por citofluorometría. A) Porcentaje de las diferentes poblaciones de células linfoides en las PPs. B) Número absoluto de las diferentes poblaciones de células linfoides en las PPs. Las barras representan la DS de 4 experimentos independientes. \*Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

***d) La infección por rotavirus induce un aumento en el porcentaje de células productoras de las citocinas IL-12 e IL-10 en las PPs en las diferentes regiones anatómicas a las 48 horas p.i.***

Una de las características funcionales más importantes de las células del sistema inmune es que requieren de la participación de citocinas producidas por algunas poblaciones celulares entre ellas las DCs. Estas citocinas promueven la activación y diferenciación de otras poblaciones celulares incluyendo a las células T. Con la finalidad de determinar si la activación observada por el aumento en el número absoluto de células CD40<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup> y CD86<sup>+</sup> en las células totales provenientes de las PPs tenía una repercusión funcional, se evaluó la producción de las citocinas IL-12, citocina pro-inflamatoria e IL-10, citocina reguladora. Para ello, las células totales obtenidas de las PPs de cada región anatómica, fueron colectadas a las 48 horas p.i. y cultivadas durante 12 horas en presencia de brefeldina A, una molécula inhibidora del tránsito vesicular que permite aumentar la concentración de citocinas dentro de los compartimentos intracelulares, facilitando la detección de las células productoras por citofluorometría. Los resultados obtenidos mostraron un aumento en el porcentaje de las células productoras para ambas citocinas a las 48 h p.i., lo que sugiere que durante la infección por rotavirus existe una respuesta heterogénea en la producción de citocinas (Fig.12). El aumento en el porcentaje de células productoras para IL-10 probablemente se deba a que varias poblaciones de DCs o macrófagos de las PPs producen IL-10 bajo un estímulo antigénico (Iwasaki and Kelsall 1999), mientras que otras subpoblaciones entre ellas las DCs activadas producen IL-12. Este aumento en el porcentaje de células productoras coincide con lo anteriormente observado en la región del yeyuno-íleon, apoyando la hipótesis de que es aquí el sitio de establecimiento de la infección por rotavirus y por tanto de iniciación de la respuesta inmune.



**Figura 12. Producción de las citocinas IL-10 e IL-12 por células totales provenientes de las PPs de ratones infectados a las 48 horas p.i.** Grupos de 4-5 ratones hembras BALB/c fueron infectados oralmente con  $10^4$  u.f. de rotavirus silvestre EDIM. A las 48 horas p.i. las PPs fueron colectadas por región anatómica y las células totales se obtuvieron por disgregación mecánica y enzimática. Las células fueron cultivadas 12 horas en presencia de BFA en medio RPMI al 10% de SFB y posteriormente permeabilizadas y teñidas utilizando mAbs contra las citocinas IL-10 e IL-12. Las barras muestran la DS entre dos experimentos independientes

### 6.3 Análisis de la distribución *in situ* de las DCs de las PPs de la región del yeyuno durante las primeras 48 horas p.i.

En la sección anterior se mostró que la infección por rotavirus induce un aumento significativo en el número absoluto de varias poblaciones celulares entre ellas las DCs en las PPs de la región del yeyuno. El marcador poblacional de las DCs del ratón es la integrina CD11c, por lo que se utilizó la presencia de esta molécula como indicador de los cambios en dicha población. El presente trabajo se encuentra enfocado en la descripción detallada de las DCs de las PPs durante las primeras 48 horas de la infección por rotavirus. Con este propósito se utilizaron herramientas histológicas y de microscopía, de citofluorometría y de biología



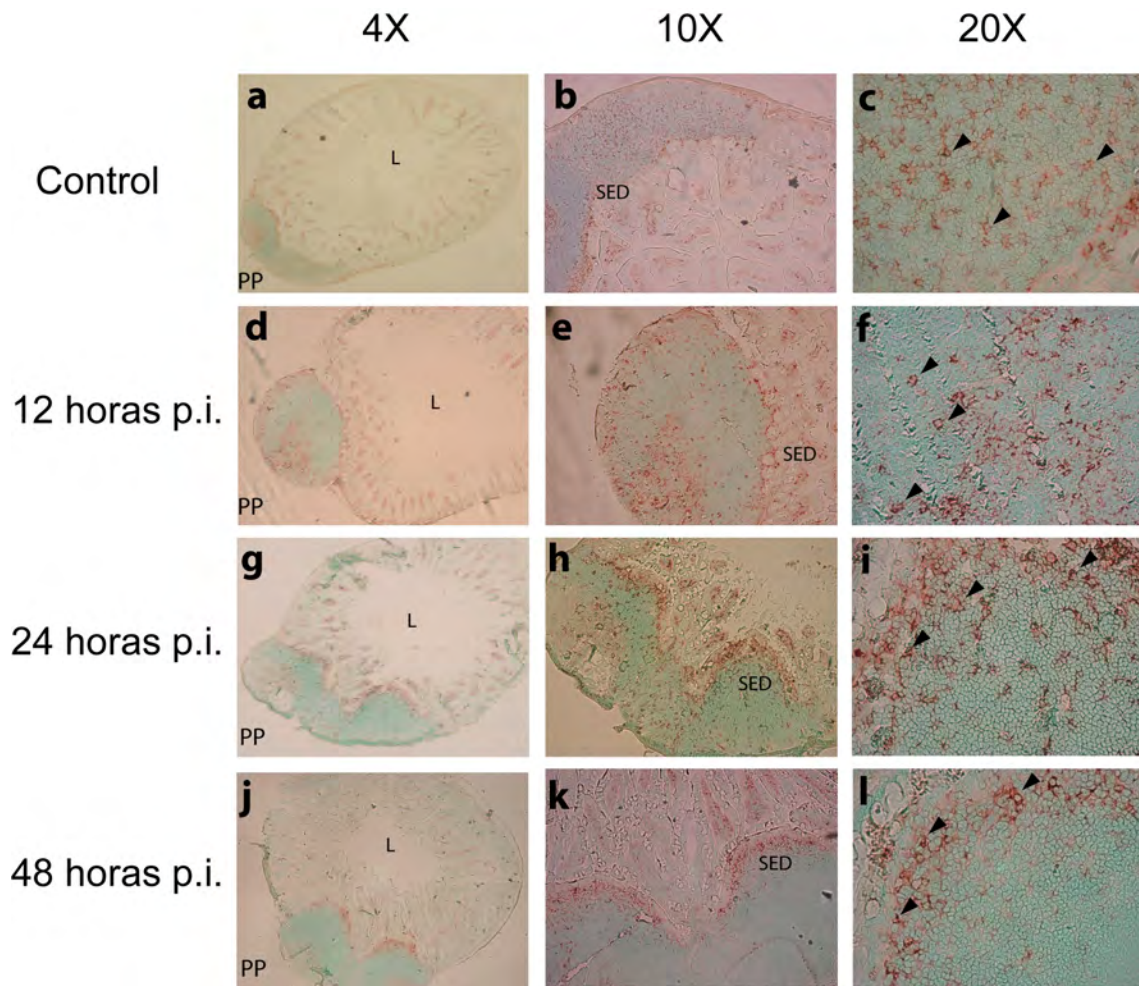
molecular, para analizar a detalle la respuesta de las DCs durante la infección por rotavirus.

***a) La infección por rotavirus induce la movilización de las DCs hacia la región del domo de la PPs del yeyuno durante las primeras 48 horas p.i.***

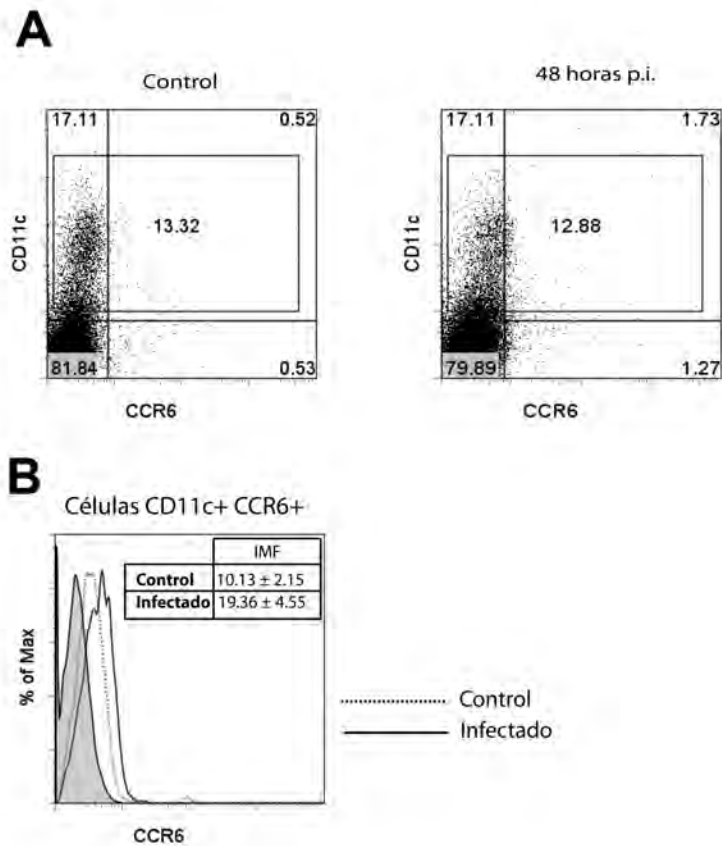
La población de DCs de las PPs, tienen la propiedad de migrar hacia la región del SED como consecuencia de una infección o reto antigénico con la finalidad de tener mayor captación de antígeno transportado al interior de las PPs a través de las células M (Cook, Prosser et al. 2000; Shreedhar, Kelsall et al. 2003). Con base en lo anterior, se evaluó la población de las DCs dentro de las PPs y su distribución histológica *in situ*, para corroborar si había algún efecto en la distribución de las DCs en las PPs como consecuencia de la infección. Para esto, grupos de 4-5 ratones fueron infectados oralmente bajo protocolo anteriormente descrito y las PPs del yeyuno fueron obtenidas a las las 0, 12, 24 y 48 horas p. i. Las PPs fueron congeladas y posteriormente fueron cortadas en un microtomo de congelación, obteniendo cortes de 6-8  $\mu\text{m}$  de espesor. Se realizó una inmunohistoquímica para detectar la población de DCs utilizando el mAb de hámster contra la integrina CD11c (N418) y utilizando un anticuerpo de cabra anti-IgG de hámster acoplado a peroxidasa y carbazol como sustrato cromógeno. Esta tinción permitió la observación *in situ* de las DCs en las PPs de los ratones control (Fig. 13a-c) e infectados. Los resultados obtenidos mediante el análisis microscópico de los cortes histológicos de las PPs, mostraron que a las 12 horas p.i. las DCs se encuentran distribuidas homogéneamente, encontrándose tanto en la región interfolicular como cercanas al SED (Fig. 13d-f). A las 24 horas p.i. se observaron cambios en la distribución de las DCs hacia la región del SED (Fig. 13g-i), esta movilización fue más evidente a las 48 horas p.i., en donde una gran cantidad de DCs se ve concentrada en la región del SED, disminuyendo su señal en las demás regiones de las PPs. Este resultado sugiere, que el efecto en la movilización de las DCs hacia el lumen intestinal es dependiente del tiempo y es mayor cuando hay un aumento en el antígeno viral, ya que esto coincide con el

aumento en la cantidad de antígeno en el lumen, por lo que las DCs migran hacia la región del SED para optimizar la captación de antígeno proveniente del lumen intestinal (Fig 13j-l).

La migración de las DCs de las PPs hacia la región del SED, es un evento dependiente de la expresión del receptor CCR6 y de su ligando CCL20 expresado principalmente por las células del FAE (Salazar-Gonzalez, Niess et al. 2006). Así que evaluamos la expresión de CCR6 sobre células CD11c+, enriquecidas mediante un gradiente de flotación utilizando el medio OptiPrep (Apéndice 11.1), provenientes de ratones infectados a las 48 horas p.i. Los resultados obtenidos muestran que el porcentaje de DCs de las PPs de ratones infectados que expresan el receptor CCR6, no cambia significativamente con respecto a las DCs de los ratones control (Fig. 14A). Sin embargo, el número de moléculas por célula para este receptor, indicado por la IMF, aumentó ligeramente sobre las DCs de las PPs de 10.13 en los ratones control a 19.36 en los ratones infectados (Fig. 14B). Cabe mencionar, que durante el presente trabajo no fueron evaluadas otras moléculas como CCL20, ligando para CCR6 presente en la región del FAE, el cual podría estar aumentando de manera significativa como consecuencia de la infección (Zhao, Sato et al. 2003).



**Figura 13. Migración de las DCs hacia el domo de las PPs de yeyuno durante las primeras 48 horas de infección.** Grupos de 4-5 ratones hembras BALB/c fueron infectados oralmente con  $10^4$ uff de rotavirus silvestre EDIM. A las 48 horas p.i las PPs del yeyuno fueron colectadas, preservadas en medio de congelación y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se realizaron cortes histológicos de  $6\ \mu\text{m}$  de espesor utilizando un microtomo de congelación. Los cortes fueron fijados con acetona-cloroformo. Las DCs fueron detectadas en las PPs utilizando un anticuerpo de hámster monoclonal contra la integrina CD11c (N418). Posteriormente, se utilizó un anticuerpo secundario de cabra anti-hámster acoplado a peroxidasa y como sustrato cromógeno se utilizó dietil-carbazol. Las DCs se muestran teñidas de color marrón, los cortes fueron contra teñidos con verde de metilo. a, b, c) PPs de ratones sin infectar. d, e, f) PPs de ratones infectados a las 12 horas p.i. g, h, i) PP de ratones infectados a las 24 horas p.i. j, k, l) PPs de ratones infectados a las 48 horas p.i. Las flechas muestran los sitios de acumulación de las DCs cercanas al SED. SED=domo subepitelial, L= lumen intestinal, PP= Placas de Peyer.

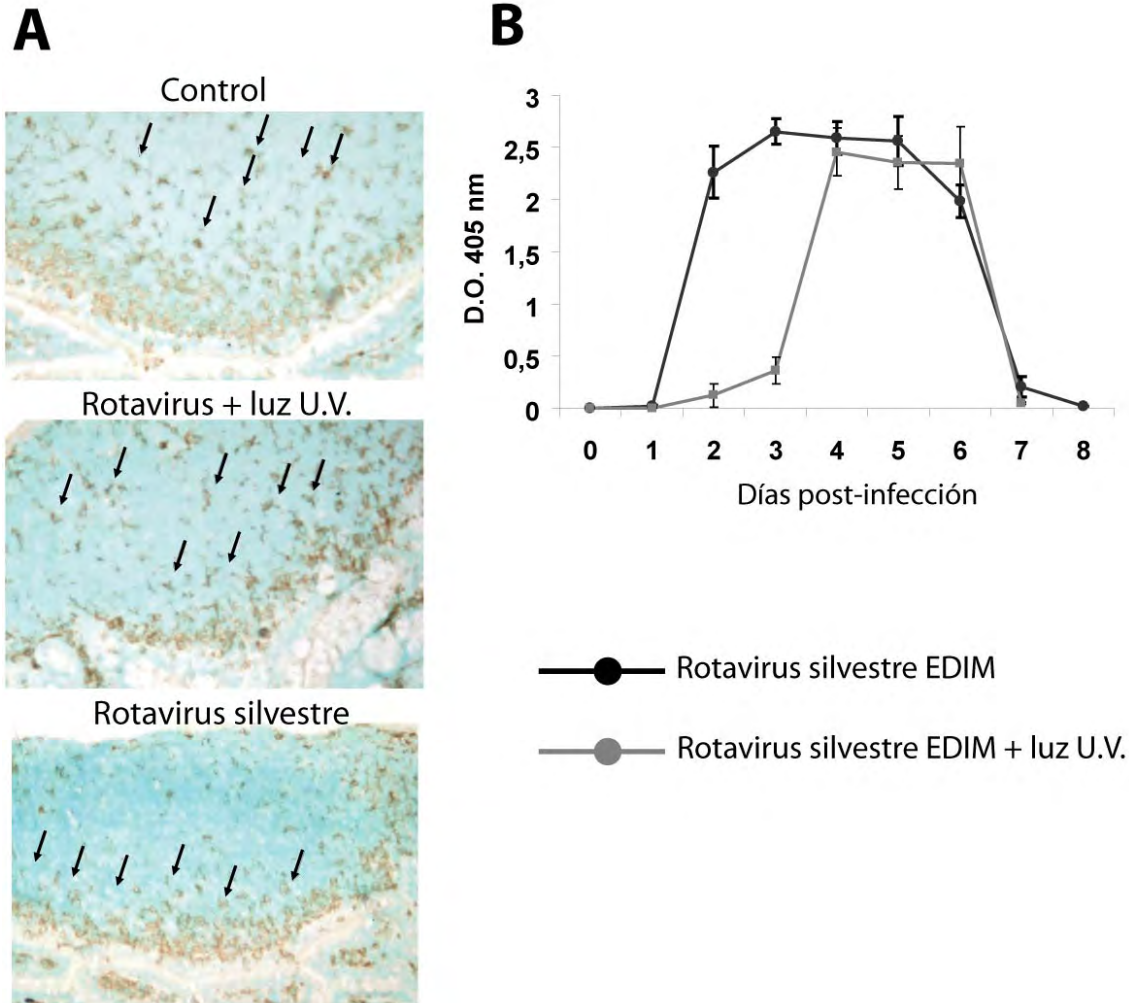


**Figura 14. Aumento del receptor CCR6 sobre la población CD11c<sup>+</sup> enriquecida mediante el gradiente de OptiPrep proveniente de PPs de ratones control e infectados con rotavirus silvestre a las 48 horas p.i., expresada como IMF.** Grupos de 4-5 ratones hembras BALB/c fueron infectados oralmente con 10<sup>4</sup>uff de rotavirus silvestre EDIM. A las 48 horas p.i las PPs fueron colectadas de la región del yeyuno y las células totales se obtuvieron por disgregación mecánica y enzimática. Las DCs fueron enriquecidas mediante un gradiente de flotación utilizando el medio Optiprep. A) Gráfica de puntos de células enriquecidas por el gradiente por OptiPrep a partir de PPs teñidas contra la integrina CD11<sup>+</sup> y el receptor CCR6 en ratones sin infectar y en ratones infectados a las 48 horas p.i. B) IMF para el receptor CCR6 sobre la población CD11c<sup>+</sup> en ratones sin infectar e infectados a las 48 h p.i. Figura representativa de dos experimentos independientes.

Otro de los parámetros evaluados dentro de este trabajo, fue el de determinar si la movilización observada de las DCs en las PPs de los ratones infectados, se debía a la replicación viral, y no únicamente al estímulo antigénico por la inoculación del virus *per se*. Para ello, decidimos analizar por inmunohistoquímica la distribución de las DCs en ratones inoculados con la misma dosis que el virus infeccioso pero

con un virus tratado con luz U.V. y psoraleno. El tratamiento con luz U.V. y el psoraleno, redujeron hasta en un 95% la infectividad del rotavirus silvestre EDIM, evaluada *in vitro* en células MA104 (dato no mostrado), sin embargo, en los ratones inoculados se presentaron niveles bajos de replicación viral los días 2 y 3 p.i., alcanzando niveles de excreción viral similares al virus infeccioso al día 4, y siendo indetectable al día 8 p.i. (Fig. 15B). Esto claramente indica que existen pocas partículas virales que escaparon al tratamiento y mantuvieron su infectividad. Sin embargo, debido a la poca cantidad de partículas infecciosas inoculadas, éstas son capaces de reestablecer una infección *in vivo* pero de manera retrasada y atenuada. Durante las primeras 48 horas después de la inoculación la carga antigénica en el intestino fue extremadamente baja en comparación con los ratones inoculados con el virus infeccioso, evento que nos permitió comparar los parámetros anteriormente observados con el virus infeccioso, con un virus sumamente atenuado.

Se encontró que las DCs de las PPs de ratones inoculados con el rotavirus tratado con luz U.V. y psoraleno se comportaron de manera similar al control no infectado (Fig. 15A), esto es, las DCs de las PPs no mostraron movilización hacia la región del SED. Sin embargo, como se esperaba, en los ratones infectados con el virus sin tratar se observó una concentración de las DCs en la región del SED (Fig. 15 A, panel inferior). Esto nos permitió comprobar que el efecto de migración de las DCs sólo se lleva a cabo cuando hay una infección aguda. Lo que sugiere que para que las DCs se movilicen a la región del SED se requieren por lo menos de dos eventos: 1) las señales de peligro que envían las células infectadas, citocinas y quimiocinas como consecuencia de la replicación viral y 2) una gran cantidad de antígeno viral disponible en el lumen intestinal.



**Figura 15. Distribución de las DCs en PPs de ratones inoculados con rotavirus silvestre y tratado con luz U.V. y psoraleno a las 48 horas p.i.** Grupos de 4-5 ratones hembras BALB/c fueron infectados oralmente con  $10^4$ uff de rotavirus silvestre EDIM, otro grupo de 4-5 ratones fue inoculado con la misma dosis pero con virus tratado con luz U.V. y psoraleno. A las 48 horas p.i. las PPs del yeyuno fueron colectadas, preservadas en medio de congelación y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se realizaron cortes histológicos de  $6\mu\text{m}$  de espesor utilizando un microtomo de congelación. Los cortes fueron fijados con acetona-cloroformo. Las DCs fueron detectadas en las PPs utilizando un anticuerpo de hámster monoclonal contra la integrina CD11c (N418). Posteriormente, se utilizó un anticuerpo secundario de cabra anti-hámster acoplado a peroxidasa y como sustrato cromógeno se utilizó dietil-carbazol. Las DCs se muestran teñidas de color marrón, los cortes fueron contra teñidos con verde de metilo. A) DCs en las PPs de ratones sin infectar, en las PPs de ratones inoculados con rotavirus EDIM tratado con luz U.V. y psoraleno y, las DCs en las PPs de ratones inoculados con rotavirus silvestre EDIM, B) Curva de excreción de antígeno viral en heces de ratones inoculados. Las flechas de color negro indican el sitio donde se localiza una DC.

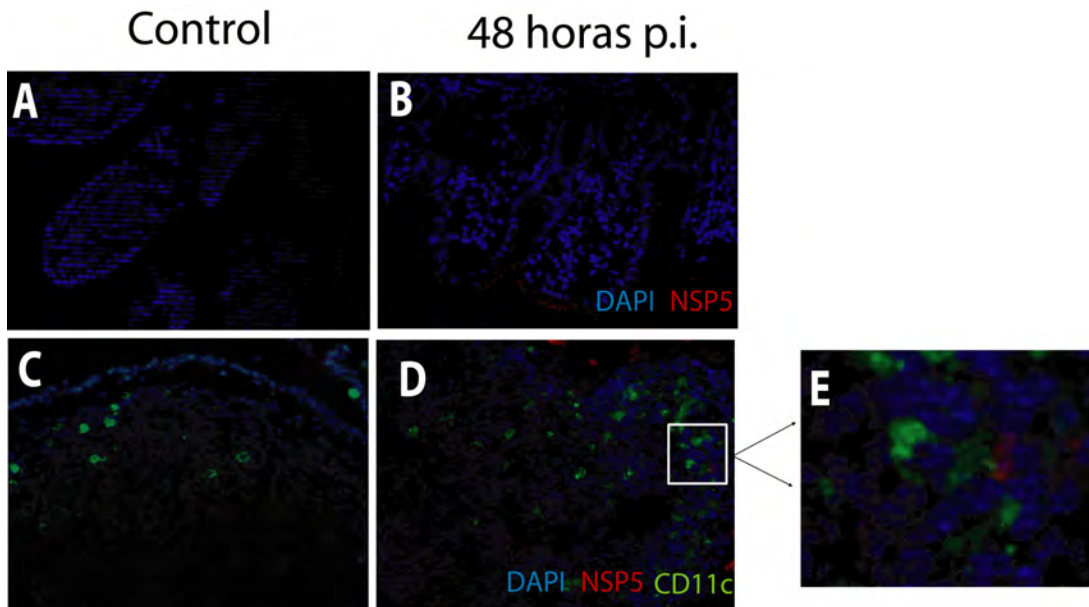
**b) Rotavirus infecta a las células epiteliales intestinales pero no a las DCs de las PPs.**

Una de las características de rotavirus es que infecta casi exclusivamente a las células epiteliales de las puntas de las vellosidades del intestino delgado. Sin embargo, trabajos recientes (Blutt, Matson et al. 2007) han demostrado tanto en humano como en ratones que existe antigenemia y viremia en tejidos periféricos después de la infección. Asimismo, se ha sugerido que rotavirus también puede infectar células de la PPs y GLM (Fenaux, Cuadras et al. 2006). De esta manera, se evaluó si en nuestro modelo las DCs de las PPs son infectadas con rotavirus. Así, ratones fueron infectados con rotavirus silvestre EDIM y a las 0 y 48 horas p.i. las PP fueron extraídas y procesadas para ensayos de inmunofluorescencia en cortes histológicos, en los cuales se encontró la presencia de la proteína NSP5 en las células epiteliales de las vellosidades de los ratones inoculados con rotavirus, corroborando así la infección (Fig. 16B), a diferencia de las células de las vellosidades control (Fig.16A), en donde no hay señal para dicha proteína. Así mismo, se encontró señal para NSP5 pero con muy baja incidencia dentro de las PPs (Fig. 16D), con respecto a las PPs de los ratones sin infectar (Fig. 16C), donde no se detectó señal. Sin embargo, en las PPs de los ratones infectados la señal de NSP5 no colocaliza con las células CD11c<sup>+</sup> (Fig. 16D y E). Esto indica que las DCs de las PPs no se infectan con rotavirus *in vivo*, al menos bajo las condiciones empleadas en estos experimentos.

**c) La infección por rotavirus induce un aumento en las células CD11b<sup>+</sup> en la LP de las vellosidades de la región del yeyuno a las 48 horas p.i.**

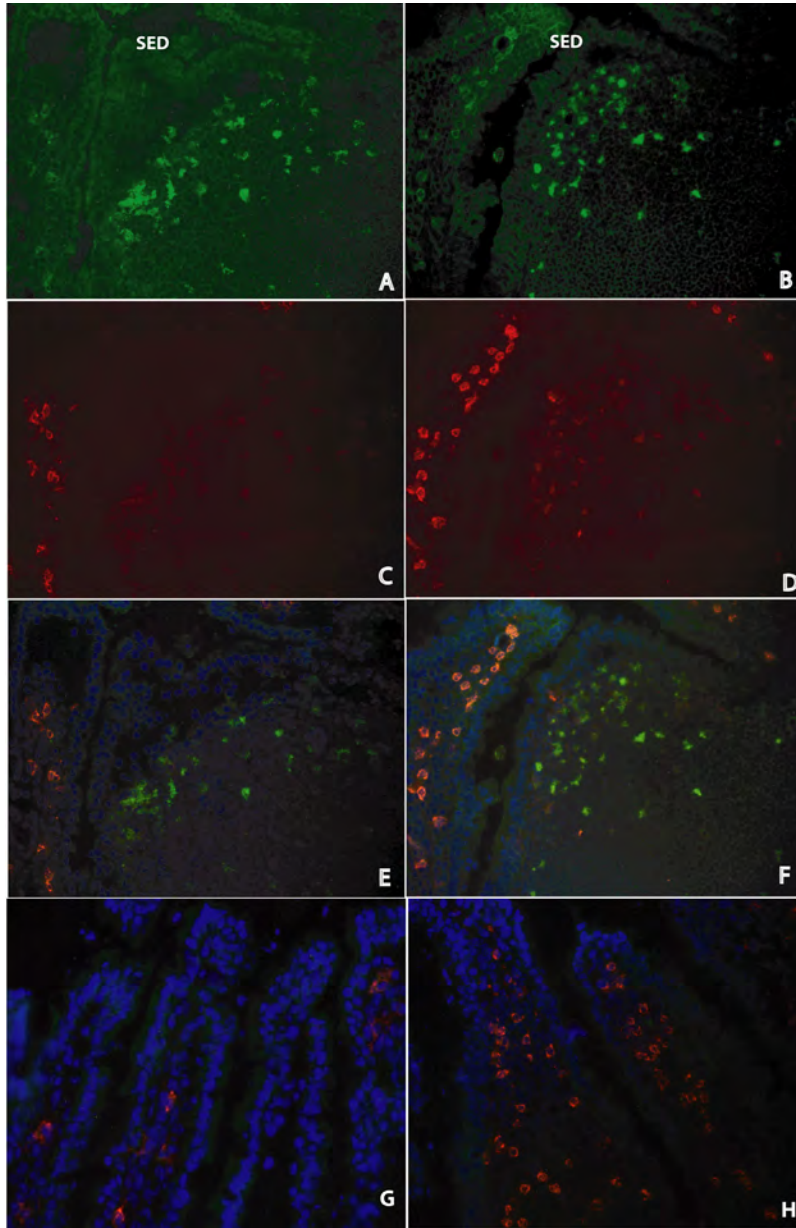
Debido a la complejidad en la caracterización de las subpoblaciones presentes en las PPs, con diversas funciones inmunológicas, decidimos evaluar si era la subpoblación CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> la que presentaba cambios en su distribución histológica. Para ello, se realizaron tinciones dobles utilizando mAbs anti-CD11c-FITC (Fig. 17A y B) y anti-CD11b-PE (Fig. 17C y D) sobre cortes histológicos de

PPs. Al realizar la doble tinción no se logró determinar si era esta población la que realmente migraba a la región del SED (Fig. 17E y F). Sorprendentemente se encontró que las células  $CD11b^+ CD11c^-$  o  $CD11b^+ CD11c^{bajo}$  encontradas en la LP de las vellosidades vecinas a las PPs, aumentaron de manera importante en los ratones infectados (Fig. 17G y H), tratándose probablemente de macrófagos atraídos como consecuencia de la infección, sugiriendo que tanto las DCs como los macrófagos del intestino responden al estímulo inflamatorio causado por rotavirus tanto en las PPs como en la LP de las vellosidades intestinales, y muy probablemente participen con mecanismos diferentes en la eliminación del virus.



**Figura 16. Detección de antígeno viral de rotavirus en las PP y vellosidades del yeyuno durante las primeras 48 horas p.i.** Grupos de 4-5 ratones hembras BALB/c fueron infectados oralmente con  $10^4$ uff de rotavirus silvestre EDIM. A las 48 horas p.i las PPs del yeyuno fueron colectadas, preservadas en medio de congelación y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se realizaron cortes histológicos de  $6\mu\text{m}$  de espesor utilizando un microtomo de congelación. Los cortes fueron fijados con paraformaldehído al 2%. Las DCs fueron detectadas utilizando un mAb CD11c-FITC, y la proteína NSP5 utilizando un anticuerpo policlonal de conejo, y como anticuerpo secundario un anti-IgG de conejo acoplado a Alexa 568. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI. Las muestras fueron analizadas utilizando un microscopio invertido de epifluorescencia. A) Vellosidades del intestino delgado (yeyuno) sin infectar. B) Vellosidades a las 48 horas p.i. C) DCs en las PPs de ratones sin infectar y D) DCs y el antígeno de rotavirus NSP5 en las PPs de ratones infectados a las 48 horas p.i. NSP5= rojo, CD11c= Verde, núcleos=azul.



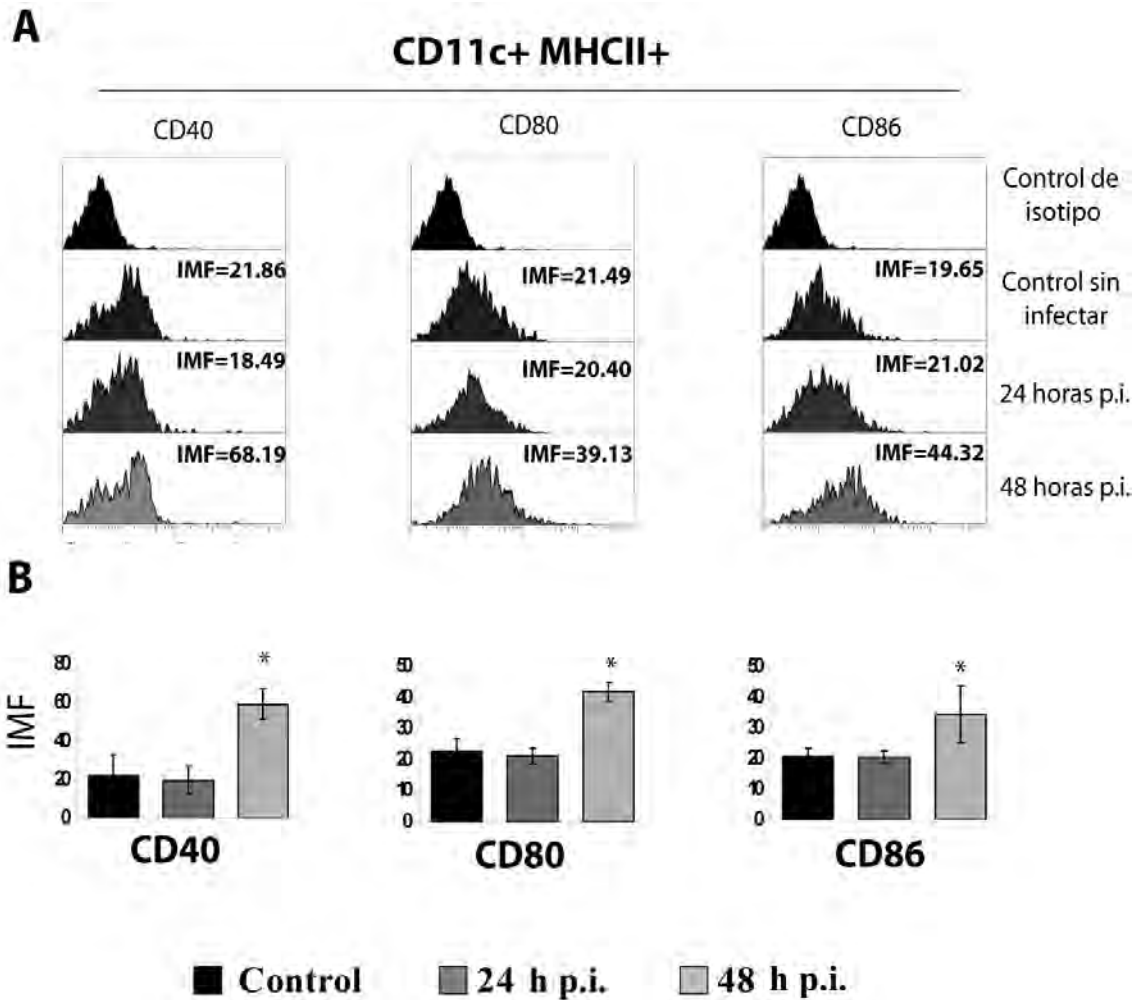


**Figura 17. Distribución de células CD11c<sup>+</sup> y CD11b<sup>+</sup> en PPs y vellosidades del yeyuno en ratones sin infectar e infectados con rotavirus silvestre a las 48 horas p.i.** Siguiendo el protocolo de infección, las PPs del yeyuno fueron colectadas a las 48 horas p.i. Se realizaron cortes histológicos de 6µm de espesor utilizando un microtomo de congelación. Las DCs fueron detectadas utilizando un mAb CD11c-FITC, y las células CD11b<sup>+</sup> utilizando un anti-CD11b-PE. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI. Las muestras fueron analizadas utilizando un microscopio invertido de epifluorescencia. A) DCs de las PPs de ratones sin infectar. B) DCs en las PPs de ratones infectados C) Células CD11b<sup>+</sup> en las PPs de ratones sin infectar, D) Células CD11b<sup>+</sup> en las PPs en ratones infectados, E y F) Colocalización de CD11c<sup>+</sup> y CD11b<sup>+</sup> en las PPs. G) Células CD11b<sup>+</sup> en vellosidades del yeyuno de ratones sin infectar y H) Células CD11b<sup>+</sup> en vellosidades de ratones infectados. Verde= Células CD11c<sup>+</sup>, Rojo= células CD11b<sup>+</sup> y Azul=núcleos.

#### **6.4 Análisis del estado de activación y producción de citocinas en las DCs de las PPs de la región del yeyuno como consecuencia de la infección por rotavirus durante en las primeras 48 horas p.i.**

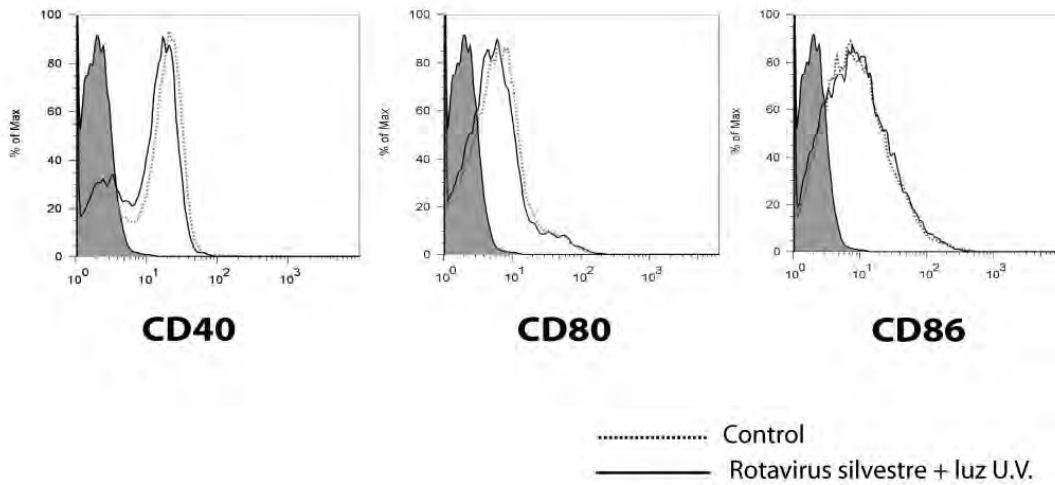
##### ***a) La infección por rotavirus induce un aumento en el número de moléculas coestimuladoras sobre las DCs de las PPs de la región del yeyuno a las 48 horas p.i.***

Como se mencionó anteriormente, las células obtenidas del gradiente presentaron todas las características de DCs, así que para el análisis de activación decidimos enfocarnos en la población CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> y medir la cantidad de moléculas para los marcadores CD40, CD80 y CD86 en células provenientes de las PPs de ratones control e infectados a las 24 y 48 horas (Fig. 18A). Las DCs enriquecidas a partir de las PPs de los ratones infectados mostraron un cambio significativo en la cantidad de moléculas para los marcadores anteriormente mencionados a las 48 horas p.i. dado por la IMF (Fig. 18B). Así mismo, cuando analizamos la misma población pero en DCs provenientes de ratones inoculados con virus tratado con luz U.V. no se encontraron cambios significativos en la IMF (Fig. 19). Estos resultados sugieren que la activación y maduración de las DCs de las PPs depende, al igual que la migración de las DCs al SED de la replicación viral, y resultó ser más evidente a las 48 horas p.i.



**Figura 18. Aumento de las moléculas coestimuladoras sobre la superficie de las DCs de las PPs enriquecidas mediante el gradiente de flotación utilizando medio OptiPrep a las 24 y 48 horas p.i.** Grupos de 4-5 ratones hembras BALB/c fueron infectados oralmente con  $10^4$ uff de rotavirus silvestre EDIM. A las 48 horas p.i las PPs del yeyuno fueron colectadas y las células totales se obtuvieron por disgregación mecánica y enzimática. Las células DCs fueron enriquecidas mediante un gradiente de flotación utilizando medio OptiPrep. Posteriormente fueron teñidas utilizando un mAb contra la integrina CD11c<sup>+</sup>, un mAb anti-MHC II, y con mAbs anti-CD40, anti-CD80 y anti-CD86, y analizadas por citofluorometría. Se analizó el número de moléculas coestimuladoras sobre la superficie de las células dobles positivas CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> dado por la IMF. A) Histogramas de la IMF de las moléculas CD40, CD80 y CD86 sobre la población CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> enriquecidas B) Gráfica de barras de los promedios de las IMF obtenidas. Las barras representan la DS de cuatro experimentos independientes con resultados similares. \* Diferencia significativa con respecto al control ( $P < 0.05$ , prueba *t* de Student's).

## CD11c+ MHC II+



**Figura 19. Análisis de los niveles de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 en las DCs de las PPs de ratones inoculados con el virus tratado con luz U.V., a las 48 horas p.i.** Grupos de 4-5 ratones hembras BALB/c fueron inoculados con  $10^4$  u.f. de rotavirus silvestre EDIM tratado con luz U.V. y psoraleno. A las 48 horas p.i. las PPs del yeyuno fueron colectadas y las células totales se obtuvieron por disgregación mecánica y enzimática. Las células DCs fueron enriquecidas mediante un gradiente de flotación utilizando medio OptiPrep. Se analizó la cantidad de moléculas coestimuladoras dada por la IMF sobre las células CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup>. La figura representa los histogramas obtenidos de la IMF para las moléculas CD40, CD80 y CD86 sobre las células CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup>. El Histograma color gris, es el control de isotipo. Figura representativa de 4 experimentos independientes con resultados similares.

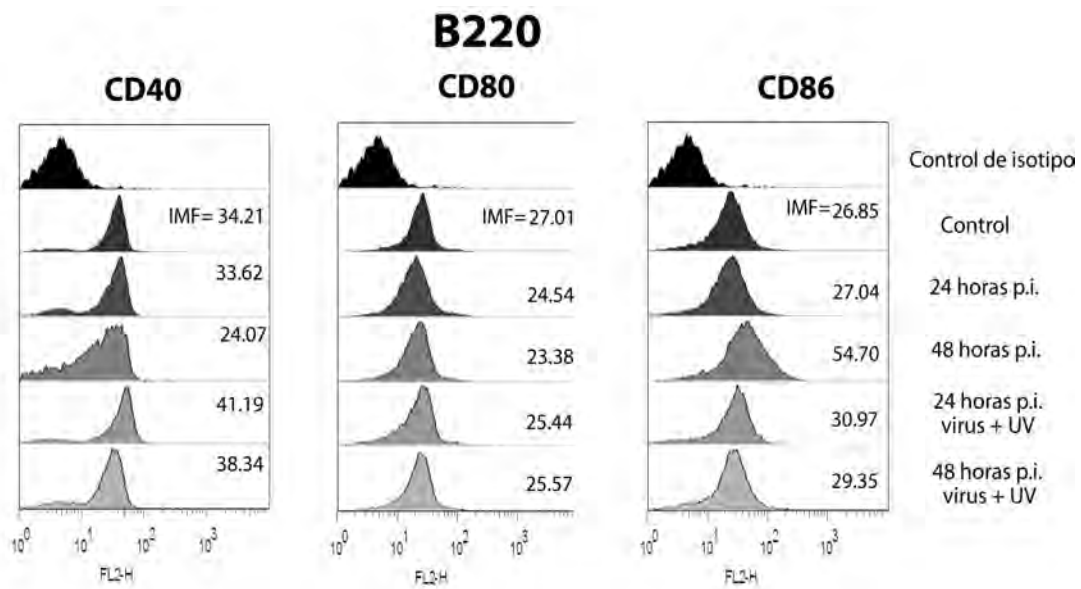
### **b) La infección por rotavirus induce cambios en los marcadores de activación sobre otras poblaciones de CPAs.**

Además de las DCs existen al menos dos poblaciones de CPAs potencialmente importantes en las PPs; los macrófagos y las células B. Al igual que las DCs, los macrófagos y las células B también incrementan los niveles de expresión de las moléculas CD40, CD80 y CD86 sobre su superficie en respuesta a un estímulo antigénico (Rodríguez-Pinto 2005). De tal manera, se decidió evaluar de manera general, el estado de activación de estas dos poblaciones utilizando la expresión de las moléculas CD11b y B220 para la población de macrófagos y células B respectivamente. Este análisis se realizó sobre las células totales obtenidas de las

PPs del yeyuno sobre la región negativa para CD11c y positiva para B220 y CD11b. Con respecto a las células CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup>, aproximadamente un 8%, provenientes de las PPs del yeyuno de ratones infectados a las 48 horas, no mostraron cambios ni en porcentaje, ni en la cantidad de moléculas de activación CD40, CD80 y CD86, evaluado por la IMF (dato no mostrado). Sin embargo, como se había señalado previamente en este trabajo (Fig. 17), histológicamente se encontró un aumento importante de células CD11c<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> en la LP de las vellosidades infectadas a las 48 horas p.i., lo que sugiere que los macrófagos de la LP también responden a la infección. Por otro lado, existen otros mecanismos mediante los cuales los macrófagos llevan a cabo su función efectora y que no necesariamente tienen que ver con el aumento en la expresión de las moléculas coestimuladoras, tales mecanismos incluyen la producción de NO, secreción de citocinas como TNF- $\alpha$ , etc.

En lo que respecta a la población CD11c<sup>-</sup> B220<sup>+</sup>, mayoritariamente células B, sí se observaron cambios en el nivel de expresión de las moléculas coestimuladoras. Inesperadamente, encontramos que la cantidad de la molécula CD40 sobre la superficie de las células, dada por la IMF disminuyó con la infección, siendo más evidente a las 48 horas p.i., sin embargo mostrando un aumento en el porcentaje de un 10% en las células dobles positivas B220<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> a la 48 horas p.i. Así mismo, cuando analizamos la cantidad de moléculas de CD80, no se observaron cambios en la IMF; en cambio la molécula CD86 mostró un aumento en la cantidad de moléculas sobre la superficie celular, dada por la IMF. Finalmente, cuando los ratones fueron inoculados con rotavirus tratado con luz U.V., solamente la molécula CD40 tuvo un ligero pero consistente incremento en la cantidad de moléculas por célula, a las 24 y 48 horas p.i. expresada como IMF (Fig. 20). Este resultado demuestra, que la cinética de expresión de los marcadores de activación sobre las poblaciones CPAs difiere a lo largo del tiempo de infección, y que probablemente la replicación viral sea un factor indispensable para la activación celular eficiente. Por otro lado, la disminución en la cantidad de moléculas CD40 sobre la población B220<sup>+</sup>, es provocada por la presencia de una

población de baja expresión que aparece a las 24 horas p.i. y se intensifica a las 48 horas, sugiriendo que una vez activadas e iniciado su programa de diferenciación hacia células productoras de anticuerpos, las células B ya no requieren de la expresión de CD40 para interactuar con las células T, motivo por el cual la expresión de esta molécula va disminuyendo sobre las células B ya diferenciadas.

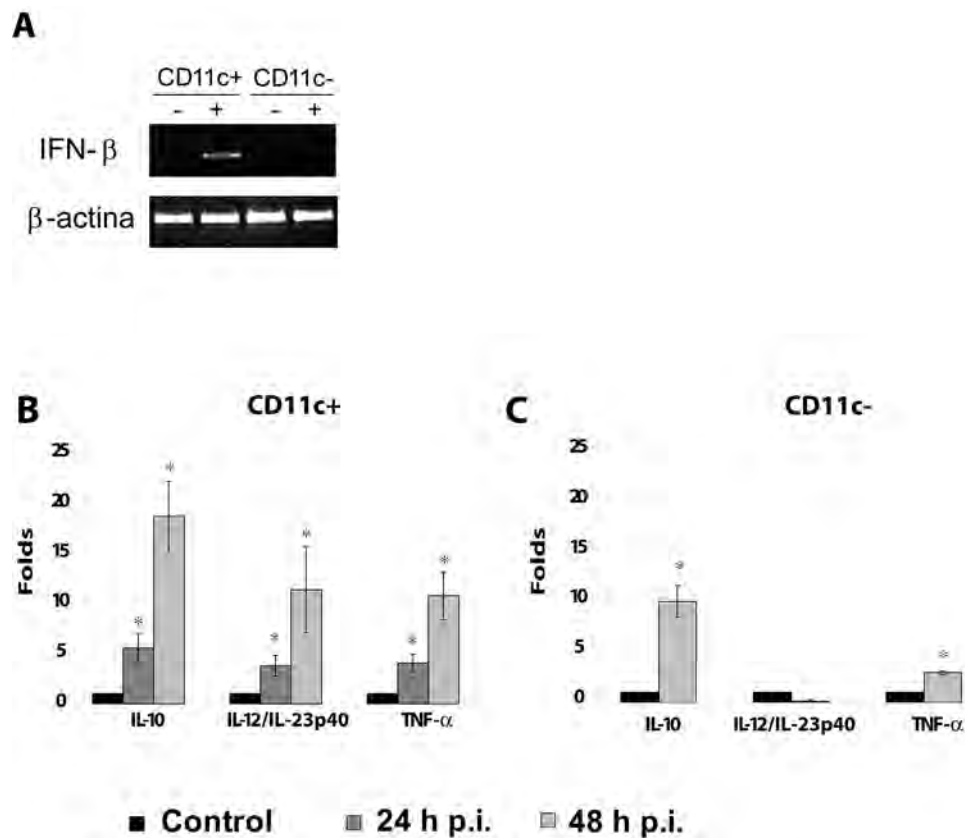


**Figura 20. Análisis de los niveles de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 sobre las células B220+ de las PPs de la región del yeyuno a las 0, 24 y 48 horas p.i. y a las 0, 24, y 48 horas post-inoculación del virus tratado con luz U.V. expresada como IMF.** Grupos de 4-5 ratones hembras BALB/c fueron infectados oralmente con  $10^4$ uff de rotavirus silvestre EDIM o con virus tratado con luz U.V y psoraleno. A las 48 horas p.i las PPs fueron aisladas de la región de yeyuno y las células totales se obtuvieron por disgregación mecánica y enzimática. Las células fueron teñidas con un mAb contra la molécula B220 y con un mAb anti-CD11c. Así mismo se realizó una triple tinción utilizando mAbs anti-CD40, anti-CD80 y anti-CD86. Posteriormente las células fueron analizadas por citofluorometría. Figura representativa de al menos 4 experimentos con resultados similares.

***c) La infección por rotavirus induce el incremento en la expresión de los ARNm para citocinas proinflamatorias y reguladoras en las DCs de las PPs a las 48 horas p.i.***

Una de las características que define a la población de las DCs activadas, es que además de aumentar la cantidad de moléculas coestimuladoras sobre su superficie, es que producen una gran cantidad de citocinas. Estas citocinas contribuyen a la activación de las células T lo que finalmente definirá el tipo de respuesta hacia el antígeno, ya sea una respuesta inflamatoria, o bien una respuesta tolerogénica. Como se demostró anteriormente, las DCs de las PPs de los ratones infectados con rotavirus tienen un fenotipo de activación. Con base en esto, se decidió evaluar si estas células producían citocinas como consecuencia de esta activación, evaluando el aumento de los ARNm para las citocinas IFN- $\beta$ , IL-12/IL-23p40, IL-10 y TNF- $\alpha$ . Una vez estandarizado el método de MACS para la purificación de las DCs de las PPs, tanto para ratones control como para los infectados, las células fueron procesadas para su análisis molecular. Para ello, se extrajo el ARN total utilizando el método de Trizol (ver Sección de Material y Métodos). Posteriormente, se llevó a cabo una reacción de transcriptasa reversa utilizando oligo (dT) para sintetizar el ADNc. El análisis de la expresión de citocinas se llevó a cabo mediante PCR convencional para el caso del gen de IFN- $\beta$  y PCR tiempo real cuantitativo para el resto de las citocinas. En las DCs provenientes de PPs de ratones infectados a las 48 horas p.i., se detectó la presencia de ARNm para el IFN- $\beta$  (Fig. 21A), en comparación con las DCs de ratones no infectados y en la fracción de células CD11c<sup>-</sup> donde no se observó señal alguna. Este resultado confirma la participación de las DCs de las PPs como las principales productoras de IFN- $\beta$  durante las infecciones virales característica reportada previamente en otros modelos (Asselin-Paturel, Boonstra et al. 2001). Por otra parte, mediante PCR tiempo real cuantitativo, las DCs provenientes de las PPs de ratones infectados a las 24 y 48 horas p.i., mostraron un incremento tiempo-dependiente, expresado en “folds”, en la síntesis de los ARNm para las citocinas IL-10, IL-12/23p40 y TNF- $\alpha$ . A las 48 horas p.i. hubo un incremento de 12 y 8 veces en el ARNm para IL-12/23p40 y TNF- $\alpha$  respectivamente, comparado con

los niveles basales en los ratones sin infectar (Fig. 21B). Así mismo, el ARNm para la IL-10 aumentó 19 veces. En la población de células CD11c<sup>-</sup> de ratones infectados a las 48 horas p.i. se observó un incremento de 2.5 y 7 veces del ARNm para TNF- $\alpha$  e IL-10 respectivamente (Fig. 21C), lo que corrobora que hay otras poblaciones celulares que participan en la producción de estas citocinas, como son los macrófagos intestinales, sin embargo para el ARNm IL-12/23p40 no hubo amplificación, confirmando que las DCs activadas son las principales productoras de IL-12 bajo un estímulo antigénico.



**Figura 21. Análisis por PCR y PCR tiempo real de los ARN mensajeros de las citocinas en las DCs purificadas a partir de PPs de ratones infectados a las 48 horas p.i.** A) Amplificación del ARNm por PCR convencional del gen de IFN- $\beta$  en células CD11c<sup>+</sup> purificadas de las PPs de ratones control y de ratones infectados a las 48 horas p.i. B) Cuantificación por PCR tiempo real del ARNm de los genes de las citocinas IL-10, IL-12/23p40 y TNF- $\alpha$  en células CD11c<sup>+</sup> purificadas de PP de ratones control y de ratones infectados a las 24 y 48 horas p.i. C) Cuantificación por PCR tiempo real del ARNm de los genes de las citocinas IL-10, IL-12/23p40 y TNF- $\alpha$  en células CD11c<sup>-</sup> obtenidas de la purificación de las DCs de las PPs de ratones control y de ratones infectados a las 48 horas p.i. \* Diferencia significativa con respecto al control ( $P < 0.05$ , prueba  $t$  de Student's). Las barras representan el ES de cuatro experimentos independientes.



## 7. DISCUSION.

Rotavirus infecta y se replica dentro de los enterocitos presentes en las puntas de las vellosidades del intestino delgado, y en el presente trabajo se observó que, durante las primeras 48 horas p.i, los mayores cambios, tanto a nivel macroscópico como celular, comienzan principalmente en la región media del intestino delgado comprendida entre el yeyuno e ileón. Este es el primer trabajo que reporta que dicha región es el posible sitio de establecimiento de la infección. La infección induce una respuesta inmune antígeno-específica mediada tanto por células T como por células B. Esta respuesta genera protección total contra futuras reinfecciones, protegiendo incluso contra otras cepas de rotavirus, aunque de manera atenuada. La respuesta inmune adquirida contra rotavirus ha sido ampliamente estudiada en el modelo murino de infección, principalmente estudiando los mecanismos protectores para el desarrollo de vacunas, adyuvantes y vías de administración más eficientes (Franco, Feng et al. 1996; Feng, Franco et al. 1997; Franco and Greenberg 1999; Choi, McNeal et al. 2003). Sin embargo, el estudio de los elementos de la inmunidad innata ha sido poco abordado en modelos *in vivo*. La mayoría de los reportes sobre los elementos de la inmunidad innata en presencia de rotavirus, se han realizado en modelos celulares *in vitro*, los cuales al ser ambientes controlados, sin el microambiente y diversos factores presentes durante una infección natural, no siempre asemejan lo que sucede en una infección *in vivo* (Narvaez, Angel et al. 2005; Douagi, McInerney et al. 2007; Istrate, Douagi et al. 2007).

Siendo las DCs parte central en el desarrollo de la respuesta inmune antiviral, y siendo rotavirus un virus que infecta el intestino, decidimos evaluar a la población de las DCs en las PPs, órganos con una gran importancia en el desarrollo de la respuesta inmune intestinal. El estudio lo realizamos dentro de las primeras 48 horas p.i., tiempo en el cual el virus entra a las células y comienza a replicarse, produciendo grandes cantidades de antígeno viral en el intestino. Además, del reconocimiento de los componentes de rotavirus durante las primeras etapas de la

infección por parte de las DCs, dependerá la eficiente activación de las células T y de las células B y, por tanto la eliminación del virus y el desarrollo de la respuesta inmune protectora.

La infección por rotavirus en el modelo murino, es una infección aguda que es resuelta en aproximadamente 8 días, tiempo en el cual, se presentan cambios significativos en la dinámica poblacional de las PPs. En nuestro trabajo, inicialmente evaluamos el estado general de las PPs, observando una hipertrofia importante de las PPs de la región del yeyuno-íleon a las 48 horas p.i. región que proponemos como sitio de establecimiento de la infección. Cabe mencionar que la mayoría de los cambios observados, son más evidentes a las 48 horas p.i., tiempo al cual se da un drástico aumento en la cantidad de virus excretado en las heces de los ratones infectados, aumentando la disponibilidad de antígeno en el lumen intestinal. El aumento en el tamaño de las PPs, corresponde con el incremento en el número absoluto de las diferentes poblaciones celulares, particularmente de las células B, las cuales presentan una proliferación temprana al día 2 p.i. como consecuencia de la infección. Este resultado ha sido anteriormente reportado por Blutt et al. (Blutt, Warfield et al. 2002), mostrando un aumento significativo tanto en el tamaño de las PPs como en la población de células B, observaciones que coinciden con las nuestras. Las DCs, al igual que los macrófagos, aumentaron el número de células dentro de las PPs de los ratones infectados a las 48 horas p.i., pero sin un cambio en el porcentaje. Esto sugiere que a tiempos posteriores a la entrada del virus a las células epiteliales, existe un flujo de DCs y posiblemente macrófagos y de todas las otras células que pudieran presentar las moléculas CD40, CD80, CD86 provenientes de la circulación periférica en respuesta al estímulo inflamatorio generado en el intestino, como consecuencia de la infección. Recientemente, Zhang et al, utilizando cerdos neonatos infectados con rotavirus, demostraron el reclutamiento de monocitos-macrófagos en el ileón, pero no de la población de DCs, basándose únicamente en el porcentaje, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, en donde el porcentaje de DCs se mantiene constante, sin embargo, no consideran el número absoluto de células,

siendo que las PPs de los cerdos neonatos, presentan hipertrofia al día 5 p.i., similar a lo observado en el ratón, en donde esta hipertrofia esta asociada a un aumento del número de células en la zona del yeyuno-íleon.

Teniendo como antecedente el resultado de un aumento en el número absoluto de células en las PPs, se evaluó el estado de activación de las CPAs de las PPs, para posteriormente enfocarnos en la población de DCs. De manera general encontramos cambios significativos en el número de moléculas por célula dado por la IMF para los marcadores CD40, CD80 y CD86 sobre las DCs. Estas moléculas son consideradas como marcadores de maduración y activación en las CPAs posterior a un estímulo antigénico. Sin embargo el porcentaje permanece sin cambios, esto sugiere que la homeostasis de las PPs permanece constante durante las primeras etapas de la infección por rotavirus, independientemente de la proliferación y migración celular hacia estos órganos. Por otra parte, las células totales aisladas de las PPs de ratones infectados a las 48 horas muestran un aumento en el porcentaje de células productoras para la IL-12, citocina pro-inflamatoria y para la IL-10 citocina reguladora, muy importante en los procesos infecciosos en la mucosa intestinal. Estos resultados demuestran que el virus está siendo reconocido por las células linfoides de las PPs y éstas responden produciendo citocinas.

En el análisis inmunohistoquímico de las PPs, encontramos que las DCs *in situ* se redistribuyen dentro de las PPs hacia la región del SED, conforme avanza el tiempo de infección, siendo a las 48 horas p.i. el tiempo donde las DCs se encuentran en la región del SED. Este tipo de migración, ha sido descrita en folículos linfoides de terneras infectadas con rotavirus (Torres-Medina 1984), en donde además fue posible observar por microscopía electrónica, partículas virales dentro de vacuolas en el FAE, y en el espacio intercelular entre el FAE y las células que migran a través del SED. El reclutamiento de las DCs en el SED, ha sido descrito en otros modelos con antígenos orales, como la toxina de cólera y *Salmonella* (Sierro, Dubois et al. 2001; Shreedhar, Kelsall et al. 2003), cuya

inoculación provoca una rápida movilización de las DCs inmaduras hacia la región del SED, constantando el fuerte estímulo antigénico de los componentes bacterianos los cuales probablemente señalicen una gran cantidad de PRRs sobre las células epiteliales y sobre las DCs (Shreedhar, Kelsall et al. 2003; Anjuere, Luci et al. 2004; Salazar-Gonzalez, Niess et al. 2006).

En el caso de de la infección por rotavirus, la concentración de DCs en la región del SED, no es visualizada sino hasta las 24 horas, siendo más evidente a las 48 horas p.i. Otro hallazgo importante observado a este tiempo p.i., fue la gran cantidad de células CD11c<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> en la LP de las vellosidades del yeyuno, lo que sugiere que existen otras poblaciones, entre ellas los macrófagos, que responden al estímulo generado como consecuencia de la infección. Así mismo, encontramos que a las 48 horas p.i., hay poco pero detectable antígeno viral en las PPs, encontrando la presencia de la proteína NSP5, sin embargo ésta no colocaliza con las DCs, evento que corroboró la baja incidencia de infección dentro de las DCs.

La cercanía de las DCs con el SED, permite mantener un contacto más estrecho con el FAE, sitio en el cual se encuentran las células M encargadas de introducir antígenos a las PPs. Esta migración, posiblemente tenga como consecuencia el aumento en la captación de antígeno por parte de las DCs. Esta movilización hacia el SED, depende de la expresión del receptor CCR6 sobre las DCs, cuyo ligando, CCL20 lo expresan las células del FAE. Estudios recientes, demuestran que CCL20 producido en células epiteliales en presencia de flagelina de *Salmonella enterica* serovariedad Typhi *in vitro*, atraen a células DCs inmaduras derivadas de monocitos de sangre periférica (Sierro, Dubois et al. 2001). Así mismo, se ha demostrado que el receptor CCR6, es el responsable de la presencia de las DCs en el SED de las PPs, ya que utilizando ratones KO CCR6<sup>-/-</sup>, no hay DCs en esta región y tienen un incremento en el número de células T en GALT. Adicionalmente, los ratones CCR6<sup>-/-</sup> infectados con rotavirus, presentaron un déficit en la producción de IgAs específicas contra rotavirus, retardando la

eliminación de rotavirus en ratones infectados (Cook, Prosser et al. 2000). Por lo tanto, la redistribución de las DCs hacia el SED, parece ser indispensable para la inducción de la producción de IgA y el mantenimiento de la homeostasis de células T en la mucosa intestinal.

Una vez que se determinó histológicamente la redistribución de las DCs hacia el SED durante las primeras 48 horas p.i. con rotavirus, evaluamos la expresión del receptor CCR6 por citofluorometría sobre la población de DCs. Acorde con la migración, encontramos un ligero aumento en el número de moléculas de CCR6 dada por la IMF sobre las células CD11c+. Cabe mencionar, que CCR6 se encuentra de manera constitutiva en algunas subpoblaciones de DCs en las PPs, por lo que los cambios en la IMF, son muy sutiles, pero son detectables, hecho que sugiere que algunas subpoblaciones de DCs de las PPs que no expresaban CCR6, comienzan a expresar dicho receptor, aunque la posibilidad de un aumento en el ligando CCL20, expresado en la región del FAE, podría ser el factor determinante en la atracción de las DCs a la región del SED, parámetro que no fue evaluado en este trabajo.

Todas estas evidencias histológicas, sugieren que las DCs de las PPs están siendo activadas por el estímulo antigénico y las señales de peligro enviadas por las células epiteliales en respuesta a la infección por rotavirus. Así que decidimos analizar el fenotipo de activación de las DCs de las PPs a 0, 24 y 48 horas p.i., ya que además de la presentación de antígeno, la activación de las células T dependerá de la expresión de moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86 en las DCs activadas. Sin embargo, debido al bajo porcentaje de las DCs en las PPs, fue necesaria la implementación de un gradiente de enriquecimiento utilizando medio OptiPrep que nos permitió el análisis más detallado de la población, obteniendo una mayor cantidad de eventos de DCs mediante citofluorometría. Mediante el gradiente de flotación con Optiprep, diseñado exclusivamente para la población de DCs en la mucosa intestinal, logramos enriquecer la población de DCs cuatro veces y eliminar casi por completo a los

macrófagos. Los análisis de citofluorometría sobre la expresión de las moléculas coestimuladoras, se realizaron dentro de la población doble positiva CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup>, garantizando así, el fenotipo clásico de las DCs. Sin embargo, siendo el marcador CD11c una molécula presente en otras poblaciones celulares, decidimos ampliar el análisis del fenotipo de las células CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> utilizando los marcadores F4/80 y CD11b encontrados en poblaciones de monocitos y macrófagos. Los resultados obtenidos muestran que en la población CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup>, aproximadamente un 15% del total de la población enriquecida tienen niveles bajos de la molécula F4/80 y que aproximadamente un 50% tienen el marcador CD11b pero en muy baja intensidad. Estos resultados indican que la población enriquecida mediante el protocolo utilizado, tiene las características fenotípicas de la población de DCs en el intestino (van den Berg and Kraal 2005; Platt and Mowat 2008). Dentro de la población de DCs enriquecidas, se detectó un aumento significativo en la cantidad de las moléculas CD40, CD80 y CD86, dada por la IMF confirmando el fenotipo de activación de las DCs. El incremento en la IMF, fue mucho más evidente a las 48 horas p.i., y no descartamos que a tiempos posteriores, las DCs que migraron al SED, retornen a las zonas ricas en células T y llevar a cabo la presentación de antígeno a las células vírgenes, como se ha demostrado en ratones infectados con reovirus (Fleaton, Contractor et al. 2004) y con *S. enterica* serovariedad Typhimurium (Salazar-Gonzalez, Niess et al. 2006).

La movilización y la activación de las DCs de las PPs, depende de la replicación viral, esto lo demostramos inoculando ratones con rotavirus tratado con luz U.V. y psoraleno. Mediante este tratamiento logramos abatir la replicación viral en un 95% en células en cultivo, mientras que *in vivo*, los ratones inoculados con las mismas dosis de virus tratado, muestran una curva de excreción de antígeno viral que presenta un retraso de 72 horas. Esto indica que hay partículas virales infecciosas que escapan al tratamiento y son capaces de replicarse en el intestino causando una infección. Sin embargo, la infección causada con los virus tratados con U.V. se da de manera atenuada, ya que comienza 72 horas después y termina al día 8 p.i. al igual que en los ratones inoculados con el virus sin tratamiento. Este

retraso en la curva de replicación, abre una ventana de tiempo suficiente para evaluar la participación de las DCs de las PPs en condiciones diferentes a la infección natural tanto en la cantidad disponible de antígeno viral en el lumen intestinal, como en la cantidad de células epiteliales infectadas, pero con la misma dosis inicial de antígeno viral inoculado.

Al analizar las DCs de los ratones inoculados con el virus tratado con luz U.V., encontramos que no hay activación, ni movilización de las DCs a las 48 horas p.i. Estos resultados indican que el incremento de la carga viral en el lumen intestinal y muy probablemente el número de células epiteliales infectadas sean factores necesarios para que las DCs de las PPs se activen eficientemente.

Otra de las funciones principales de las DCs, es la producción de citocinas en respuesta a un estímulo antigénico. En las DCs de las PPs durante la infección por rotavirus decidimos evaluar la producción de citocinas, midiendo la síntesis de ARNm para las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-12/23p40 e IFN- $\beta$ , así como la producción de ARNm para la citocina reguladora IL-10 producida principalmente por algunas subpoblaciones de DCs intestinal, entre las que se encuentran las pDCs intestinales, las cuales se ha reportado que producen IL-10 en las PPs bajo un estímulo antigénico.

Con la finalidad de evaluar más detalladamente a la población de DCs, estas fueron purificadas positivamente mediante el método de MACS, obteniendo un 90% de células CD11c<sup>+</sup> y dentro de estas el 90% son CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup>. El análisis de la producción de ARNm, se llevo a cabo utilizando PCR y PCR tiempo real.

La producción de las citocinas IL-12/23p40 e IFN- $\beta$  fue encontrada exclusivamente en las DCs, mientras que en la población CD11c<sup>-</sup> no muestra presencia de ARNm para estas citocinas, corroborando lo reportado anteriormente, donde se demuestra que las DCs son las principales productoras de IL-12 e IFN-I en infecciones virales (Sato and Iwasaki 2005; Contractor, Louten et al. 2007). Por

otro lado, las DCs presentaron un aumento en la expresión de ARNm para las citocinas IL-10 y TNF- $\alpha$  mucho mayor que la población CD11c<sup>-</sup>, 19 contra 7 veces para IL-10 y 7 contra 2.5 veces para TNF- $\alpha$  respectivamente. No se descarta la posible participación de las células contaminantes (10%) en la producción de las citocinas, sin embargo, consideramos que esta contribución es mínima comparada con la producción de las DCs, por lo que nuestros resultados corroboran el fenotipo de activación observado por citofluorometría y la producción de citocinas IL-12 e IL-10 observadas en células totales de las PPs, la cual interesantemente corresponde en porcentaje de células productoras, al porcentaje de DCs presentes en las PPs. De tal manera que podemos concluir, que son las DCs las principales productoras de estas citocinas en la infección por rotavirus.

La producción simultánea de ambos tipos de citocinas, proinflamatorias y reguladoras, es un mecanismo de protección en el intestino. Por otra parte, se ha descrito que algunas subpoblaciones de DCs intestinales CD11b<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> son productoras de IL-10 bajo estímulo antigénico, a diferencia de las CD11b<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> las cuales producen niveles considerables de IFN-I e IL-12 cuando son activadas (Iwasaki and Kelsall 1999; Iwasaki 2007). Estos resultados denotan la mezcla de subpoblaciones presentes en las PPs, que bajo el mismo estímulo antigénico producen diferentes citocinas. La producción de citocinas reguladoras en la mucosa intestinal, como resultado de la infección por rotavirus, podría actuar como un mecanismo protector, reduciendo el daño tisular mediante el control de una respuesta inflamatoria exacerbada, que traería consecuencias negativas en la función del intestino.

Durante la infección por rotavirus, detectamos la presencia del ARNm para el INF- $\beta$ , expresado en las DCs de las PPs. Esta citocina forma parte de los IFN-I, citocinas importantes en el establecimiento de la respuesta inmune antiviral. Aunque cualquier célula infectada es capaz de producir IFN-I, las DCs son las principales productoras, particularmente las pDCs, así que no descartamos que el ARNm provenga de la población de pDCs de las PPs, aunque se ha descrito que



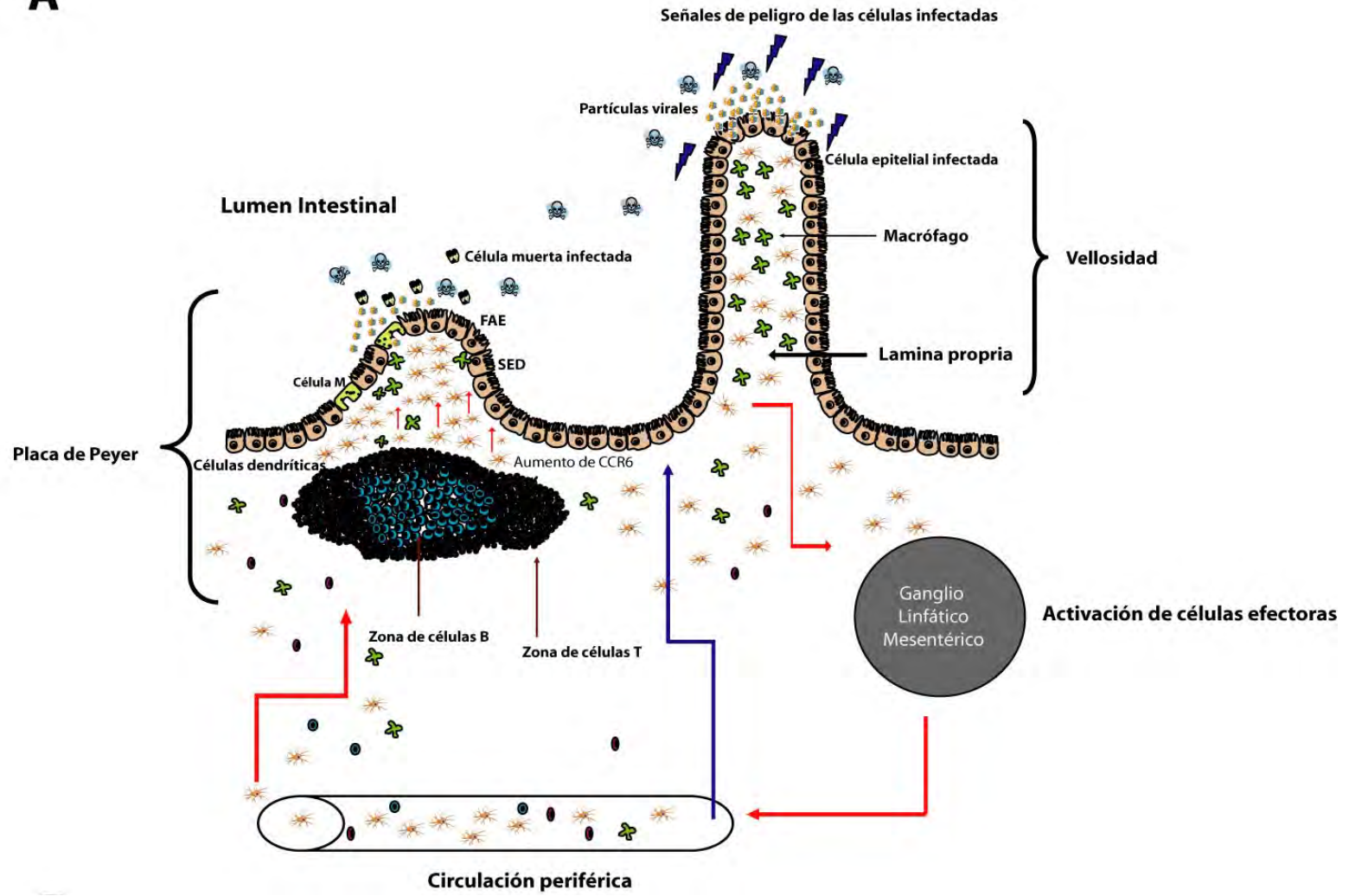
las pDCs de las PPs producen muy bajas cantidades de IFN-I en infecciones virales debido al ambiente regulador predominante (Contractor, Louten et al. 2007) , además de que producen preferencialmente IFN- $\beta$  cuando son estimuladas vía TLR.

El IFN- $\beta$ , tiene efectos sobre varias poblaciones celulares, en las DCs incrementa la activación, el procesamiento y presentación de antígeno, y el aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras y promueve la presentación cruzada. La transcripción de los genes que codifican para IFN-I, se encuentra regulada por la dimerización de los factores IRF. IRF3 es expresado en la mayoría de las células nucleadas pero requiere de la retroalimentación de IFN-I para mantener su producción. IRF7, es el factor transcripcional expresado constitutivamente en las pDCs, característica que las define como las principales productoras de IFN-I durante las infecciones virales. Con base en lo anterior, recientemente se ha descrito un mecanismo de evasión de la respuesta inmune innata por parte de RV. Este mecanismo consiste en enviar a degradación a los factores transcripcionales IRF e inhibir la producción de IFN-I a través de la proteína NSP1 de rotavirus. Esta proteína sólo se expresa cuando hay replicación viral dentro de las células infectadas y promueve la degradación tanto IRF3 como IRF7. Este mecanismo de evasión propuesto para RV, ha sido demostrado únicamente en modelos celulares *in vitro*. En la infección por RV *in vivo*, las DCs son capaces de producir IFN- $\beta$ , además de que tanto *in vitro* como *in vivo*, la incidencia de infección por RV en las DCs es menor al 1%, por esta razón, el mecanismo de degradación de los factores IRF por NSP1, probablemente se lleva a cabo en las células epiteliales infectadas durante las primeras horas de infección, permitiendo al virus replicarse y asegurar una producción de progenie viral infecciosa para infectar a las células vecinas.

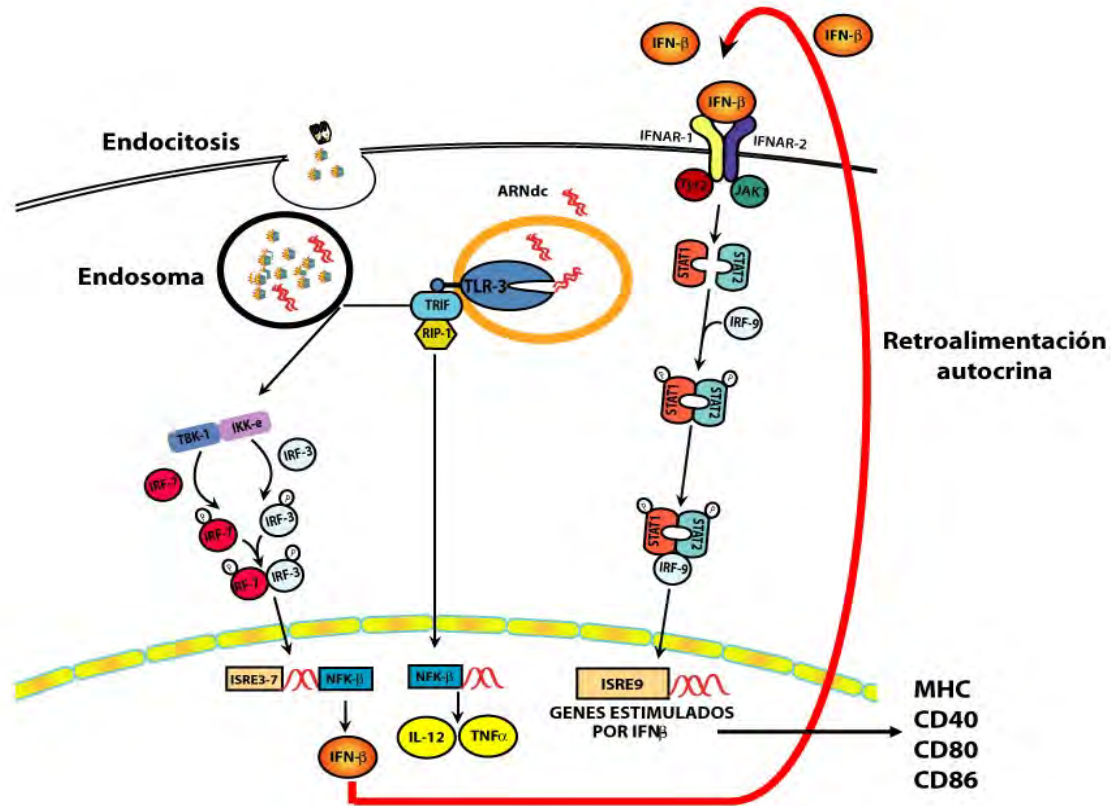
Con los datos anteriores y los reportes sobre la participación de los TLRs en la producción de IFN-I, proponemos el siguiente mecanismo de reconocimiento por las DCs intestinales durante la infección por rotavirus *in vivo*:

Inicialmente, el aumento en la cantidad de antígeno viral disponible en el lumen intestinal, a las 48 horas p.i., induce un mayor transporte de antígeno a las PPs por las células M. Este aumento en el antígeno y probablemente en las señales de peligro de las células epiteliales infectadas, tales como la producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias, inducen el reclutamiento de DCs a la región del SED de las PPs. Esto gracias al aumento en la expresión de CCR6 sobre las DCs y probablemente al aumento en la secreción de CCL20 por el FAE (Fig. 22A). Así mismo, las DCs comienzan a internalizar antígeno viral, tanto de partículas libres como de células epiteliales infectadas. De tal manera que el ARNdc de rotavirus es reconocido por el TLR3 de las DCs. Este reconocimiento induce una cascada de señalización dependiente de TRIF, que culmina con la producción de IFN- $\beta$ . El IFN- $\beta$  es secretado al medio extracelular y señala de manera autocrina y paracrina a las DCs. Esta retroalimentación fomenta la producción de más IFN- $\beta$ , además de inducir la activación de NF $\kappa$ b, y por tanto la producción de citocinas pro-inflamatorias, IL-12/IL-23p40, TNF- $\alpha$  e IL-10 (Fig. 22B), aunque esta última es considerada como una citocina reguladora, también se encuentra involucrada en procesos inflamatorios en la mucosa intestinal y es producida principalmente por la población de células CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cuando captan un estímulo antigénico. Así mismo, este modelo propuesto involucra a las DCs intestinales convencionales y no a las pDCs, ya que como se mencionó anteriormente, TLR3 es expresado principalmente en las DCs convencionales y producen principalmente IFN- $\beta$  (Fig. 22B), a diferencia de las pDCs, cuya expresión de TLR3 es casi nula y cuando son activadas en el intestino producen IFN- $\alpha$  preferencialmente en cantidades muy bajas como consecuencia del estado de inflamación controlado por la presencia de TGF- $\beta$  e IL-10.

A



B



**Figura 22.** Modelo propuesto del reconocimiento de los elementos de rotavirus por las DCs de las PPs. A) Adquisición de antígeno en las PPs a través de las células M proveniente de partículas virales libres del lumen intestinal o células muertas. B) Reconocimiento de los componentes de rotavirus por una DC de la PP, y vías de señalización para la producción de citocinas y moléculas coestimuladoras.

Los resultados obtenidos durante este trabajo fueron publicados en febrero de 2010 (Lopez-Guerrero, Meza-Perez et al. 2010) y demuestran que las DCs intestinales de las PPs durante la infección por rotavirus, participan activamente en la respuesta inmune antiviral. Así mismo, la contribución de la respuesta inmune innata en el reconocimiento de la infección por rotavirus, desencadena la subsecuente activación de las células T y células B, las cuales resultan cruciales en la terminación de la infección y desarrollo de la respuesta protectora. Es necesario, que en futuros estudios, se incluyan las poblaciones de DCs de la LP y del GLM, con la finalidad de tener un panorama mucho más completo de la participación de las DCs intestinales en la infección por rotavirus.

## 8. CONCLUSIONES.

- La infección por rotavirus induce un aumento significativo en el número absoluto de células B, macrófagos y DCs de las PPs de la región del yeyuno durante las primeras 48 horas p.i
- La infección por rotavirus induce la activación de las DCs de las PPs durante las primeras 48 horas p.i., esta activación se ve reflejada, en la migración de las DCs hacia la región del SED, en el aumento en la cantidad del receptor CCR6, en el aumento en la cantidad de las moléculas coestimuladoras sobre su superficie y en la producción de citocinas pro-inflamatorias y reguladoras, demostrando la participación de las DCs tanto en la respuesta inmune contra rotavirus como en el mantenimiento del ambiente altamente regulado presente en el intestino.
- Tanto la migración como el aumento en las moléculas coestimuladoras sobre la superficie de las DCs son dependientes del tiempo de infección y de la replicación viral.
- Las DCs de las PPs no presentaron replicación viral durante las primeras 48 horas p.i. *in vivo*.

## 9. PERSPECTIVAS.

- Establecer el fenotipo de las poblaciones de DCs activadas durante la infección y su contribución en la presentación de antígeno y producción de citocinas, tanto pro-inflamatorias como reguladoras.
- Evaluar la participación de las diferentes subpoblaciones de DCs en la LP y del GLM y su activación a los mismos tiempos analizados.
- Evaluar el estado de activación de las DCs con cinéticas mayores así como la producción de citocinas pro-inflamatorias y reguladoras, así como el aumento en los receptores para quimiocinas CCR6, CCR7 y CCR9.
- Evaluar el aumento en las moléculas CCL20 y CCL21 en las PPs, GLM y LP como consecuencia de la infección por rotavirus durante la duración de la infección.
- Establecer la participación de los macrófagos en la LP y la producción de citocinas pro-inflamatorias y reguladoras, así como otros mecanismos como la producción de NO.
- Aislar las células epiteliales infectadas a tiempos muy tempranos de la infección y evaluar la expresión de IRF3 e IRF 7 *in vivo* y su asociación con NSP1, y evaluar la producción de IFN-I dentro de éstas células.
- Purificar las DCs intestinales de PP, GLM y LP y hacer ensayos de proliferación de células T *in vitro*.
- Evaluar la participación de las DCs intestinales en modelos vacunales o con virus tratado con luz U.V. abarcando los 8 días de duración de la infección.

- Establecer la participación de los TLRs, particularmente de TLR3 y TLR4 en el reconocimiento de los componentes de rotavirus por las DCs intestinales durante una infección natural utilizando de ratones deficientes en éstos TLRs.
- Determinar lo anteriormente mencionado utilizando el modelo del ratón neonato durante la infección por rotavirus.
- Evaluar lo anteriormente mencionado utilizando el modelo de depleción transitoria de células CD11c con ratones transgénicos CD11c-receptor de la toxina diftérica.
- Determinar el estado de activación de las DCs de GLM y de LP durante las 48 horas p.i. y establecer su participación en la producción de citocinas proinflamatorias y reguladoras.



## 10. BIBLIOGRAFÍA.

- Abreu, M. T. (2010). "Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function." Nat Rev Immunol **10**(2): 131-44.
- Ahonen, C., E. Manning, et al. (2002). "The CD40-TRAF6 axis controls affinity maturation and the generation of long-lived plasma cells." Nat Immunol **3**(5): 451-6.
- Anjuere, F., C. Luci, et al. (2004). "In vivo adjuvant-induced mobilization and maturation of gut dendritic cells after oral administration of cholera toxin." J Immunol **173**(8): 5103-11.
- Ardavin, C. (2003). "Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells." Nat Rev Immunol **3**(7): 582-90.
- Arias, C. F., M. Lizano, et al. (1987). "Synthesis in Escherichia coli and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity." J Gen Virol **68 ( Pt 3)**: 633-42.
- Arias, C. F. and S. López (2001). Microbios en línea. <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>.
- Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, et al. (2001). "Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology." Nat Immunol **2**(12): 1144-50.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.
- Banos, D. M., S. Lopez, et al. (1997). "Identification of a T-helper cell epitope on the rotavirus VP6 protein." J Virol **71**(1): 419-26.
- Barro, M. and J. T. Patton (2005). "Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(11): 4114-9.
- Barro, M. and J. T. Patton (2007). "Rotavirus NSP1 Inhibits Expression of Type I Interferon by Antagonizing the Function of Interferon Regulatory Factors IRF3, IRF5, and IRF7." J Virol.
- Bilsborough, J. and J. L. Viney (2004). "Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease." Gastroenterology **127**(1): 300-9.
- Blutt, S. E., D. O. Matson, et al. (2007). "Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia." PLoS Med **4**(4): e121.
- Blutt, S. E., K. L. Warfield, et al. (2002). "Early response to rotavirus infection involves massive B cell activation." J Immunol **168**(11): 5716-21.
- Bogunovic, M., F. Ginhoux, et al. (2009). "Origin of the lamina propria dendritic cell network." Immunity **31**(3): 513-25.
- Bowie, A. G. and L. Unterholzner (2008). "Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling." Nat Rev Immunol **8**(12): 911-22.
- Brown, K. A. and P. A. Offit (1998). "Rotavirus-specific proteins are detected in murine macrophages in both intestinal and extraintestinal lymphoid tissues." Microb Pathog **24**(6): 327-31.
- Burns, J. W., A. A. Krishnaney, et al. (1995). "Analyses of homologous rotavirus infection in the mouse model." Virology **207**(1): 143-53.
- Burns, J. W., M. Siadat-Pajouh, et al. (1996). "Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity." Science **272**(5258): 104-7.
- Cao, W. and Y. J. Liu (2006). "Innate immune functions of plasmacytoid dendritic cells." Curr Opin Immunol.
- Cario, E. (2008). "Barrier-protective function of intestinal epithelial Toll-like receptor 2." Mucosal Immunol **1 Suppl 1**: S62-6.

- Colonna, M., G. Trinchieri, et al. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells in immunity." Nat Immunol **5**(12): 1219-26.
- Contractor, N., J. Louten, et al. (2007). "Cutting edge: Peyer's patch plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce low levels of type I interferons: possible role for IL-10, TGFbeta, and prostaglandin E2 in conditioning a unique mucosal pDC phenotype." J Immunol **179**(5): 2690-4.
- Cook, D. N., D. M. Prosser, et al. (2000). "CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue." Immunity **12**(5): 495-503.
- Coomes, J. L. and F. Powrie (2008). "Dendritic cells in intestinal immune regulation." Nat Rev Immunol **8**(6): 435-46.
- Courreges, M. C., D. Burzyn, et al. (2007). "Critical role of dendritic cells in mouse mammary tumor virus in vivo infection." J Virol **81**(8): 3769-77.
- Cui, Y., L. Kang, et al. (2009). "Human gammadelta T cell recognition of lipid A is predominately presented by CD1b or CD1c on dendritic cells." Biol Direct **4**: 47.
- Cunliffe, N. A. and O. Nakagomi (2005). "A critical time for rotavirus vaccines: a review." Expert Rev Vaccines **4**(4): 521-32.
- Cutler, C. W. and R. Jotwani (2006). "Dendritic cells at the oral mucosal interface." J Dent Res **85**(8): 678-89.
- Choi, A. H., M. M. McNeal, et al. (2003). "Functional mapping of protective epitopes within the rotavirus VP6 protein in mice belonging to different haplotypes." Vaccine **21**(7-8): 761-7.
- del Rio, M. L., G. Bernhardt, et al. (2010). "Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells." Immunol Rev **234**(1): 268-81.
- Denning, T. L., Y. C. Wang, et al. (2007). "Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses." Nat Immunol **8**(10): 1086-94.
- Di Pucchio, T., B. Chatterjee, et al. (2008). "Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I." Nat Immunol **9**(5): 551-7.
- Douagi, I., G. M. McInerney, et al. (2007). "Role of interferon regulatory factor 3 in type I interferon responses in rotavirus-infected dendritic cells and fibroblasts." J Virol **81**(6): 2758-68.
- Eberl, G. (2005). "Inducible lymphoid tissues in the adult gut: recapitulation of a fetal developmental pathway?" Nat Rev Immunol **5**(5): 413-20.
- Eberl, G. and S. Sawa (2009). "Opening the crypt: current facts and hypotheses on the function of cryptopatches." Trends Immunol.
- Erickson, L. D., L. A. Vogel, et al. (2000). "B cell immunopoiesis: visualizing the impact of CD40 engagement on the course of T cell-independent immune responses in an Ig transgenic system." Eur J Immunol **30**(11): 3121-31.
- Esquivel, F. R., S. Lopez, et al. (2000). "The internal rotavirus protein VP6 primes for an enhanced neutralizing antibody response." Arch Virol **145**(4): 813-25.
- Fagarasan, S. and T. Honjo (2004). "Regulation of IgA synthesis at mucosal surfaces." Curr Opin Immunol **16**(3): 277-83.
- Fenaux, M., M. A. Cuadras, et al. (2006). "Extraintestinal spread and replication of a homologous EC rotavirus strain and a heterologous rhesus rotavirus in BALB/c mice." J Virol **80**(11): 5219-32.
- Feng, N., M. A. Franco, et al. (1997). "Murine model of rotavirus infection." Adv Exp Med Biol **412**: 233-40.
- Fernandez-Sesma, A., S. Marukian, et al. (2006). "Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein." J Virol **80**(13): 6295-304.

- Fleeton, M., N. Contractor, et al. (2004). "Involvement of dendritic cell subsets in the induction of oral tolerance and immunity." Ann N Y Acad Sci **1029**: 60-5.
- Fleeton, M. N., N. Contractor, et al. (2004). "Peyer's patch dendritic cells process viral antigen from apoptotic epithelial cells in the intestine of reovirus-infected mice." J Exp Med **200**(2): 235-45.
- Flores-Langarica, A., S. Meza-Perez, et al. (2005). "Network of dendritic cells within the muscular layer of the mouse intestine." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(52): 19039-44.
- Franco, M. A., N. Feng, et al. (1996). "Rotavirus immunity in the mouse." Arch Virol Suppl **12**: 141-52.
- Franco, M. A. and H. B. Greenberg (1997). "Immunity to rotavirus in T cell deficient mice." Virology **238**(2): 169-79.
- Franco, M. A. and H. B. Greenberg (1999). "Immunity to rotavirus infection in mice." J Infect Dis **179 Suppl 3**: S466-9.
- Gabriele, L. and K. Ozato (2007). "The role of the interferon regulatory factor (IRF) family in dendritic cell development and function." Cytokine Growth Factor Rev **18**(5-6): 503-10.
- Gullberg, E. and J. D. Soderholm (2006). "Peyer's patches and M cells as potential sites of the inflammatory onset in Crohn's disease." Ann N Y Acad Sci **1072**: 218-32.
- Gutierrez, M., P. Isa, et al. (2010). "Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis." J Virol **84**(18): 9161-9.
- Hayday, A., E. Theodoridis, et al. (2001). "Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology." Nat Immunol **2**(11): 997-1003.
- Heath, W. R., G. T. Belz, et al. (2004). "Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens." Immunol Rev **199**: 9-26.
- Isa, P., M. Gutiérrez, et al. (2008). "Rotavirus cell entry." Future Virology **3**(2): 135-146.
- Istrate, C., I. Douagi, et al. (2007). "Bone marrow dendritic cells internalize live RF-81 bovine rotavirus and rotavirus-like particles (RF 2/6-GFP-VLP and RF 8\*2/6/7-VLP) but are only activated by live bovine rotavirus." Scand J Immunol **65**(6): 494-502.
- Iwasaki, A. (2007). "Mucosal dendritic cells." Annu Rev Immunol **25**: 381-418.
- Iwasaki, A. and B. L. Kelsall (1999). "Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells." J Exp Med **190**(2): 229-39.
- Iwasaki, A. and B. L. Kelsall (2000). "Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine." J Exp Med **191**(8): 1381-94.
- Iwasaki, A. and B. L. Kelsall (2001). "Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells." J Immunol **166**(8): 4884-90.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." Nat Immunol **5**(10): 987-95.
- Jaensson, E., H. Uronen-Hansson, et al. (2008). "Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans." J Exp Med **205**(9): 2139-49.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.
- Jetten, A. M. and J. H. Joo (2006). "Retinoid-related Orphan Receptors (RORs): Roles in Cellular Differentiation and Development." Adv Dev Biol **16**: 313-355.
- Johansson, C. and B. L. Kelsall (2005). "Phenotype and function of intestinal dendritic cells." Semin Immunol **17**(4): 284-94.

- Kanamori, Y., K. Ishimaru, et al. (1996). "Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit<sup>+</sup> IL-7R<sup>+</sup> Thy1<sup>+</sup> lympho-hemopoietic progenitors develop." J Exp Med **184**(4): 1449-59.
- Kawai, T. and S. Akira (2005). "Pathogen recognition with Toll-like receptors." Curr Opin Immunol **17**(4): 338-44.
- Kawai, T. and S. Akira (2005). "Toll-like receptor downstream signaling." Arthritis Res Ther **7**(1): 12-9.
- Kelsall, B. (2008). "Recent progress in understanding the phenotype and function of intestinal dendritic cells and macrophages." Mucosal Immunol **1**(6): 460-9.
- Kyd, J. M. and A. W. Cripps (2008). "Functional differences between M cells and enterocytes in sampling luminal antigens." Vaccine **26**(49): 6221-4.
- Litinskiy, M. B., B. Nardelli, et al. (2002). "DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL." Nat Immunol **3**(9): 822-9.
- Londei, M., J. R. Lamb, et al. (1984). "Epithelial cells expressing aberrant MHC class II determinants can present antigen to cloned human T cells." Nature **312**(5995): 639-41.
- Lopez-Guerrero, D. V., S. Meza-Perez, et al. (2010). "Rotavirus infection activates dendritic cells from Peyer's patches in adult mice." J Virol **84**(4): 1856-66.
- Lopez, S. and C. F. Arias (2004). "Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance." Trends Microbiol **12**(6): 271-8.
- Luci, C., A. Reynders, et al. (2009). "Influence of the transcription factor ROR $\gamma$  on the development of NKp46<sup>+</sup> cell populations in gut and skin." Nat Immunol **10**(1): 75-82.
- Lutz, M. B., N. Kukutsch, et al. (1999). "An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow." J Immunol Methods **223**(1): 77-92.
- Macpherson, A. J. and K. Smith (2006). "Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy." J Exp Med **203**(3): 497-500.
- Manz, M. G., D. Traver, et al. (2001). "Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors." Blood **97**(11): 3333-41.
- Matthijssens, J., J. Bilcke, et al. (2009). "Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity." Future Microbiol **4**: 1303-16.
- McNeal, M. M., M. N. Rae, et al. (1997). "Evidence that resolution of rotavirus infection in mice is due to both CD4 and CD8 cell-dependent activities." J Virol **71**(11): 8735-42.
- Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Nat Rev Immunol **1**(2): 135-45.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1999). "Innate immune induction of the adaptive immune response." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **64**: 429-35.
- Mesa, M. C., L. S. Rodriguez, et al. (2007). "Interaction of rotavirus with human peripheral blood mononuclear cells: Plasmacytoid dendritic cells play a role in stimulating memory rotavirus specific T cells in vitro." Virology.
- Milling, S., U. Yrlid, et al. (2010). "Subsets of migrating intestinal dendritic cells." Immunol Rev **234**(1): 259-67.
- Mishra, B. B., U. M. Gundra, et al. (2008). "Expression and distribution of Toll-like receptors 11-13 in the brain during murine neurocysticercosis." J Neuroinflammation **5**: 53.
- Mowat, A. M. (2003). "Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens." Nat Rev Immunol **3**(4): 331-41.
- Mushegian, A. and R. Medzhitov (2001). "Evolutionary perspective on innate immune recognition." J Cell Biol **155**(5): 705-10.

- Nagler-Anderson, C. (2001). "Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa." Nat Rev Immunol **1**(1): 59-67.
- Nagler-Anderson, C., C. Terhoust, et al. (2001). "Mucosal antigen presentation and the control of tolerance and immunity." Trends Immunol **22**(3): 120-2.
- Nakano, H., M. Yanagita, et al. (2001). "CD11c(+)B220(+)/Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **194**(8): 1171-8.
- Narvaez, C. F., J. Angel, et al. (2005). "Interaction of rotavirus with human myeloid dendritic cells." J Virol **79**(23): 14526-35.
- Neurath, M., S. Finotto, et al. (2002). "The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity." Nat Medicine **8**(6): 567-73.
- Niedergang, F., A. Didierlaurent, et al. (2004). "Dendritic cells: the host Achille's heel for mucosal pathogens?" Trends Microbiol **12**(2): 79-88.
- Niedergang, F. and J. P. Kraehenbuhl (2000). "Much ado about M cells." Trends Cell Biol **10**(4): 137-41.
- Niedergang, F. and M. N. Kweon (2005). "New trends in antigen uptake in the gut mucosa." Trends Microbiol **13**(10): 485-90.
- Niess, J. H. and H. C. Reinecker (2006). "Dendritic cells in the recognition of intestinal microbiota." Cell Microbiol **8**(4): 558-64.
- Nonaka, S., T. Naito, et al. (2005). "Intestinal gamma delta T cells develop in mice lacking thymus, all lymph nodes, Peyer's patches, and isolated lymphoid follicles." J Immunol **174**(4): 1906-12.
- Odyniec, A. N., D. C. Barral, et al. (2010). "Regulation of CD1 antigen-presenting complex stability." J Biol Chem **285**(16): 11937-47.
- Pasare, C. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity." Microbes Infect **6**(15): 1382-7.
- Patton, J. T. and E. Spencer (2000). "Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses." Virology **277**(2): 217-25.
- Perez-Vargas, J., P. Isa, et al. (2006). "Rotavirus vaccine: early introduction in Latin America-risks and benefits." Arch Med Res **37**(1): 1-10.
- Phita, M. P. (2007). Interferon: the 50th anniversary. Verlag, Berlin, Heidelberg, Springer.
- Platt, A. M. and A. M. Mowat (2008). "Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine." Immunol Lett **119**(1-2): 22-31.
- Pollara, G., A. Kwan, et al. (2005). "Dendritic cells in viral pathogenesis: protective or defective?" Int J Exp Pathol **86**(4): 187-204.
- Ramig, R. F. (2004). "Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection." J Virol **78**(19): 10213-20.
- Realpe, M., R. Espinosa, et al. (2010). "Rotaviruses require basolateral molecules for efficient infection of polarized MDCKII cells." Virus Res **147**(2): 231-41.
- Rescigno, M., G. Rotta, et al. (2001). "Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers." Immunobiology **204**(5): 572-81.
- Rodríguez-Pinto, D. (2005). "B cells as antigen presenting cells." Cellular Immunology **238**: 67-75.
- Rollo, E. E., K. P. Kumar, et al. (1999). "The epithelial cell response to rotavirus infection." J Immunol **163**(8): 4442-52.
- Ruedl, C., C. Rieser, et al. (1996). "Phenotypic and functional characterization of CD11c+ dendritic cell population in mouse Peyer's patches." Eur J Immunol **26**(8): 1801-6.
- Sakaguchi, T., S. Brand, et al. (2001). "Mucosal barrier and immune mediators." Curr Opin Gastroenterol **17**(6): 573-7.
- Salazar-Gonzalez, R. M., J. H. Niess, et al. (2006). "CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches." Immunity **24**(5): 623-32.

- Sanchez-San Martin, C., T. Lopez, et al. (2004). "Characterization of rotavirus cell entry." J Virol **78**(5): 2310-8.
- Sansom, D. M., C. N. Manzotti, et al. (2003). "What's the difference between CD80 and CD86?" Trends Immunol **24**(6): 314-9.
- Sato, A. and A. Iwasaki (2005). "Peyer's patch dendritic cells as regulators of mucosal adaptive immunity." Cell Mol Life Sci **62**(12): 1333-8.
- Schaffler, A. and J. Scholmerich (2010). "Innate immunity and adipose tissue biology." Trends Immunol.
- Schwartz-Cornil, I., Y. Benureau, et al. (2002). "Heterologous protection induced by the inner capsid proteins of rotavirus requires transcytosis of mucosal immunoglobulins." J Virol **76**(16): 8110-7.
- Segura, E., A. L. Albiston, et al. (2009). "Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(48): 20377-81.
- Shreedhar, V. K., B. L. Kelsall, et al. (2003). "Cholera toxin induces migration of dendritic cells from the subepithelial dome region to T- and B-cell areas of Peyer's patches." Infect Immun **71**(1): 504-9.
- Sierro, F., B. Dubois, et al. (2001). "Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13722-7.
- Stagg, A. J. and S. C. Knight (2001). Antigen Presenting Cells. Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons.
- Steinman, R. M. (2003). "The control of immunity and tolerance by dendritic cell." Pathol Biol (Paris) **51**(2): 59-60.
- Steinman, R. M., D. Hawiger, et al. (2003). "Tolerogenic dendritic cells." Annu Rev Immunol **21**: 685-711.
- Steinman, R. M. and H. Hemmi (2006). "Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity." Curr Top Microbiol Immunol **311**: 17-58.
- Sugita, M., E. P. Grant, et al. (1999). "Separate pathways for antigen presentation by CD1 molecules." Immunity **11**(6): 743-52.
- Sun, P., C. M. Celluzzi, et al. (2006). "CD40 ligand enhances dengue viral infection of dendritic cells: a possible mechanism for T cell-mediated immunopathology." J Immunol **177**(9): 6497-503.
- Suzuki, K., T. Oida, et al. (2000). "Gut cryptopatches: direct evidence of extrathymic anatomical sites for intestinal T lymphopoiesis." Immunity **13**(5): 691-702.
- Swanson, J. A. and A. D. Hoppe (2004). "The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis." J Leukoc Biol **76**(6): 1093-103.
- Taylor, P., T. Tamura, et al. (2006). "IRF family proteins and type I interferon induction in dendritic cells." Cell Res **16**(2): 134-40.
- Takeda, K. and S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." Int Immunol **17**(1): 1-14.
- Takeda, K., T. Kaisho, et al. (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-76.
- Tezuka, H. and T. Ohteki (2010). "Regulation of intestinal homeostasis by dendritic cells." Immunol Rev **234**(1): 247-58.
- Torres-Medina, A. (1984). "Effect of rotavirus and/or Escherichia coli infection on the aggregated lymphoid follicles in the small intestine of neonatal gnotobiotic calves." Am J Vet Res **45**(4): 652-60.
- Trombetta, E. S. and I. Mellman (2005). "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo." Annu Rev Immunol **23**: 975-1028.
- Underhill, D. M. (2003). "Toll-like receptors: networking for success." Eur J Immunol **33**(7): 1767-75.

- Vajdy, M. (2008). Immunity Against Mucosal Pathogens. Davis CA, Springer.
- van den Berg, T. K. and G. Kraal (2005). "A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction." Trends Immunol **26**(10): 506-9.
- van Lookeren Campagne, M., C. Wiesmann, et al. (2007). "Macrophage complement receptors and pathogen clearance." Cell Microbiol **9**(9): 2095-102.
- Vancott, J. L., M. M. McNeal, et al. (2003). "The role of interferons in rotavirus infections and protection." J Interferon Cytokine Res **23**(3): 163-70.
- Ward, R. L., M. M. McNeal, et al. (1990). "Development of an adult mouse model for studies on protection against rotavirus." J Virol **64**(10): 5070-5.
- Ward, R. L., M. M. McNeal, et al. (2008). "Why does the world need another rotavirus vaccine?" Ther Clin Risk Manag **4**(1): 49-63.
- Williams, I. R. (2006). "CCR6 and CCL20: partners in intestinal immunity and lymphorganogenesis." Ann N Y Acad Sci **1072**: 52-61.
- Wu, Y., W. Wu, et al. (2009). "Human gamma delta T cells: a lymphoid lineage cell capable of professional phagocytosis." J Immunol **183**(9): 5622-9.
- Wykes, M., A. Pombo, et al. (1998). "Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response." J Immunol **161**(3): 1313-9.
- Zehn, D., C. J. Cohen, et al. (2006). "Efficiency of peptide presentation by dendritic cells compared with other cell types: implications for cross-priming." Int Immunol **18**(12): 1647-54.
- Zhao, X., A. Sato, et al. (2003). "CCL9 is secreted by the follicle-associated epithelium and recruits dome region Peyer's patch CD11b+ dendritic cells." J Immunol **171**(6): 2797-803.

## 11. APÉNDICE.

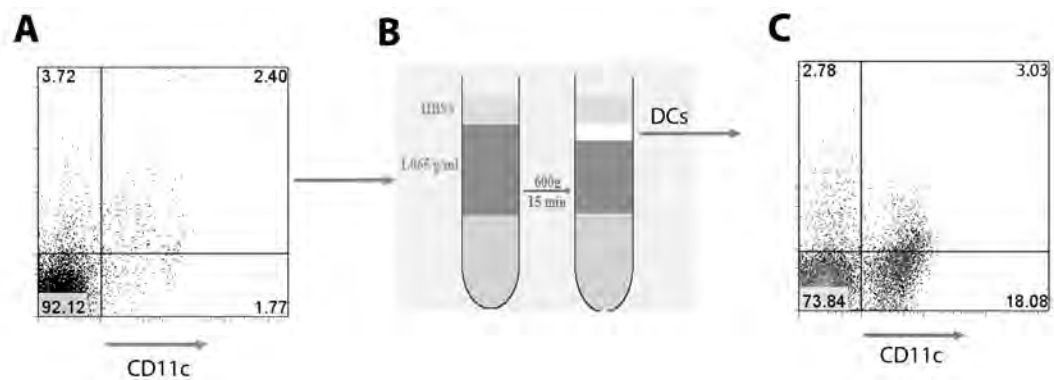
### 11.1 Resultados obtenidos a partir del gradiente de flotación utilizando el medio Optiprep™ para el enriquecimiento de las DCs de las PPs.

Debido al bajo porcentaje de la población de DCs en las PPs (4-5%), decidimos implementar un protocolo de enriquecimiento que nos permitiera analizar detalladamente dicha población. El protocolo seguido para el enriquecimiento de la población de las DCs de las PPs, fue un gradiente de flotación utilizando el medio OptiPrep, diseñado por Ruedl *et al.* en 1996 (Ruedl, Rieser *et al.* 1996) (Fig. 23B) para enriquecer la población de DCs de los órganos linfoides asociados a intestino. Mediante este protocolo logramos un enriquecimiento de 3 a 4 veces de nuestra población de DCs, ya que de un 4% (Fig. 23A) obtuvimos hasta un 20% de células CD11c<sup>+</sup> (Fig. 23C). Este enriquecimiento nos permitió la adquisición un mayor número de eventos positivos para la moléculas CD11c por citofluorometría, así como la implementación de dobles, triples y cuádruples tinciones con la finalidad de obtener un análisis más detallado. Así mismo, este enriquecimiento permitió la purificación de las DCs por el método de MACS, el cual se describe más adelante.

Cabe mencionar, que con este este protocolo de enriquecimiento se obtuvo un porcentaje de recuperación de alrededor del 99% de las células CD11c<sup>+</sup> presentes en las PPs, y de manera muy importante, los macrófagos fueron eliminados casi en su totalidad. Así mismo, se encontró que alrededor del 90% de las CD11c<sup>+</sup> expresan la molécula MHC II (dato no mostrado). Sin embargo, debido a que la expresión de la integrina CD11c no es exclusiva de la población de DCs, decidimos evaluar dentro de la población CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> (mayoritariamente DCs), la presencia de las moléculas CD11b y F4/80 ambos marcadores de poblaciones de monocitos y macrófagos. Encontramos que en la población CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup>, alrededor de un 15% de las células tienen niveles bajos para la molécula F4/80 y que un 50% posee el marcador CD11b, aunque también de baja



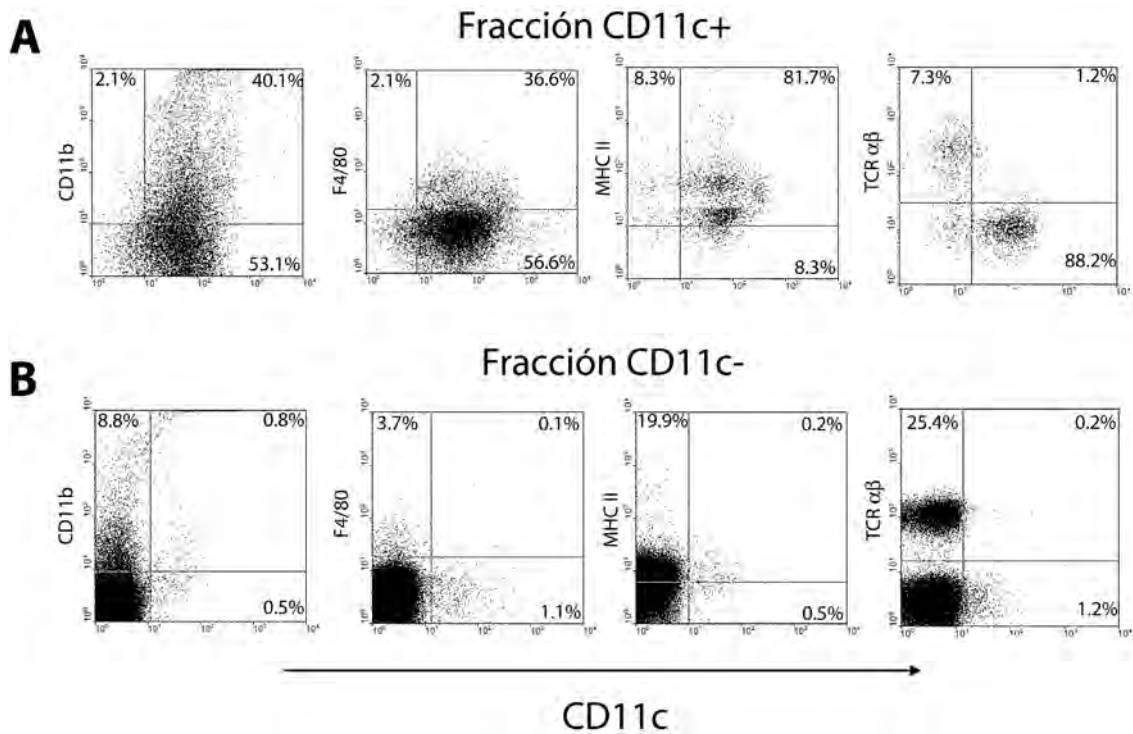
intensidad (dato no mostrado). Estos resultados nos indican que la población enriquecida mediante el gradiente de flotación de OptiPrep, posee las principales características fenotípicas de la población de DCs en el intestino, por lo que los resultados derivados de estas células corresponden a DCs intestinales de las PPs. Cabe mencionar, que las proporciones encontradas en cuanto a los marcadores fenotípicos anteriormente mencionados, no mostraron cambios en las DCs enriquecidas en los ratones infectados con respecto a las DCs provenientes de los ratones control.



**Figura 23. Gradiente de enriquecimiento de la población CD11c+ proveniente de las PP de la región del yeyuno.** Grupos de 4-5 ratones hembras BALB/c fueron infectados oralmente con  $10^4$ uff de rotavirus silvestre EDIM. A las 48 horas p.i las PPs fueron colectadas por región anatómica y las células totales se obtuvieron por disgregación mecánica y enzimática. Las DCs fueron enriquecidas mediante un gradiente de flotación utilizando el medio Optiprep. A) Porcentaje de células CD11c<sup>+</sup> en la población total de las PPs, B) Gradiente de enriquecimiento utilizando OptiPrep y C) Porcentaje de células CD11c<sup>+</sup> obtenidas a partir del gradiente de enriquecimiento. Figura representativa de al menos 5 experimentos independientes con resultados similares.

## **11.2 Caracterización de las DCs obtenidas de las PPs de la región del yeyuno mediante el método de MACS.**

Para analizar específicamente a la población de DCs, se realizó el gradiente de enriquecimiento por OptiPrep y posteriormente, las células enriquecidas fueron sometidas a una purificación por selección positiva por el método de MACS. Este método consiste en agregar un anticuerpo contra la molécula CD11c unido a perlas magnéticas y pasarlas a través de una columna acoplada a un magneto. Las células que se asociaron al anticuerpo quedarán adheridas a la columna, mientras que el resto pasaran a través de ella. Posteriormente se retira la columna del magneto y las células CD11c<sup>+</sup> son recuperadas. Mediante este protocolo de purificación se obtuvo alrededor del 90% de pureza, teniendo una contaminación mínima del 8% de células TCR<sup>+</sup> y alrededor del 2% de células positivas para CD11b y F4/80, consideradas como macrófagos principalmente (Fig. 24A). En la fracción negativa obtenida de esta purificación, se encontró solo el 1.2% de células residuales que expresan la molécula CD11c, por lo que la pérdida con respecto a la población total de DCs es mínima. Así mismo, se obtuvo un 25% de células TCR<sup>+</sup> y un 10% de células con fenotipo de macrófagos (Fig. 24B). Bajo este protocolo de purificación, se decidió evaluar, mediante técnicas de PCR la expresión de los genes para las diferentes citocinas en las DCs provenientes de las PPs.



**Figura 24. Rendimiento y caracterización de las células CD11c<sup>+</sup> purificadas positivamente utilizando el método de MACS.** Grupos de 4-5 ratones hembras BALB/c fueron infectados oralmente con  $10^4$ uff de rotavirus silvestre EDIM. A las 48 horas p.i las PPs del yeyuno fueron colectadas y las células totales se obtuvieron por disgregación mecánica y enzimática. Las células DCs fueron enriquecidas mediante un gradiente de flotación utilizando medio OptiPrep. Posteriormente, las células enriquecidas fueron sometidas a un protocolo de purificación positiva de las células CD11c<sup>+</sup> por el método de de MACS. Estas células fueron teñidas para CD11b, F4/80, MHC II, TCR αβ o utilizadas para extracción de ARNm total por el método de Trizol. Tanto la fracción positiva como la fracción negativa obtenidas mediante este protocolo de purificación fueron sometidas al análisis citofluorométrico y molecular. A) Fracción CD11c<sup>+</sup> teñida para los diferentes marcadores poblacionales, CD11b, F4/80, MHC II, TCR αβ. B) Fracción negativa CD11c<sup>-</sup> teñida para los mismos marcadores poblacionales. Figura representativa de al menos 5 experimentos independientes con resultados similares.

### 11.3 Publicaciones

a) Lopez-Guerrero, D. V., Meza-Perez S., Ramirez-Pliego O., Santanta-Calderon Maria A., Espino-Solis P., Xicotencatl-Gutierrez L., Flores-Romo L., Esquivel-Guadarrama F. (2010) "Rotavirus infection activates dendritic cells from Peyer's patches in adult mice." J Virol 84(4): 1856-66.

b) Lopez-Guerrero, D. V., S. Meza-Perez, Flores-Romo L., Esquivel-Guadarrama F. (2007). Análisis de la respuesta de las células dendríticas en las placas de Peyer de ratones infectados por rotavirus. Impacto de la Investigación Básica en la Clínica. Segunda Jornada de Investigación de la Facultad de Medicina, UAEM.p 18-23. Eds. M. Méndez, G. Rosas, V. Petricevich, F. Esquivel. Editorial: Universidad Autónoma del Estado de Morelos. P 24-30. ISBN- 968-878-278-5.

## Rotavirus Infection Activates Dendritic Cells from Peyer's Patches in Adult Mice<sup>∇†</sup>

Delia V. Lopez-Guerrero,<sup>1,2</sup> Selene Meza-Perez,<sup>5,6</sup> Oscar Ramirez-Pliego,<sup>3</sup> Maria A. Santana-Calderon,<sup>3</sup> Pavel Espino-Solis,<sup>2</sup> Lourdes Gutierrez-Xicotencatl,<sup>4</sup> Leopoldo Flores-Romo,<sup>5</sup> and Fernando R. Esquivel-Guadarrama<sup>1\*</sup>

*Facultad de Medicina, Universidad Autonoma del Estado de Morelos, 62210, Morelos, Mexico<sup>1</sup>; Instituto de Biotecnologia, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, 62210, Morelos, Mexico<sup>2</sup>; Facultad de Ciencias, Universidad Autonoma del Estado de Morelos, 62210, Morelos, Mexico<sup>3</sup>; Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Publica, 62211, Morelos, Mexico<sup>4</sup>; Departamento de Biologia Celular, CINVESTAV-IPN, 07360, Mexico D.F., Mexico<sup>5</sup>; and Departamento de Inmunologia, Escuela Nacional de Ciencias Biologicas-IPN, 11340, Mexico D.F., Mexico<sup>6</sup>*

Received 22 December 2008/Accepted 19 November 2009

**This study used an *in vivo* mouse model to analyze the response of dendritic cells (DCs) in Peyer's patches (PPs) within the first 48 h of infection with the wild-type murine rotavirus EDIM (EDIM<sub>w.t.</sub>). After the infection, the absolute number of DCs was increased by 2-fold in the PPs without a modification of their relative percentage of the total cell number. Also, the DCs from PPs of infected mice showed a time-dependent migration to the subepithelial dome (SED) and an increase of the surface activation markers CD40, CD80, and CD86. This response was more evident at 48 h postinfection (p.i.) and depended on viral replication, since DCs from PPs of mice inoculated with UV-treated virus did not show this phenotype. As a result of the activation, the DCs showed an increase in the expression of mRNA for the proinflammatory cytokines interleukin-12/23p40 (IL-12/23p40), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), and beta interferon (IFN- $\beta$ ), as well as for the regulatory cytokine IL-10. These results suggest that, a short time after rotavirus infection, the DCs from PPs play a critical role in controlling the infection and, at the same time, avoiding an excessive inflammatory immune response.**

Rotavirus (RV) is the most common cause of infectious diarrhea, killing almost 600,000 children globally each year, mainly in developing countries (35). RV belongs to the *Reoviridae* family and contains a genome composed of 11 segments of double-stranded RNA (dsRNA) that code for six structural (VP) and six nonstructural (NSP) proteins. RV tissue tropism *in vivo* is very specific, typically infecting only enterocytes on the tips of the intestinal villi of several animal species, including humans (26). However, RV infection also can induce antigenemia and viremia in blood and other tissues in humans and animal models (6, 7). The health impact of this viral disease has made the development of effective protective vaccines an international priority (36) that requires more knowledge regarding the *in vivo* immune responses against this virus.

Studies describing the immune mechanisms involved in protection against RV have been performed mainly in an established murine model of infection, using both homologous and heterologous viral strains. It has been shown that immunoglobulin A (IgA) participates in containing and clearing a primary infection and in the prevention of a secondary infection (10, 24). It also has been determined that cytotoxic T cells (Tc) are

important in terminating the infection through mechanisms independent of Fas, perforin, and gamma interferon (IFN- $\gamma$ ), and that helper T cells (Th) are important in inducing efficient T-cell and B-cell responses through the secretion of cytokines (17, 28).

The balance between tolerance and inflammatory responses in the intestinal mucosa seems to be determined by characteristics of the microorganism, such as its life cycle, target cells, and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), and the expression of pattern recognition receptors (PRRs), including Toll-like receptors (TLRs) that are of particular importance during viral infections (5, 19). These molecules are present mainly in cells of the innate immune response. Among them, DCs play a crucial role in the induction of the innate immune response and are the most efficient antigen-presenting cells (APCs), inducing acquired responses by T cells and B cells; therefore, DCs are considered the link between the innate immune response and the acquired immune response (19, 43). The intestinal DCs are found along the different lymphoid compartments associated with the intestinal mucosa, both in inductive sites such as PPs and the mesenteric lymph node (MLN), where they capture potentially pathogenic antigens and are crucial in the induction of an effective immune response (19, 21, 33), as well as in the lamina propria (LP), which is considered the mucosal effector site (19, 34).

PPs and the MLN have a high concentration of naive T cells and B cells that are subject to activation by antigen-loaded DCs. The luminal antigens are transported to the subepithelial dome (SED) of the PPs by specialized cells called M cells,

\* Corresponding author. Mailing address: CIQ, Laboratory-12, Universidad Autonoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210, Mexico. Phone: (52) (777) 3-29-70-00, ext. 3484. Fax: (52) (777) 3-29-70-48. E-mail: fernando.esquivel@uaem.mx.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jvi.asm.org/>.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 9 December 2009.

which are present in the follicle-associated epithelium (FAE) of the PPs (31, 32). At the SED, antigens are taken up by DCs, which subsequently acquire a mature phenotype characterized by the upregulation of CD40, CD80, and CD86 surface activation markers. These activation markers act as costimulatory molecules that are required for the efficient activation of T cells located in the interfollicular region. It has been suggested that DCs also activate B cells through a T-cell-independent mechanism (43). As a result of the stimulation by DCs in PPs and MLN, T and B cells express the intestinal homing receptor  $\alpha 4\beta 7$  on their surfaces, which enables them to interact with the mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) that is present in the LP (23).

The role of the innate immune response against RV has been studied using *in vitro* models of human, simian, and mouse cells. These studies have shown that RV can induce the activation of the immune cells along with the release of various cytokines (18, 30). Sestak et al. showed that macaque monocyte-derived DCs present RV antigens to lymphocytes (41). This finding indicates that DCs are involved not only in antigen trapping but also in the active antigen presentation of RV particles to T cells. Likewise, using cells derived from human monocytes, it was found that mature DCs (MDCs) and immature DCs (IDCs) are able to interact with RV. Moreover, the IDCs treated with RV induce a proinflammatory response by strongly stimulating naive allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells to secrete Th1 cytokines (30).

It has been discovered recently, using murine bone marrow DCs (bmDCs), that although infectious live virus and noninfectious virus-like particles (VLPs) are internalized by bmDCs and are able to induce the production of TNF- $\alpha$ , only infectious virus particles were able to induce the upregulation of the activation marker CD86 on these cells. It also was shown that diverse viral antigen elements (e.g., dsRNA) are capable of inducing the activation of bmDCs (18, 27).

*In vitro* studies of epithelial cells, fibroblasts, and bmDCs infected with RV suggest that this virus can evade the innate immune response by blocking the type I interferon (IFN) pathway (specially in epithelial cells and fibroblasts) (4, 13). This effect has been linked to the degradation of type I IFN transcription factors (IRFs) *via* their association with NSP1, a viral protein generated during viral replication. However, this mechanism has not been demonstrated *in vivo*.

Although *in vitro* studies of the interaction of DCs with RV have generated valuable information, it is important to analyze the role of intestinal DCs in the *in vivo* immune response against RV. In this study, we analyzed the activation status of DCs in the PPs of mice infected with the RV homologous murine strain EDIM<sub>wt</sub> during the first 48 h postinfection (p.i.). We found that, after infection, the DCs increased in absolute number and were mobilized to the SED of the PPs. This response correlated with an increase in the expression of the DC surface activation markers CD40, CD80, and CD86, as well as in the mRNA expression of IL-10, IFN- $\beta$ , IL-12/23p40, and TNF- $\alpha$  genes. Finally, it was found that the activation of the DCs was dependent on viral replication. These results show that shortly after RV infection, the DCs from PPs have a mixed immune response, which suggests that they play an important role in controlling the infection through the production of

antiviral cytokines and the priming of T cells and, at the same time, avoiding an excessive inflammatory immune response.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals.** Pathogen-free, 4- to 8-week-old adult female BALB/c mice (H-2<sup>d</sup>) were provided by the Biotechnology Institute (IBT, UNAM) and the National Institute for Public Health (INSP, SSA), Cuernavaca, Morelos, Mexico. Animals were housed under standard natural lighting conditions (12 h light/12 h dark) and were given food and water *ad libitum*. Previous RV infection was ruled out by the absence of RV-specific serum antibodies (Abs) as determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**Virus.** Murine RV EDIM<sub>wt</sub> (Mu/G3P10), kindly donated by Richard Ward (Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH), was grown *in vivo* in neonatal mice (3 to 5 days old) (50). Pups were orally infected, and the intestines were collected 72 h later to generate homogenates in TNC (10 mM Tris, 100 mM NaCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7.4). Aliquots of the homogenates were stored at -80°C until use. The 50 infectious dose (ID<sub>50</sub>) *in vivo* was determined using infected adult mice as previously described (9). Infectivity *in vitro* was determined in the MA-104 cell line (a rhesus monkey kidney cell line) by the immunoperoxidase focus assay described below.

**Virus inactivation.** Intestinal homogenates of RV EDIM<sub>wt</sub> were inactivated using UV short-wave treatment. Briefly, intestinal homogenates were suspended in phosphate-buffered saline (PBS) at a final virus concentration of 10<sup>4</sup> focus forming units (FFU)/100  $\mu$ l, and psoralen (Sigma) was added to a final concentration of 40  $\mu$ g/ml. The mixture was placed on ice and UV irradiated for 30 min at a distance of 10 cm from the source (Lamp, UVP Inc., San Gabriel, California). This treatment reduced the *in vitro* infectivity of the virus up to 95% as assessed by the immunoperoxidase focus assay.

**Titration of viral RV EDIM<sub>wt</sub> *in vitro* by immunoperoxidase focus assay.** The immunoperoxidase focus assay was performed by a modified version of a standard method described previously (2). Briefly, MA-104 cells were seeded into 96-well plates at a density allowing the monolayers to reach confluence for 2 to 3 days. The monolayers were incubated in serum-free medium for 16 to 18 h and inoculated with serial 10-fold dilutions of trypsin-activated virus (100  $\mu$ l/well). The viral inoculum was prepared by incubating virus stocks (intestinal homogenate) with 5  $\mu$ g/ml trypsin for 30 min at 37°C. The plates with the inoculum were incubated at 37°C for 1 h, with occasional rocking to allow virus adsorption. After being washed with PBS, the plates were incubated at 37°C for 1 h with a rabbit polyclonal hyperimmune antiserum against triple-layer particles (TLPs) of porcine RV YM (1:1,000) (kindly provided by Carlos Arias, IBT, UNAM, Mexico). Following incubation, the plates were washed twice with PBS and incubated at 37°C for 1 h with a goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) antibody (Ab) coupled to peroxidase (Santa Cruz) (1:2,500) using the peroxidase substrate 3-amino-9-ethylcarbazole (Sigma). Finally, cells with brown precipitate were counted under a light microscope Nikon Eclipse TE300 (Nikon Inc., Tokyo, Japan), and the number of FFU/ml was calculated.

**Mouse infection.** Groups of four animals of 4- to 8-week-old adult female BALB/c mice were inoculated orally with the murine RV EDIM<sub>wt</sub>. First, gastric acid was neutralized by administering 100  $\mu$ l of 1.3% sodium bicarbonate by proximal esophageal intubation. After 10 min, the mice were inoculated with 100  $\mu$ l of serum-free MEM containing 1  $\times$  10<sup>4</sup> FFU of the virus (100 times the ID<sub>50</sub>) or, as control, with 100  $\mu$ l of medium alone. Stool samples were collected daily up to day 3 or 8 p.i. and frozen at -20°C. The viral load in the stools was determined by plate ELISA, as described below.

**Detection of RV antigen in stools by ELISA.** Murine stool samples were incubated overnight at 4°C in dissociating buffer (TNC, 5% fetal calf serum (FSC), 0.05% Tween-20, 1.4 mM sodium azide), disaggregated by vortexing, and centrifuged at 13,000 rpm, and the supernatant was recovered. The viral load in the supernatant was evaluated by ELISA in a 96-well plate format (Costar high-binding) by coating with goat anti-RV hyperimmune serum (made in our laboratory) diluted 1:5,000 in PBS. Plates were incubated overnight at 4°C and blocked with 5% (wt/vol) Carnation nonfat milk in TNC at room temperature (RT) for 2 h. Supernatants were added to the wells and incubated for 2 h at 37°C. The plates were washed four times with the wash solution (TNC, 0.2% Tween 20), and rabbit anti-RV polyclonal hyperimmune serum (made in our laboratory) diluted 1:2,000 was added and incubated for 1 h at 37°C. After four washes, a goat anti-rabbit IgG Ab coupled to alkaline phosphatase (Zymed) was added and incubated for 1 h at 37°C. The substrate (*p*-nitrophenyl phosphate, disodium; Sigma) was added, and the plates were developed for 30 to 45 min at 37°C. The absorbance at 405 nm was read with a plate reader (Labsystem, Original Multiskan).

**Immunohistochemistry of PPs.** Groups of four adult female BALB/c mice were inoculated orally with  $10^4$  FFU of the murine RV EDIM<sub>wt</sub> or UV-inactivated RV EDIM<sub>wt</sub>. The animals were sacrificed by cervical dislocation at 0, 12, 24, or 48 h p.i. The small intestines were excised through an abdominal incision and washed with cold saline solution (150 mM NaCl). PPs were collected in petri dishes containing saline solution, and the tissues were embedded in Jung tissue freezing medium (Leica Microsystems, Nussloch, Germany), immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until use. Samples were cut into 6- $\mu\text{m}$  frozen sections using a Leica 1850CM cryostat (Nussloch, Germany) and fixed in cold acetone-chloroform (1:1) for 20 min. To block endogenous peroxidase activity, the sections were treated with 9%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in PBS for 1 h at RT and washed in PBS containing 0.1% bovine serum albumin (BSA). Before specific Ab staining, nonspecific binding was blocked with 2% rabbit serum in PBS for 1 h at RT. To detect DCs, 100  $\mu\text{l}$  of PBS containing 1  $\mu\text{g}$  of purified hamster anti-mouse CD11c monoclonal Ab (MAb) (clone N418; kindly provided by Lourival Possani, IBT, UNAM, Mexico) were added to the samples. After overnight incubation at  $4^\circ\text{C}$ , the samples were washed twice with PBS-0.5% BSA and incubated with goat anti-hamster IgG Ab coupled to peroxidase (eBioscience) (1:500) in the same buffer for 1 h at RT. After three washes, chromogen substrate (3-amino-9-ethylcarbazole; Sigma) was added, and the samples were developed for 10 min at RT. Samples were washed extensively with distilled water and counterstained with hematoxylin-eosin or 5% methyl green (Sigma) in methanol and rinsed with distilled water, and the slides were mounted in 60% glycerol PBS and analyzed under a light microscope (Eclipse TE300; Nikon Inc., Tokyo, Japan).

**Immunofluorescence of PPs.** Groups of four adult female BALB/c mice were inoculated orally with  $10^4$  FFU of murine RV EDIM<sub>wt</sub>. The animals were sacrificed by cervical dislocation at 0 and 48 h p.i., and PP samples were collected as described above. Before specific Ab staining, nonspecific binding was blocked with 2% human serum in PBS containing 0.5% BSA and 0.05% Triton X-100 (Affimatrix-USB) for 1 h at RT. To detect RV NSP5, 100  $\mu\text{l}$  of PBS-0.5% BSA-0.05% Triton X-100 containing 4  $\mu\text{l}$  of polyclonal rabbit anti-NSP5 (1:25) (kindly provided by Susana López, IBT, UNAM, Mexico) and 2  $\mu\text{l}$  of rat MAb anti-CD11c coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC) (BD Bioscience) (1:50) were added to each sample. After overnight incubation at  $4^\circ\text{C}$  with the Abs, the samples were washed three times with PBS-0.5% BSA-0.05% Triton X-100 and incubated with goat anti-rabbit IgG Ab coupled to Alexa 568 (Molecular Probes) (1:100) in the same buffer for 1 h at RT (protected from light). Samples were washed extensively with PBS-1% BSA-0.05% Triton X-100 and incubated for 10 min with 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) (Molecular Probes); afterward the slides were washed with PBS and mounted in 60% glycerol PBS. The samples were analyzed by epifluorescence microscopy (Zeiss Axiovert 200 M), and images were taken with an AxioCam MRM using Axiovision 3.1 software (Carl Zeiss, Inc.).

**Isolation of total cells from PPs.** PPs were removed from the small intestine and washed three times with saline physiologic solution. PPs were digested for 20 min at  $37^\circ\text{C}$  in Hank's medium containing 0.150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  collagenase VIII (Sigma), 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DNase (Sigma), 5% fetal bovine serum, and 5 mM EDTA using gentle agitation. PPs were mechanically dissociated through a metallic sieve (Sigma-Aldrich). The cellular suspension was centrifuged at 1,700 rpm for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ . The cell pellet then was resuspended in Hanks' balanced salt solution (without  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ ). Viable cells were counted in a Neubauer chamber by the trypan blue exclusion method.

**DCs enriched from PPs by flotation through a low-density gradient.** The cell suspension obtained after enzymatic digestion and mechanical disaggregation was loaded onto an OptiPrep (Axis-Shield, Oslo, Norway) gradient (1.077 to 1.080 g/ml) according to the manufacturer's recommendations (C-20 application sheet). The DC-enriched band was extracted by aspiration, analyzed by flow cytometry, and purified by positive selection as described below.

**Purification of DCs from PP.** The DC-enriched cell fraction obtained by the OptiPrep density gradient was used for DC purification by positive selection using magnetic-activated cell sorting (MACS). DC-enriched cells obtained by density gradient were suspended in PBS, 0.5% BSA, 2 mM EDTA (MACS buffer), and Fc receptors (FcgRIII/II) were blocked using 1  $\mu\text{g}$  of anti-mouse MAb CD16/CD32 (eBiosciences). DCs from PPs were purified by positive selection using anti-mouse CD11c-coated magnetic bead Ab (clone N418) (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) for 20 min at  $4^\circ\text{C}$ . The samples were rinsed and selected on MACS separation columns according to the manufacturer's recommendations. The purity was verified by flow cytometry using anti-mouse CD11c-allophycocyanin (CD11c-APC), TCR-FITC, CD11b-phycoerythrin (CD11b-PE), B220-FITC (BD Biosciences), biotinylated anti-F4/80 (Serotec) antibodies, and streptavidin coupled to Alexa 647 (Molecular Probes), obtaining an approximately 90% purity. The purified cells were used for conventional and real-time PCR cytokine analyses.

**Flow cytometry.** Cells were suspended in binding buffer (PBS, 0.5% BSA, 5 mM EDTA) and stained with the appropriate Ab. Before being stained, cells were incubated with Fc block anti-CD16/CD32 MAb for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ . Cells were stained with the following anti-mouse MABs purchased from BD Bioscience: CD11c-FITC (1:100), CD11c-APC (1:300), CD8-FITC (1:200), TCR-FITC (1:200), B220-FITC (1:300), biotinylated CD11c (1:100), biotinylated CD80 (1:200), CD11b-PE (1:100), and CD40-PE (1:100). Biotinylated CD40 (1:200), CD86-PE (1:200), and CD4-peridinin chlorophyll protein (PerCP) (1:300) were obtained from eBioscience. Biotinylated F4/80 (1:100) was provided by Serotec. Abs were added and incubated for 20 min at  $4^\circ\text{C}$ . Biotinylated Abs were detected using streptavidin-conjugated PerCP (1:400) (BD Biosciences) and streptavidin-conjugated Alexa 647 (1:800) (Molecular Probes). The MAB made in rat, anti-major histocompatibility complex class II (MHC-II) (NIM R4), was kindly donated by Vianney Ortiz (CINVESTAV, Mexico), and the MAB anti-CCR6 was kindly donated by Eduardo Garcia (IIB-UNAM, Mexico), and they were detected with goat anti-rat IgG coupled to FITC (1:100) (Zymed). Appropriate isotype controls were included in all experiments. The cellular suspensions were fixed with 2% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich). Cellular staining analysis was performed on a FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, California), acquiring 50,000 or 100,000 events for each experiment. Gating was done using FlowJo software (Tree Star, Inc.). Dead cells were discarded from analysis by propidium iodide staining (Invitrogen).

**Analysis of mRNA expression for different cytokines in enriched DCs from PPs.** Total RNA was isolated from  $2 \times 10^5$  purified DCs obtained from PPs after MACS purification. The RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen) by following the manufacturer's protocol. The integrity of the RNA was assessed by the visual analysis of 28S and 18S ribosomal RNAs after electrophoresis in a 1% agarose gel and staining with ethidium bromide. Subsequently, reverse transcriptions were performed from 500 ng of total RNA using the Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (MBI Fermentas) with oligo(dT) according to the manufacturer's protocol. The mRNA expression of IFN- $\beta$  and  $\beta$ -actin was assessed by conventional PCR using *Taq* DNA polymerase (MBI Fermentas) and  $10\times$  *Taq* buffer with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  using the primers 5'-CCACAGCCCTCTCCATCAAC and 3'-TCTCTGCTCGGACCACCATC for IFN- $\beta$  and 5'-ATGAGGTAGTCTGTGTCAGGT and 3'-ATGGATGACGATATCGCT for  $\beta$ -actin. The cDNA reaction mix was incubated in a MultiGene Gradient Thermal Cycler (Labnet) through initial denaturation at  $92^\circ\text{C}$  for 2 min, followed by 30 cycles of 1 min at  $92^\circ\text{C}$ , 1 min at  $62^\circ\text{C}$ , and 1 min at  $72^\circ\text{C}$ , and then a final extension at  $72^\circ\text{C}$  for 10 min. PCR products were analyzed on a 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized on a UV transilluminator (BioDoc-It Imaging System). The mRNAs for IL-12/23p40, TNF- $\alpha$ , and IL-10 were analyzed using real-time PCR. For this, the cDNA was diluted 1/10, and 2  $\mu\text{l}$  of the diluted sample was used for amplification in a 5700 Gene Amp (Applied Biosystems) with 15-min denaturation and 1-min annealing/extension cycles, and expression was normalized against the 18S rRNA gene. We used the PDAR designed reagents for the TaqMan amplification of the cytokines (Applied Biosystems). All of the primers have equivalent melting temperatures and give amplicons of 100 to 120 bp.

**Statistical analysis.** Statistical significance was evaluated using the t-Student's t-test in SPSS 17.0 software with a confidence interval of 99%.

## RESULTS

**The number of DCs in PPs of infected mice increases during RV infection.** We used an adult mouse model of RV infection to analyze the response of DCs from PPs. In this model, mice infected orally with the murine RV EDIM<sub>wt</sub> present a shedding kinetic that initiates on day 2 and terminates on day 8 (see Fig. 2D). During the course of this study, we analyzed the PP DCs from the jejunum and ileum, but as both intestinal regions gave similar results, only results of the experiments with PPs from jejunum are shown. We first determined whether the total DC number in PPs from RV-infected mice increased during the first 48 h p.i., since it is well known that PPs suffer hyperplasia and an increase in the total cell number as a result of this infection (8). Thus, PPs cells from infected and control mice were isolated at 0 (control, noninfected mice) and at 24 h and 48 h p.i., and the cells were counted using the trypan blue exclusion method. It was found that the total cell number of

PPs of infected mice showed a significant increase ( $P < 0.05$ ) compared to that of the noninfected control mice at both 24 and 48 h p.i. (see Fig. S1A in the supplemental material).

To analyze the percentage and absolute number of DCs and other cell populations, the total cells from PPs were analyzed by flow cytometry using MAbs specific for CD11c, CD4, CD8, CD11b, and B220. We found that, compared to noninfected mice, infected mice showed a significant increase ( $P < 0.05$ ) in the absolute number of PP DCs (2-fold at 48 h p.i.) (Fig. 1A), but with no significant difference in their percentage (approximately 4.5% in all cases; data not shown). The other cell populations analyzed did not show a significant change in the percentage after infection either, but CD4<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, and B220<sup>+</sup> cells had an increase in their absolute number at 48 h p.i. (see Fig. S1B and C in the supplemental material). It is important to point out that B220<sup>+</sup> cells are the predominant cell population of PPs (60%) and the one that showed the highest increment in their absolute number, as has been shown previously (8). These results suggest that after RV infection the PPs, among other cell populations, have an influx of DCs that contribute to the immune response.

To further characterize the phenotype of the CD11c<sup>+</sup> cells, total cells from PP at 0 and 48 h p.i. were costained with anti-CD11c, MHC-II, and F4/80 MAbs. The expression of MHC-II in CD11c cells is an important marker for DCs (46), but F4/80 is a marker of macrophages only when expressed at high levels (37, 47). Previous studies have reported the expression of F4/80 in CD11c cells from PPs and other lymphoid organs, but at low levels (38, 47). It was found that at 0 h, 87.65%  $\pm$  4.95% of CD11c<sup>+</sup> cells were MHC-II<sup>+</sup>, 14.5%  $\pm$  3.2% were F4/80<sup>low</sup>, and 20.7%  $\pm$  4.3% were MHC-II<sup>+</sup> F4/80<sup>low</sup>. On the other hand, at 48 h p.i., 88.49%  $\pm$  3.15% of CD11c<sup>+</sup> cells were MHC-II<sup>+</sup>, 16.5%  $\pm$  1.3% were F4/80<sup>low</sup>, and 22.5  $\pm$  2.4% were MHC-II<sup>+</sup> F4/80<sup>low</sup>. These results show that most of CD11c<sup>+</sup> cells analyzed in the total cell population from PPs exhibit a DCs phenotype and do not contain a significant number of cells with a macrophage phenotype (CD11c<sup>low</sup> F4/80<sup>high</sup>) (22, 37, 47).

**RV infection induces the mobilization of DCs to the SED of PPs.** We determined the effect of the RV infection on the distribution of PP DCs from the jejunum and ileum. Cryosections of PPs were obtained at 0, 12, 24, and 48 h p.i., and the DCs were detected by immunoperoxidase staining using a purified hamster anti-mouse CD11c MAb. The PP DCs from noninfected mice were distributed in the whole area of this lymphoid organ, including the SED and the interfollicular region (IFR). At 24 h p.i. the DCs initiated migration toward the SED, and at 48 h p.i. the majority of these cells were lined up in this region (Fig. 1B). This result shows that the RV infection induces a complete mobilization of DCs toward the SED within the first 48 h p.i.

To evaluate whether PP cells, and in particular CD11c<sup>+</sup> cells, can be infected by RV at early times after RV administration, PPs from jejunum of noninfected and mice infected for 48 h were removed and cryopreserved. Frozen sections of PPs were stained with FITC-conjugated anti-CD11c MAb and rabbit anti-RV NSP5 polyclonal hyperimmune serum (NSP5 is synthesized only during viral replication) and analyzed by epifluorescence microscopy. It was found that PPs presented less than 1% of cells expressing NSP5, with no evident colocaliza-

tion with CD11c<sup>+</sup> cells (see Fig. S2C and D in the supplemental material). In contrast, epithelial cells on the intestinal villi (adjacent to PP) showed a clear signal for NSP5 (see Fig. 2A and B in the supplemental material). This result indicates that at early times after RV inoculation, the infection takes place almost exclusively in epithelial cells located in the apex of the intestinal villi.

It has been shown that the mobilization of DCs toward the SED of the PPs is due to the secretion of chemokines such as CCL20 by the FAE overlaying the dome region (52), allowing the DCs expressing CCR6 to receive antigens through the M cells, to mature, and to initiate an immune response. To correlate the mobilization of the DCs to the SED of PPs from infected mice with the expression of CCR6, total cells from PPs of noninfected mice and mice infected for 48 h were costained with MAbs specific for CD11c and CCR6 and analyzed by flow cytometry. It was found that DCs from PPs of noninfected mice expressed constitutive levels of the CCR6 molecule, whereas DCs from infected mice showed a slight increase in the expression of this molecule (Fig. 1C).

To determine the degree to which the induction of the mobilization of DCs depends on viral replication, mice were inoculated with RV EDIM<sub>wt</sub> attenuated by UV treatment. The UV treatment was performed in the presence of psoralen, which preserves the antigenic characteristics of the external proteins. The infectivity of EDIM was totally abrogated in the MA-104 cell line; however, some viral load in the feces of the mice could be detected at 72 h p.i., followed by an abrupt increase that reached levels similar to those of the nontreated virus by the fourth day, and as in the nontreated virus, the viral load declined by day 6 and disappeared by day 8 (Fig. 2D). During the first 48 h p.i. with UV-treated RV, there was not an evident migration of CD11c<sup>+</sup> cells toward the dome of the PPs (Fig. 2A to C), in contrast to results for nontreated RV-infected mice (Fig. 1B). This result indicates that the inoculated viral particles are not sufficient to induce the efficient migration of DCs to the SED of PPs, since viral replication and the increase of viral antigen in the lumen, as well as epithelial cell damage, may be crucial for the efficient activation of DCs.

**Activation of DCs in PPs of infected mice.** We tested whether the mobilization of the DCs after RV infection correlated with the level of surface expression of CD40, CD80, and CD86 activation markers. To this end, at 0, 24, and 48 h p.i. cells from PPs were centrifuged through a low-density gradient (1.077 to 1.080 g/ml) of OptiPrep. This procedure enriches the DCs population (38) and eliminates most of the macrophages, since they require higher density for purification (22). The DC-enriched band was obtained, and cells were stained with anti-mouse CD11c, MHC-II, CD40, CD80, or CD86 MAb and analyzed by flow cytometry. The analysis of the activation markers was performed on cells in the CD11c<sup>+</sup> MHC<sup>+</sup> gate (Fig. 3A). The percentage of DCs obtained in the enriched population was from 12 to 17%, compared to approximately 4.5% of the total cell population. The number of DCs recovered after the gradient corresponded to almost 99% (for 0 and 24 h) and 87% (for 48 h) of the original absolute number of DCs. On the other hand, the mean fluorescent intensity (MFI) of the activation markers increased after 48 h p.i. on DCs (Fig. 3A and B). The increase of the markers correlated with the abrupt increase in the viral load present in the feces



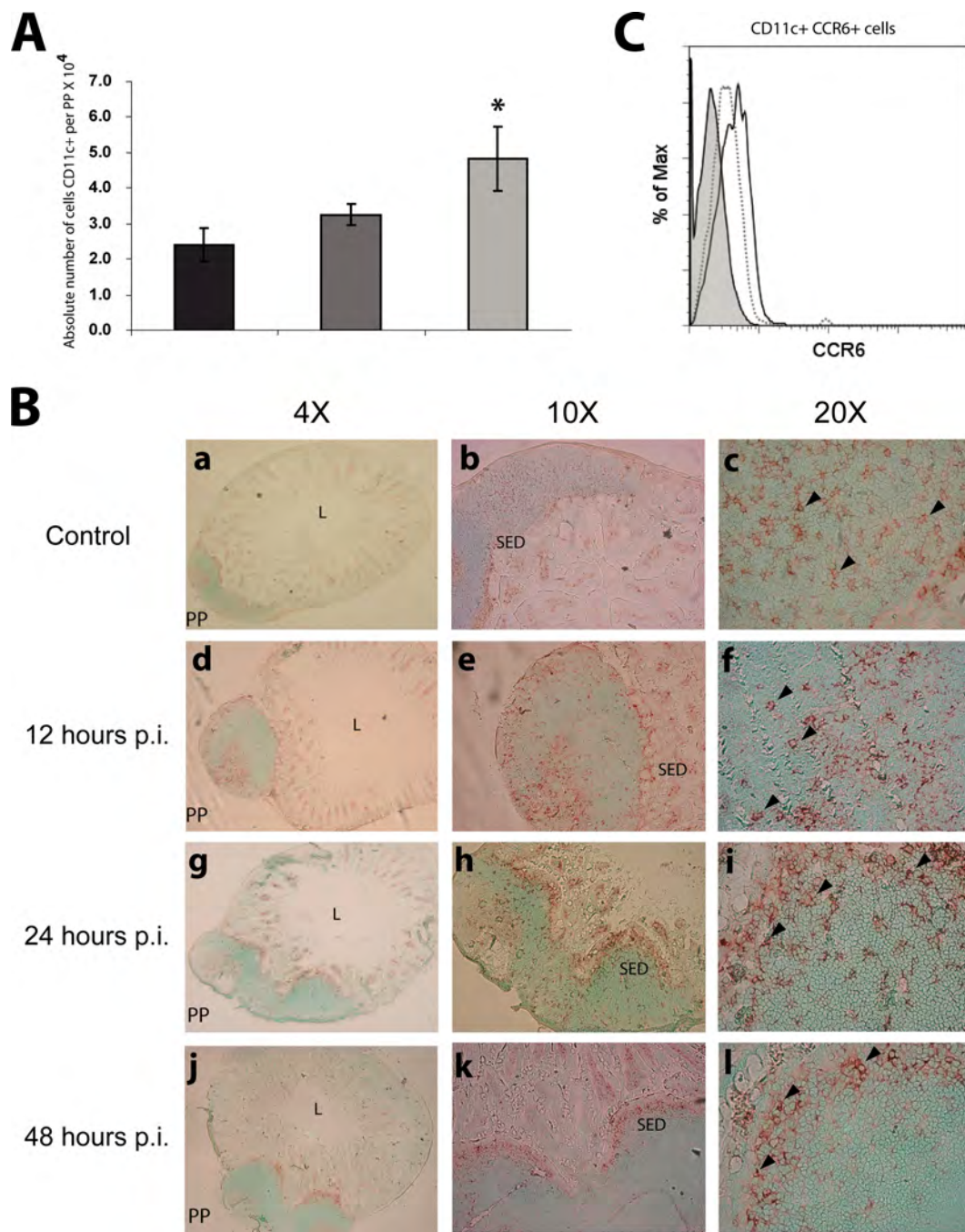


FIG. 1. After RV infection, DCs in PPs increase their absolute number and migrate to the SED. Groups of four mice were inoculated orally with  $10^4$  FFU of the murine RV EDIM<sub>wr</sub>. Total cells from PPs of the small intestine were obtained from RV EDIM<sub>wr</sub>-infected mice after 0 (control mice), 24 and 48 h p.i.; stained with rat anti-mouse CD11c and CCR6 MABs; and analyzed by flow cytometry. (A) The absolute number of DCs was calculated by multiplying the percentage of DCs by the total cell number per PP. Shown are cells from noninfected mice (black bars) and from RV-infected mice 24 (gray bars) and 48 h p.i. (light gray bars). Bars represent the standard deviations. An asterisk indicates significant difference with respect to the control ( $P < 0.05$ , Student's *t* test). (B) PP from jejunum were obtained from mice at 0, 12, 24, and 48 h p.i. and cryopreserved. The frozen sections of the PPs were stained with the MAB hamster anti-mouse CD11c (clone N418) and developed with a secondary goat anti-hamster IgG Ab coupled to peroxidase using 3-amino-9-ethylcarbazole chromogen substrate. (a, b, c) Histological analysis of CD11c<sup>+</sup> cells in PPs of noninfected mice. (d, e, f) CD11c<sup>+</sup> cells in PPs at 12 h p.i. (g, h, i) CD11c<sup>+</sup> cells in PPs at 24 h p.i. (j, k, l) CD11c<sup>+</sup> cells in PPs at 48 h p.i. Arrows indicate CD11c<sup>+</sup> cells. L, intestinal lumen; SED, subepithelial dome. The experiment has been repeated with similar results with at least 30 PPs of jejunum and ileum. (C) Histogram of CCR6 MFI of CD11c<sup>+</sup> cells from PPs. Isotype control (light gray histogram), cells from noninfected mice (dotted line), and cells from RV-infected mice at 48 h p.i. (solid line) are shown. The histogram is representative of three independent experiments.

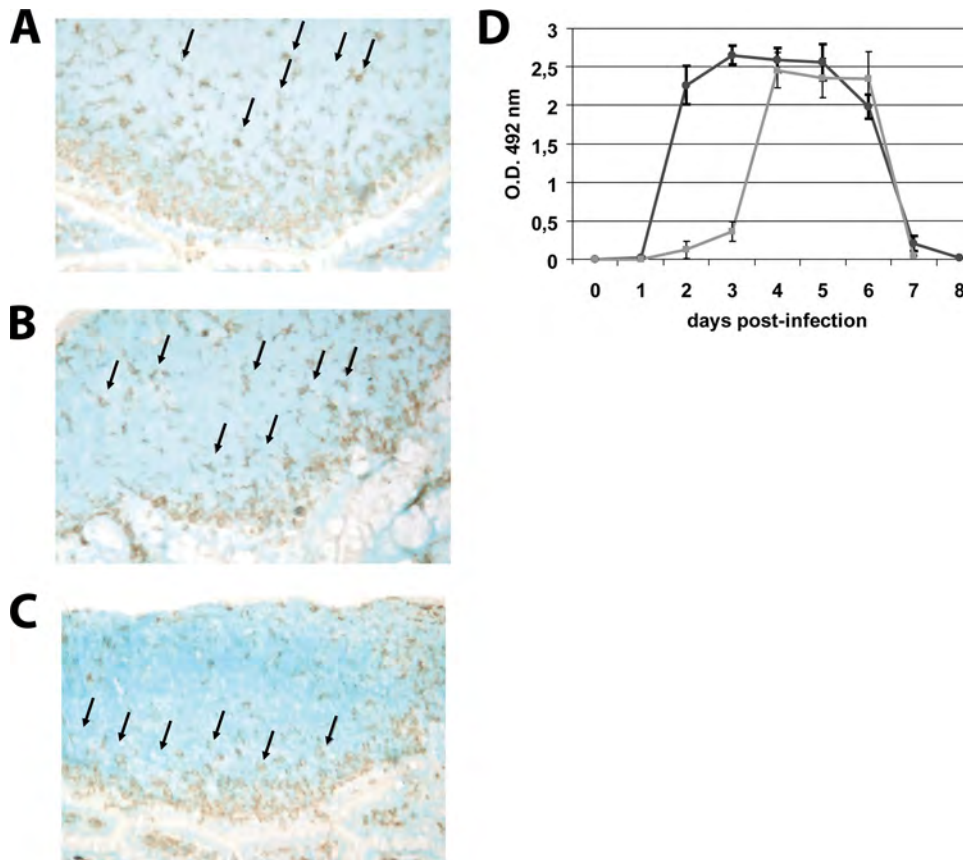


FIG. 2. UV-treated virus did not induce the migration of DCs to the SED of PPs. PP from jejunum of RV EDIM<sub>wt</sub>-infected mice or from mice inoculated with UV-treated virus were obtained and cryopreserved at 0 (control mice) and 48 h p.i. The frozen sections of the PPs were stained with a CD11c-specific hamster MAAb (clone N418) and developed with a secondary goat anti-hamster IgG Ab coupled to peroxidase using 3-amino-9-ethylcarbazole chromogen substrate. (A) Histological analysis of CD11c<sup>+</sup> cells in PPs of noninfected mice. (B) CD11c<sup>+</sup> cells in PPs at 48 h p.i. with UV-treated virus. (C) CD11c<sup>+</sup> cells in PPs at 48 h p.i. with infectious RV. Arrows indicate CD11c<sup>+</sup> cells. For panels A, B, and C a representative picture from 30 PPs is shown. (D) RV shedding curves. Groups of four mice were inoculated orally with 10<sup>4</sup> FFU of murine RV EDIM<sub>wt</sub> (dark gray line) or UV-treated RV EDIM<sub>wt</sub> (light gray line). Fecal rotavirus antigen was measured from day 0 to 8 by ELISA, and the results were expressed as the net optical density (O.D.) value. Bars represent the SD. The data shown are representative of three independent experiments.

(Fig. 2D), which suggests that the induction of the activation markers is dependent on viral replication. Accordingly, DCs from PPs from mice inoculated with UV-treated virus (see above) did not show a significant increase in the expression of the activation markers (Fig. 3C).

**RV infection induces an increment in the mRNA synthesis for proinflammatory and regulatory cytokines in DCs from PPs.** Intestinal DCs play a crucial role in initiating an immune response against incoming pathogens. Once they are activated, they secrete proinflammatory cytokines that can act to eliminate the pathogen directly or through the induction of an efficient adaptive immunity. As the DCs from PPs are activated and mobilized to the SED early in the course of the RV infection, we analyzed the level of mRNA for IFN- $\beta$ , IL-10, IL-12/23p40, and TNF- $\alpha$ . Mice were infected with RV, and PPs were removed and disaggregated at 0 and 48 h p.i. In some experiments, samples at 24 h p.i. were obtained. The cell suspension was submitted to density gradient enrichment for DCs using OptiPrep medium. The enriched fraction then was used for DC purification by positive selection using the MACS pro-

col, obtaining a 90 to 93% purity for CD11c<sup>+</sup> cells that were 89% MHC-II<sup>+</sup>, as assessed by flow cytometry (Fig. 4A). The residual cells were mainly T cells, with a marginal presence of CD11c<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> and CD11c<sup>-</sup> F4/80<sup>+</sup> cells (data not shown). Total RNA from CD11c<sup>+</sup> and CD11c<sup>-</sup> cells was obtained using TRIzol and used for cDNA synthesis with oligo(dT). The mRNA for the IFN- $\beta$  gene was analyzed by conventional PCR, and mRNA for IL-10, IL-12/23p40, and TNF- $\alpha$  was assessed by real-time PCR. It was found that at 48 h p.i., the DCs clearly express mRNA for IFN- $\beta$ . In contrast, DCs from the control and CD11c<sup>-</sup> cells from both RV-infected and noninfected mice had undetectable IFN- $\beta$  mRNA (Fig. 4B). On the other hand, a time-dependent increase of the mRNA for IL-10, IL-12/23p40, and TNF- $\alpha$  was observed between 24 and 48 h p.i. (Fig. 4C). At 48 h p.i. there was a 12- and 8-fold increase in the mRNA of the proinflammatory cytokines IL-12/23p40 and TNF- $\alpha$ , respectively, compared to levels for the noninfected control, and a 19-fold increment in the mRNA of the regulatory cytokine IL-10. The CD11c<sup>-</sup> cells from infected mice, assayed only at 0 and 48 h p.i., showed an increase of 2.5- and

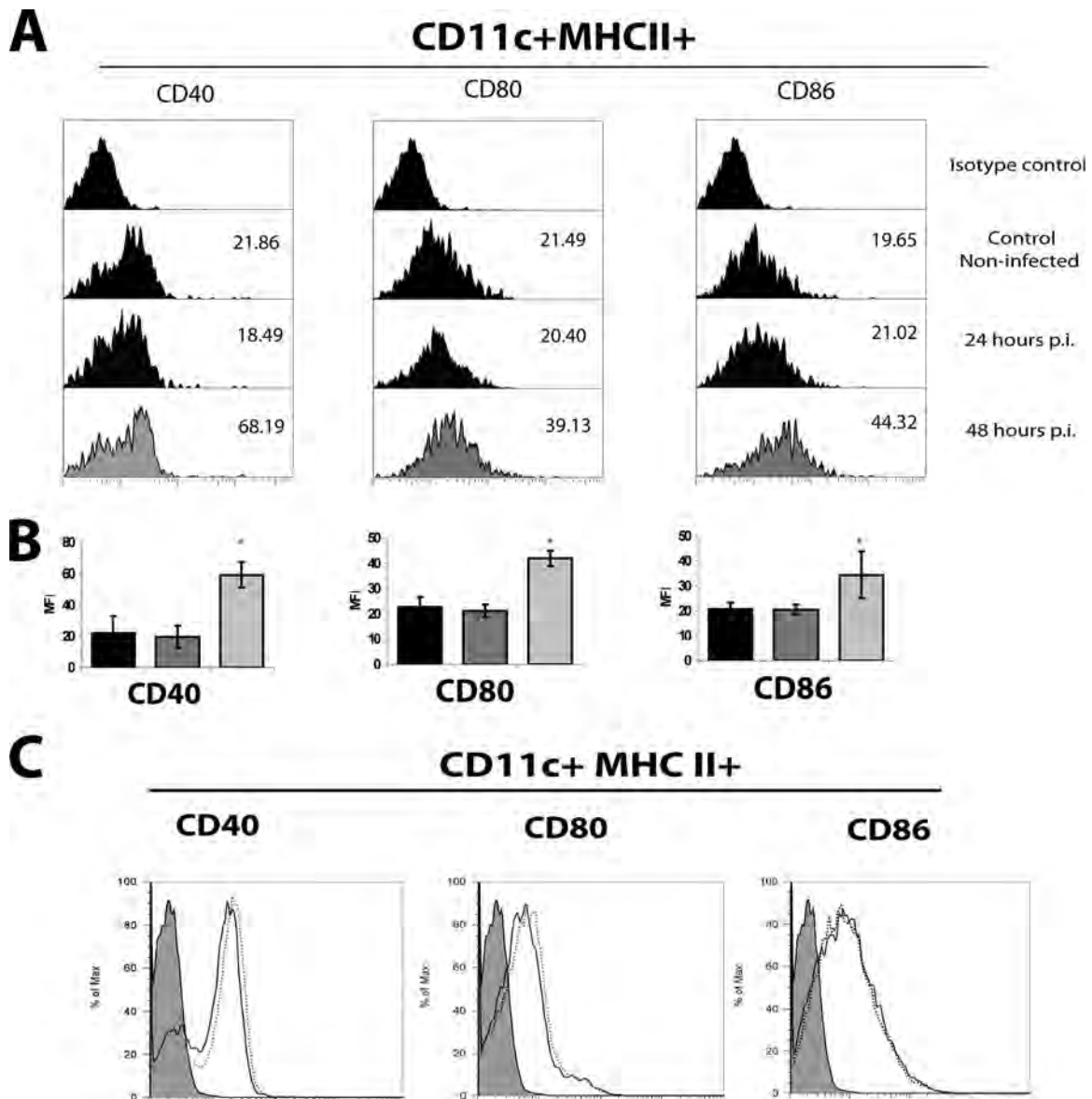


FIG. 3. RV infection induces the activation of DCs in PPs. Groups of five mice were inoculated orally with  $10^4$  FFU of murine RV EDIM<sub>wt</sub> or UV-treated RV. At 0 (control mice), 24, and 48 h p.i., the PPs from jejunum were obtained and dissociated. Total cells from PPs were DC enriched by centrifugation using OptiPrep medium. The DC-enriched fraction was stained for CD11c, MHC-II, CD40, CD80, and CD86 and analyzed by flow cytometry. (A) Histograms of the expression of CD40, CD80, and CD86 activation markers within the CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> gate in cells from noninfected and RV-infected mice. The data shown are representative of three independent experiments. (B) Summary of the data showed in panel A. MFI of cells from noninfected mice (black bars) and from RV-infected mice at 24 (gray bars) and 48 h p.i. (light gray bars) are shown. Isotype controls were used in each experiment. Bars represent the SD. The asterisk indicates significant difference with respect to the control ( $P < 0.05$ , Student's *t* test). (C) Histograms of the expression of CD40, CD80, and CD86 activation markers within the CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> gate in cells from noninfected and UV-treated RV-inoculated mice. Cells were from noninfected mice (dotted line) and mice infected 48 h p.i. (solid line). Gray histograms represent the isotype control. The data shown are representative of three independent experiments.

7-fold in the mRNA for TNF- $\alpha$  and IL-10, respectively, compared to levels for noninfected mice (Fig. 4D). No significant expression of IL-12/23p40 mRNA was detected in CD11c<sup>-</sup> cells from both infected and noninfected mice. It is clear from these results that the activation and mobilization of DCs to the SED of PPs from mice infected with RV correlates with the synthesis of both proinflammatory and regulatory cytokines produced by the DCs themselves and other cell types.

## DISCUSSION

RV infects and replicates in the enterocytes present on the tips of the small intestinal villi. The infection induces both intestinal B-cell and T-cell protective responses that have been widely described previously (15, 16). However, only a few studies have addressed the role of the innate immune response in this infection (13, 18, 29, 30, 48, 51). Since DCs play a crucial role in the induction of innate and adaptive anti-viral re-

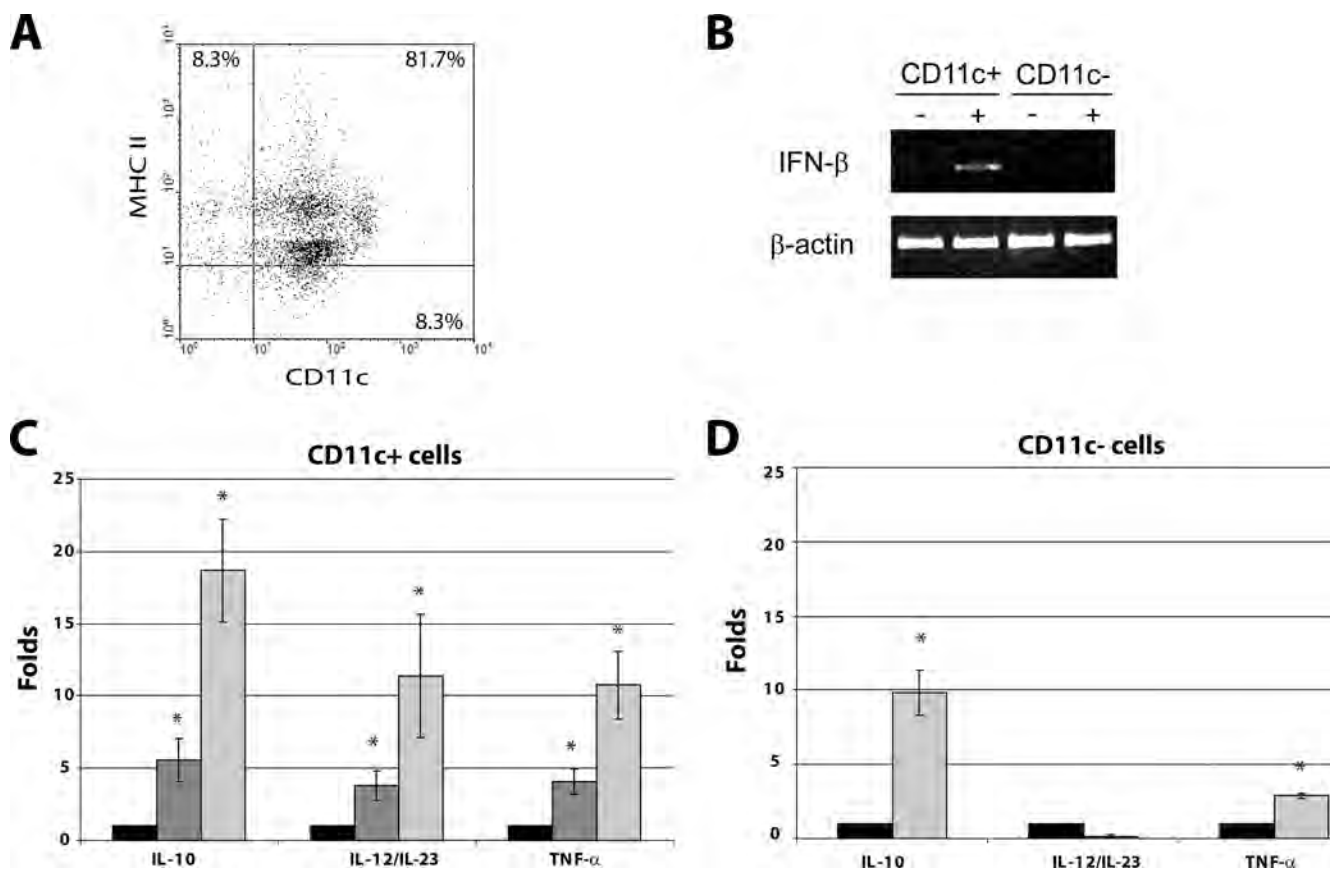


FIG. 4. RV infection induces the transcription of mRNA for different cytokines in DCs from PPs. Groups of five mice were inoculated orally with  $10^4$  FFU of the murine RV EDIM<sub>wt</sub>, and the PPs from jejunum were obtained at 0, 24, and 48 h p.i. Total cells from PPs were DC enriched by centrifugation using OptiPrep medium, and CD11c<sup>+</sup> cells were positively selected using MACS. (A) Dot plot of purified cells from noninfected mice were stained with anti-CD11c and MHC-II MABs and analyzed by flow cytometry. The data shown are representative of three different experiments. Similar results were obtained with cells from RV-infected mice. (B) mRNA from CD11c<sup>+</sup> and CD11c<sup>-</sup> cells from RV-infected mice at 48 h p.i. was amplified for the IFN- $\beta$  gene by conventional PCR using specific primers.  $\beta$ -Actin mRNA was used as a constitutive message. +, sample from RV-infected mice; -, sample from noninfected mice. Fold increases for IL-10, IL-12/23p40, and TNF- $\alpha$  mRNA in purified CD11c<sup>+</sup> (C) and CD11c<sup>-</sup> (D) cells of RV-infected mice compared to levels for noninfected mice, as measured by real-time PCR. mRNA for ribosomal 18S proteins was used to normalize the level of the different mRNA. Noninfected mice (black bars) and RV-infected mice at 24 h p.i. (gray bars) and 48 h p.i. (light gray bars) are shown. Bars represent the standard errors. An asterisk indicates significant difference with respect to control ( $P < 0.05$ , Student's *t* test).

sponses, this study analyzed the response of DCs from PPs of adult mice infected with a murine wild-type RV strain. We found that during the first 48 h p.i. the DCs from PPs of infected mice increase in number, migrate to the SED, and upregulate the CD40, CD80, and CD86 surface activation markers, and that this response correlates to viral replication. Also, an increase in the mRNA expression for proinflammatory (IFN- $\beta$ , IL-12/23p40, and TNF- $\alpha$ ) and antiinflammatory (IL-10) cytokine genes was observed.

At 48 h p.i., there was an evident hyperplasia in PPs from the jejunum and the ileum that correlated with a significant increase in the total cell number. Similar results were described by Blutt et al. for mice infected with the murine RV strain EC<sub>wt</sub> (8). They showed that although both T cells and B cells contributed to total cell number increment, the B-cell population was the predominant proliferating cell population, even in the absence of T cells (9). We also found that T cells and B cells, especially the latter, are responsible for the total cell number increase in PPs at 48 h p.i. (see Fig. S1 in the supple-

mental material). On the other hand, DCs also showed a significant increase in their absolute cell number without changes in the percentage of DCs at 24 and 48 h p.i. This suggests that early after infection, a significant influx of DCs from the circulation takes place in the intestinal PPs.

In recent work, Zhang et al. showed that the RV infection in neonatal gnotobiotic pigs induced the recruitment of monocytes/macrophages in the intestine (ileum) but not DCs, based on the cell percentage, which is in accordance with our results in PPs (51). Unfortunately, the absolute number in Zhang's study was not evaluated, so we cannot contrast this parameter with our work. However, it is very likely that at 5 days p.i. the pig's ileum suffers hypertrophy, as is seen in mice; therefore, the absolute number should be increased as well. Although there are important methodological differences between Zhang's work and ours (time of infection, analysis of cells from whole ileum versus PPs, etc.), it is likely that the recruitment of DCs in mice and pigs is similar.

By the immunohistochemical analysis of intestinal PPs we

found that, after RV infection, the DCs are redistributed toward the SED in a time-dependent manner, which is most evident at 48 h p.i. Redistribution in the SED has been reported previously for intestinal aggregated lymphoid follicles of calves infected with RV (45). The recruitment of DCs toward the SED would allow these cells to capture the RV antigen delivered by M cells from the intestinal lumen, inducing the activation of the distinct subpopulations of DCs. The mobilization of PP DCs also has been described in other murine antigen models. Oral cholera toxin has been reported to induce a very rapid mobilization of immature PP DCs toward the SED (1). It was suggested that this mobilization was induced by the production of CCL20 in the gut. It recently has been shown that CCL20 is produced by intestinal epithelial cells and attracts immature blood-derived DCs *in vitro* in response to *Salmonella enterica* serovar Typhi flagellin (42). The migration of DCs is mediated by the molecule CCL20 and its receptor CCR6, which is present mainly in the IFR DCs. In CCR6-deficient mice, the DCs are absent from the SED of PPs and have an increased number of T cells in the gut-associated lymphoid tissue. Additionally, it was found that there was a deficient intestinal IgA response as well as a delayed clearance of the virus in RV-challenged mice (12). Therefore, the migration of DCs to the SED is important for IgA induction and T-cell homeostasis in the mucosa of the small intestine. Accordingly, we found by flow cytometry that the total DCs from the PPs at 48 h p.i. showed a small but detectable increase of the CCR6 MFI. Taken together, these findings show that DC migration to the SED is important for both T-cell and B-cell responses in intestinal infections.

The efficient activation of T cells by DCs requires three main events: (i) the T-cell recognition of the processed antigen in the context of MHC, (ii) T cells binding to costimulatory molecules expressed by activated DCs (CD40, CD80, and CD86) through CD40L and CD28, and (iii) the secretion of cytokines by DCs (19). Analysis by the flow cytometry of CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> DCs cells from PPs at 24 and 48 h p.i. showed a time-dependent increase in the surface expression of the activation markers CD40, CD80, and CD86, correlating well with the observed redistribution of DCs toward the SED that occurs in the same time frame. These findings suggest that some of the DCs return to the T-cell-rich interfollicular regions for the presentation of the antigen to naive lymphocytes. While this study did not test the ability of DCs to present RV antigens to T cells, it has been demonstrated in mice infected with reovirus (14) and *S. enterica* serovar Typhimurium (39).

The mobilization and activation of PP DCs were dependent on viral replication, since DCs from PPs of mice inoculated with UV-treated virus did not show any of these responses during the first 48 h p.i., which correlates well with the failure to detect RV antigen in feces. This result indicates that the viral replication itself as well as the increase of viral load are necessary for the activation of DCs. Further experiments are necessary to dissect the contribution of both factors.

The analysis of purified PP DCs (90% CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup>) from infected mice showed an increase in mRNA expression for the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-12/23p40, and IFN- $\beta$ , as well as for the regulatory cytokine IL-10. The upregulation of mRNA for IFN- $\beta$  and IL-12/23p40 was found exclusively in the CD11c<sup>+</sup> cells, as the CD11c<sup>-</sup> cells did not

show any detectable increase in mRNA for these cytokines. This finding agrees with previous studies that have shown that DCs are the major producers of IL-12 and type I IFNs (11, 40). On the other hand, both CD11c<sup>+</sup> and CD11c<sup>-</sup> cells had an increase in mRNA for IL-10 and TNF- $\alpha$  after infection. However, levels were higher in the CD11c<sup>+</sup> cells than in CD11c<sup>-</sup> cells (19-fold versus 7-folds for IL-10 and 7-fold versus 2.5-fold for TNF- $\alpha$ , respectively). Thus, although we cannot discard that the residual cells (about 10%) present in the purified CD11c<sup>+</sup> cells contributed to the increment of mRNA observed, this contribution is presumed to be minimal.

The simultaneous upregulation of both types of cytokines could be explained by the response of a distinct subpopulation of DCs. Iwasaki and Kelsall reported that there are subpopulations of DCs with different immunological functions in the dome and the interfollicular areas of PPs (20). The dome-resident DCs that present the phenotype CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> produce low levels of IL-12p70 and high levels of IL-10 upon stimulation (19). In contrast, the interfollicular CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> DCs and the CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs present in both the dome and the interfollicular region produce mainly type I IFN and IL-12. Consequently, in RV infection, the dome-resident DCs may be the main source of IL-10 and the migrating DCs the source of TNF- $\alpha$ , IL-12/23p40, and IFN- $\beta$ . On the other hand, the possible role of the recently described plasmacytoid dendritic cells (pDC) of PPs should not be discarded (11), as they have been shown to secrete high levels of IL-12 and low levels of IFN- $\beta$ . Future experiments are necessary to dissect the DCs population responsible for the production of the different cytokines, although it is clear from the results of this study that the overall result of the activation of different populations of DCs from PPs is a proinflammatory response against the RV infection, but this is regulated by an antiinflammatory response. This guarantees an efficient immune protection response without major tissue damage. In any case, based on the DC phenotype reported here, we believe that the cells described are predominantly mDC-like.

Type I IFNs are the key cytokines produced after viral infection and mediate the induction of both the innate immune response and the subsequent development of adaptive immunity. Type I IFNs induce the maturation of DCs by increasing the expression of activation markers such as CD80, CD86, and CD40 and by facilitating the cross-presentation of viral antigens (25, 49). The expression of type I IFNs is transcriptionally regulated through the coordinated activation of transcription factors including IRF3 (expressed in most nucleated cells) and IRF7 (expressed constitutively in pDC) (44). The RV evasion of the innate immune response has been described *in vitro* in infection-permissive epithelial cell lines, fibroblastic cell lines, and DCs (3, 4, 13, 18). It was found that the NSP1 protein present in the cytosol of infected epithelial cells and fibroblasts efficiently blocked the synthesis of IFN- $\beta$  through the degradation of the IRF3 transcription factor; however, although the DCs were infected, they did not show IRF3 degradation and therefore were able to secrete IFN- $\beta$ . On the other hand, it has been demonstrated that NSP1 also can degrade IRF7 and reduce the production of IFN- $\alpha/\beta$  (13). In our *in vivo* model, we found that purified DCs from PPs at 48 h p.i. presented a clear upregulation of IFN- $\beta$  gene transcription, whereas no induction at all was observed in DCs from control mice. The

upregulation of IFN- $\beta$  was not a product of direct DC infection, since by cryomicroscopic studies we found that at 48 h after RV administration less than 1% of cells in PPs are infected (see Fig. S2C and D in the supplemental material). Thus, *in vivo*, the degradation of IRF3 and IRF7 by NSP1, and therefore the reduction of type I IFN production, may work mainly in the epithelial cells.

The *in vivo* data presented here showed that after RV infection, the DCs of PPs are activated and therefore may play a role in the early mucosal immune response against this infection. First by contributing to the innate antiviral response and later by coordinating the subsequent T-cell and B-cell responses, which are crucial to contain and terminate the infection. Further studies are required to determine the role of DC subsets from the LP and the MLN in this infection to obtain a more complete panorama of the mucosal immune response.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Elizabeth Mata, Instituto de Biotecnología, UNAM, and Fernando Romero and Alberto Alsavez, Instituto Nacional de Salud Pública, SSA, for the excellent animal house conditions, Juana Calderon Amador for technical assistance, Susana Lopez and Carlos Arias for kindly providing us with several reagents, and Ernesto Mendez, Eduardo Garcia, and Vianney Ortiz for critical comments.

This work was supported by grants from SEP-CONACYT (2003-C02-42482-Q and 80149) and PROMEP-PIFI (UAEMOR-CA-26), Mexico. D.L.-G. was supported by CONACYT scholarship no. 102187.

We have no competing financial interests.

#### REFERENCES

- Anjuère, F., C. Luci, M. Lebens, D. Rousseau, C. Hervouet, G. Milon, J. Holmgren, C. Ardavin, and C. Czerkinsky. 2004. In vivo adjuvant-induced mobilization and maturation of gut dendritic cells after oral administration of cholera toxin. *J. Immunol.* **173**:5103–5111.
- Arias, C. F., M. Lizano, and S. Lopez. 1987. Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *J. Gen. Virol.* **68**:633–642.
- Barro, M., and J. T. Patton. 2005. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:4114–4119.
- Barro, M., and J. T. Patton. 2007. Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7. *J. Virol.* **81**:4473–4481.
- Berberich, C., J. R. Ramirez-Pineda, C. Hambrecht, G. Alber, Y. A. Skeiky, and H. Moll. 2003. Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens. *J. Immunol.* **170**:3171–3179.
- Blutt, S. E., C. D. Kirkwood, V. Parreno, K. L. Warfield, M. Ciarlet, M. K. Estes, K. Bok, R. F. Bishop, and M. E. Conner. 2003. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? *Lancet* **362**:1445–1449.
- Blutt, S. E., D. O. Matson, S. E. Crawford, M. A. Staat, P. Azimi, B. L. Bennett, P. A. Piedra, and M. E. Conner. 2007. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *PLoS Med.* **4**:e121.
- Blutt, S. E., K. L. Warfield, D. E. Lewis, and M. E. Conner. 2002. Early response to rotavirus infection involves massive B cell activation. *J. Immunol.* **168**:5716–5721.
- Burns, J. W., A. A. Krishnaney, P. T. Vo, R. V. Rouse, L. J. Anderson, and H. B. Greenberg. 1995. Analyses of homologous rotavirus infection in the mouse model. *Virology* **207**:143–153.
- Burns, J. W., M. Siadat-Pajouh, A. A. Krishnaney, and H. B. Greenberg. 1996. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science* **272**:104–107.
- Contractor, N., J. Louten, L. Kim, C. A. Biron, and B. L. Kelsall. 2007. Cutting edge: Peyer's patch plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce low levels of type I interferons: possible role for IL-10, TGF $\beta$ , and prostaglandin E2 in conditioning a unique mucosal pDC phenotype. *J. Immunol.* **179**:2690–2694.
- Cook, D. N., D. M. Prosser, R. Forster, J. Zhang, N. A. Kuklin, S. J. Abbondanzo, X. D. Niu, S. C. Chen, D. J. Manfra, M. T. Wiekowski, L. M. Sullivan, S. R. Smith, H. B. Greenberg, S. K. Narula, M. Lipp, and S. A. Lira. 2000. CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity* **12**:495–503.
- Douagi, I., G. M. McInerney, A. S. Hidmark, V. Miriallis, K. Johansen, L. Svensson, and G. B. Karlsson Hedestam. 2007. Role of interferon regulatory factor 3 in type I interferon responses in rotavirus-infected dendritic cells and fibroblasts. *J. Virol.* **81**:2758–2768.
- Fleaton, M. N., N. Contractor, F. Leon, J. D. Wetzel, T. S. Dermody, and B. L. Kelsall. 2004. Peyer's patch dendritic cells process viral antigen from apoptotic epithelial cells in the intestine of reovirus-infected mice. *J. Exp. Med.* **200**:235–245.
- Franco, M. A., N. Feng, and H. B. Greenberg. 1996. Rotavirus immunity in the mouse. *Arch. Virol. Suppl.* **12**:141–152.
- Franco, M. A., and H. B. Greenberg. 1999. Immunity to rotavirus infection in mice. *J. Infect. Dis.* **179**(Suppl. 3):S466–S469.
- Franco, M. A., C. Tin, L. S. Rott, J. L. VanCott, J. R. McGhee, and H. B. Greenberg. 1997. Evidence for CD8+ T cell immunity to murine rotavirus in the absence of perforin, fas, and gamma interferon. *J. Virol.* **71**:479–486.
- Istrate, C., I. Douagi, A. Charplienne, G. M. McInerney, A. Hidmark, K. Johansen, M. Larsson, K. E. Magnusson, D. Poncet, L. Svensson, and J. Hinkula. 2007. Bone marrow dendritic cells internalize live RF-81 bovine rotavirus and rotavirus-like particles (RF 2/6-GFP-VLP and RF 8\*2/6/7-VLP) but are only activated by live bovine rotavirus. *Scand. J. Immunol.* **65**:494–502.
- Iwasaki, A. 2007. Mucosal dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **25**:381–418.
- Iwasaki, A., and B. L. Kelsall. 2001. Unique functions of CD11b+, CD8 $\alpha$ +, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J. Immunol.* **166**:4884–4890.
- Johansson, C., and B. L. Kelsall. 2005. Phenotype and function of intestinal dendritic cells. *Semin. Immunol.* **17**:284–294.
- Krüger, T., D. Benke, F. Eitner, A. Lang, M. Wirtz, E. E. Hamilton-Williams, D. Engel, B. Giese, G. Muller-Newen, J. Floege, and C. Kurts. 2004. Identification and functional characterization of dendritic cells in the healthy murine kidney and in experimental glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**:613–621.
- Kuklin, N. A., L. Rott, J. Darling, J. J. Campbell, M. Franco, N. Feng, W. Muller, N. Wagner, J. Altman, E. C. Butcher, and H. B. Greenberg. 2000. Alpha(4)beta(7) independent pathway for CD8(+) T cell-mediated intestinal immunity to rotavirus. *J. Clin. Investig.* **106**:1541–1552.
- Kushnir, N., N. A. Bos, A. W. Zuercher, S. E. Coffin, C. A. Moser, P. A. Offit, and J. J. Cebara. 2001. B2 but not B1 cells can contribute to CD4+ T-cell-mediated clearance of rotavirus in SCID mice. *J. Virol.* **75**:5482–5490.
- Lien, E., and D. T. Golenbock. 2003. Adjuvants and their signaling pathways: beyond TLRs. *Nat. Immunol.* **4**:1162–1164.
- López, S., and C. F. Arias. 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* **12**:271–278.
- Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, and T. Seya. 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* **171**:3154–3162.
- McNeal, M. M., M. N. Rae, and R. L. Ward. 1997. Evidence that resolution of rotavirus infection in mice is due to both CD4 and CD8 cell-dependent activities. *J. Virol.* **71**:8735–8742.
- Mesa, M. C., L. S. Rodriguez, M. A. Franco, and J. Angel. 2007. Interaction of rotavirus with human peripheral blood mononuclear cells: plasmacytoid dendritic cells play a role in stimulating memory rotavirus specific T cells in vitro. *Virology* **366**:174–184.
- Narváez, C. F., J. Angel, and M. A. Franco. 2005. Interaction of rotavirus with human myeloid dendritic cells. *J. Virol.* **79**:14526–14535.
- Niedergang, F., and J. P. Kraehenbuhl. 2000. Much ado about M cells. *Trends Cell Biol.* **10**:137–141.
- Niedergang, F., and M. N. Kwon. 2005. New trends in antigen uptake in the gut mucosa. *Trends Microbiol.* **13**:485–490.
- Niess, J. H., and H. C. Reinecker. 2006. Dendritic cells in the recognition of intestinal microbiota. *Cell Microbiol.* **8**:558–564.
- Niess, J. H., and H. C. Reinecker. 2005. Lamina propria dendritic cells in the physiology and pathology of the gastrointestinal tract. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **21**:687–691.
- Parashar, U. D., C. J. Gibson, J. S. Bresse, and R. I. Glass. 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:304–306.
- Pérez-Vargas, J., P. Isa, S. Lopez, and C. F. Arias. 2006. Rotavirus vaccine: early introduction in Latin America—risks and benefits. *Arch. Med. Res.* **37**:1–10.
- Platt, A. M., and A. M. Mowat. 2008. Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine. *Immunol. Lett.* **119**:22–31.
- Ruedl, C., C. Rieser, G. Bock, G. Wick, and H. Wolf. 1996. Phenotypic and functional characterization of CD11c+ dendritic cell population in mouse Peyer's patches. *Eur. J. Immunol.* **26**:1801–1806.
- Salazar-Gonzalez, R. M., J. H. Niess, D. J. Zammit, R. Ravindran, A. Srinivasan, J. R. Maxwell, T. Stoklasek, R. Yadav, I. R. Williams, X. Gu, B. A. McCormick, M. A. Pazos, A. T. Vella, L. Lefrancois, H. C. Reinecker, and S. J. McSorley. 2006. CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches. *Immunity* **24**:623–632.
- Sato, A., and A. Iwasaki. 2005. Peyer's patch dendritic cells as regulators of mucosal adaptive immunity. *Cell Mol. Life Sci.* **62**:1333–1338.
- Sestak, K., M. M. McNeal, A. Choi, M. J. Cole, G. Ramesh, X. Alvarez, P. P.

- Aye, R. P. Bohm, M. Mohamadzadeh, and R. L. Ward. 2004. Defining T-cell-mediated immune responses in rotavirus-infected juvenile rhesus macaques. *J. Virol.* **78**:10258–10264.
42. Sierro, F., B. Dubois, A. Coste, D. Kaiserlian, J. P. Kraehenbuhl, and J. C. Sirard. 2001. Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:13722–13727.
43. Steinman, R. M., and H. Hemmi. 2006. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **311**:17–58.
44. Tailor, P., T. Tamura, and K. Ozato. 2006. IRF family proteins and type I interferon induction in dendritic cells. *Cell Res.* **16**:134–140.
45. Torres-Medina, A. 1984. Effect of rotavirus and/or *Escherichia coli* infection on the aggregated lymphoid follicles in the small intestine of neonatal gnotobiotic calves. *Am. J. Vet. Res.* **45**:652–660.
46. Trombetta, E. S., and I. Mellman. 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* **23**:975–1028.
47. van den Berg, T. K., and G. Kraal. 2005. A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction. *Trends Immunol.* **26**:506–509.
48. Vancott, J. L., M. M. McNeal, A. H. Choi, and R. L. Ward. 2003. The role of interferons in rotavirus infections and protection. *J. Interferon Cytokine Res.* **23**:163–170.
49. Wallet, M. A., P. Sen, and R. Tisch. 2005. Immunoregulation of dendritic cells. *Clin. Med. Res.* **3**:166–175.
50. Ward, R. L., M. M. McNeal, and J. F. Sheridan. 1990. Development of an adult mouse model for studies on protection against rotavirus. *J. Virol.* **64**:5070–5075.
51. Zhang, W., K. Wen, M. S. Azevedo, A. Gonzalez, L. J. Saif, G. Li, A. E. Yousef, and L. Yuan. 2008. Lactic acid bacterial colonization and human rotavirus infection influence distribution and frequencies of monocytes/macrophages and dendritic cells in neonatal gnotobiotic pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **121**:222–231.
52. Zhao, X., A. Sato, C. S. Dela Cruz, M. Linehan, A. Luegering, T. Kucharzik, A. K. Shirakawa, G. Marquez, J. M. Farber, I. Williams, and A. Iwasaki. 2003. CCL9 is secreted by the follicle-associated epithelium and recruits dome region Peyer's patch CD11b+ dendritic cells. *J. Immunol.* **171**:2797–2803.

## **ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LAS PLACAS DE PEYER DE RATONES INFECTADOS POR ROTAVIRUS.**

Delia V. López Guerrero DV<sup>1,2</sup>, Selene Meza Pérez<sup>3</sup>, Leopoldo Flores Romo<sup>3</sup>, Fernando R. Esquivel Guadarrama<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Facultad de Medicina-UAEM; <sup>2</sup>IBT-UNAM, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor.; <sup>3</sup>CINVESTAV-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508 Col. San Pedro Zacatenco, México D.F. [vannylpz@ibt.unam.mx](mailto:vannylpz@ibt.unam.mx)  
[fernando.esquivel@uaem.mx](mailto:fernando.esquivel@uaem.mx).

**Cuerpo Académico: Regulación de la respuesta inmune en infección y autoinmunidad**

### **RESUMEN**

Rotavirus infecta exclusivamente a los enterocitos de las puntas de las vellosidades intestinales, provocando en niños menores de 5 años una diarrea aguda potencialmente mortal. Así, esta infección representa un excelente modelo para estudiar la respuesta inmune intestinal. En el presente estudio, analizamos algunos aspectos de la respuesta de las células dendríticas (CD) a tiempos tempranos de una infección por rotavirus, en un modelo de ratón. Mediante cortes histológicos de intestino de ratones infectados, determinamos que durante las primeras 48h post-infección (p.i.) las CD residentes de las placas de Peyer (PP) se movilizan y concentran en el domo subepitelial. Al analizar la expresión de moléculas co-estimuladoras, se encontró una disminución en el porcentaje de CD que expresan la molécula CD40, sin embargo, para la molécula CD86 no hubo cambios evidentes sobre estas células. Finalmente, se demostró que estos eventos son inducidos solamente cuando existe replicación viral.

### **INTRODUCCION**

El sistema inmune de la mucosa intestinal se encuentra en constante contacto con el medio ambiente, por esta razón, es un portal de entrada para organismos potencialmente patógenos. El ganglio linfático mesentérico (GLM) y las PP son órganos linfoides encargados de mantener el balance entre la tolerancia e inmunidad hacia los antígenos en el intestino. Las PP funcionan como sitios de evaluación de antígenos potencialmente patógenos y por esta razón poseen células dendríticas (CD) encargadas de dirigir el tipo de respuesta, ya sea de activación o de tolerancia hacia un antígeno determinado.

### **Células Dendríticas en las PP**

Las CD son las principales encargadas de regular la respuesta a antígenos orales (10) y son el principal vínculo entre la inmunidad innata y la adquirida (11). Estas células son productoras de citocinas como la IL-12 e interferones tipo I y tienen capacidad para inducir la activación y proliferación de linfocitos T, incluyendo la polarización de la respuesta hacia Th1, Th2, el desarrollo de células de memoria y la activación de células B para la producción de anticuerpos. Las características intrínsecas de las CD que las convierte en centinelas del sistema inmune de mucosas son su capacidad fagocítica, de procesamiento y presentación de antígeno, así como la capacidad de recibir una gran cantidad de estímulos gracias a la expresión de receptores de superficie tales como los receptores tipo Toll (TLR's) capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (8) y otros receptores para citocinas, quimiocinas y complejos inmunes. Una vez detectada una señal de peligro por parte



de las CD se inicia una cascada de eventos que resultan en su maduración, lo que conlleva a la activación de células T y B, lo cual determinará el tipo de respuesta inmune (7).

#### **Subpoblaciones de células dendríticas en PP**

En las PP de ratón, se han descrito tres subpoblaciones de CD con diferente distribución, dependiendo de su fenotipo y de los receptores de quimiocinas. Estas son: las CD11c+ CD11b+, localizadas principalmente en el domo subepitelial; las CD11c+CD8 $\alpha$ + localizadas principalmente en las zonas ricas en células T y las dobles negativas a estos marcadores y que se encuentran tanto en la región del domo como en las regiones interfoliculares (10). Los diferentes subtipos de CD poseen diferentes funciones, las células CD8 $\alpha$ + modulan la respuesta hacia Th1, las CD8 $\alpha$ - hacia Th2 (10, 4), de igual manera las CD11b+ se han visto involucradas en procesos inflamatorios en el intestino.

#### **Moléculas coestimuladoras y marcadores de activación**

Las CD pueden encontrarse en dos estadios de diferenciación que corresponden a distintas funciones inmunes. El primero es el estadio inmaduro donde las CD tienen una gran capacidad endocítica y expresan una gran cantidad de receptores de PAMP's como los TLRs. (1). El segundo estadio se inicia cuando reciben una señal de peligro y capturan el antígeno, activándose y madurando, por lo que adquieren la capacidad de presentar antígeno aumentando la expresión de moléculas del MHC I y MHC II sobre su superficie, son capaces de migrar a los órganos linfoides y de aumentar la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40 y CD86, así como la secreción de citocinas para activar de una manera más eficiente a las células T vírgenes (2).

#### **Respuesta inmune contra Rotavirus**

Rotavirus es un virus de RNA de doble cadena que infecta las puntas de las vellosidades del intestino delgado lo cual provoca diarrea en niños menores de 5 años (9). Actualmente, este virus causa alrededor de 600 000 muertes en niños menores de 2 años en todo el mundo, es por ello que el estudio de los elementos de la respuesta inmune ante esta infección son de gran relevancia en el campo de Salud Pública. Uno de los mejores modelos experimentales que permiten el estudio de la respuesta inmune protectora generada para este virus es el murino. En este modelo, los ratones tanto adultos como neonatos son susceptibles a la infección, teniendo una infección aguda, no persistente que se desarrolla a lo largo de 7 días, en donde al día 2 inicia el pico máximo de replicación viral manteniéndose a lo largo de 3 o 4 días y eliminando al virus al día 8 (5, 6). En la actualidad, se sabe que tanto las células Th como las Tc, son importantes en la eliminación del virus, así mismo existe una activación y proliferación temprana de linfocitos B, siendo la producción de anticuerpos IgA uno de los elementos más importantes en la respuesta inmune protectora (3). Todos los elementos de la respuesta inmune adquirida son de gran relevancia durante el desarrollo de inmunidad contra este patógeno, sin embargo el contacto inicial a través de la respuesta inmune innata ha sido escasamente caracterizado. Es por ello, que el estudio de los elementos de la respuesta inmune innata es de gran importancia para poder entender de manera integral la respuesta inmune de la mucosa intestinal y determinar cuales son los elementos necesarios para que se establezca una respuesta inmune eficiente capaz de eliminar al virus del intestino y de proteger contra infecciones subsecuentes.

En base a lo anterior, en el presente trabajo nos propusimos analizar la respuesta temprana de las CD en las PP de ratones infectados oralmente con un rotavirus de ratón; a

través de cortes inmuistoquímicos para ver la movilización de estas células y usando citometría de flujo para determinar los niveles de algunas moléculas de activación.

## **MATERIAL Y METODOS**

**Ratones y virus.** Se utilizaron ratones hembras BALB/c de 4-6 semanas de edad, libres de patógenos (Bioterio IBT-UNAM). Las cepas de rotavirus murino (EDIM) se obtuvieron a partir de diarreas de ratón neonato infectado con  $1 \times 10^4$  uff con EDIM, así como de extractos intestinales obtenidos al día 3 de la infección. Los ratones libres de patógenos fueron sangrados al día 0 y se confirmó ausencia de anticuerpos específicos contra rotavirus. Los ratones fueron infectados con  $1 \times 10^4$  uff del rotavirus silvestre EDIM, previa administración de 100 $\mu$ l de bicarbonato de sodio 1.33% para neutralizar los ácidos estomacales. **Inactivación del virus:** Se preparó una suspensión de virus  $1 \times 10^4$ uff en PBS y se agregaron 40  $\mu$ g/ $\mu$ l de psoralen (SIGMA), se mezcló y se depositó en placas de cultivo colocadas sobre hielo. Posteriormente, las suspensiones virales se expusieron 40 min a rayos UV de onda corta.

**Citofluorometría.** Las células se obtuvieron a partir de PP a las 0, 24 y 48 hrs p.i.. Los órganos se colocaron en medio Hank's completo frío con 2% de SFB y posteriormente fueron disgregados mecánicamente. Las células obtenidas se colectaron en tubos de 15 ml (Costar), y se centrifugaron a 2000 rpm durante 8 min, posteriormente fueron resuspendidas en 5 ml de una solución conteniendo PBS, 2mM EDTA y 2% de SFB. Fueron centrifugadas y lavadas 2 veces más. Las células se contaron utilizando un hemocitómetro. Previo a la tinción se incubaron con suero de conejo al 1% 20 minutos a 4 °C. Las células fueron colocadas en placas de 96 pozos e incubadas con el anticuerpo de interés durante 20 min a 4 °C. Una vez teñidas, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2%. Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron CD4-PE, CD8-FITC, CD11c-APC, CD11c-FITC, CD11c-Biotina, CD80-Biotina, CD40-PE (BD Pharmigen).

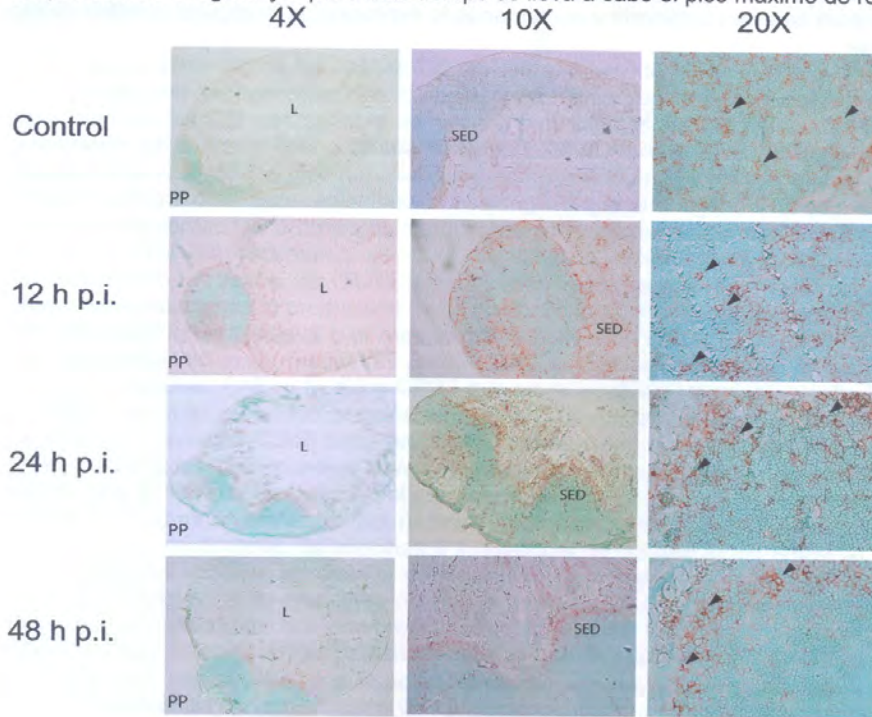
**Inmunoistoquímica. Criohistología.** Se colectaron PP e intestino delgado a partir de ratones infectados con rotavirus EDIM a las 0, 24 y 48 hrs. Los órganos fueron colocados en medio de montaje hidrosoluble para cortes por congelación (Jung, Leica), congelados rápidamente en nitrógeno y almacenados a -80 °C. Posteriormente, se realizaron criocortes de 5-8  $\mu$  de grosor. **Inmunoistoquímica.** Los cortes fueron descongelados y fijados con acetona seguido de una incubación de 1hr a TA en PBS-9% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-0.1% de AzNa para bloquear las peroxidases endógenas. Para bloquear los receptores Fc, los cortes fueron incubados durante 1 hr a TA con PBS al 2% de suero humano o de conejo. Con la finalidad de detectar las células CD11c+ se utilizó el anticuerpo monoclonal N418 de hámster (donado por el Dr. Lourival Possani IBT-UNAM). Se utilizó un anticuerpo policlonal anti-hámster-peroxidasa para detección. Los cortes fueron revelados con dietil-carbazol y contrastados con verde de metilo.

## **RESULTADOS**

### **Las células dendríticas de PP migran hacia el domo por efecto de la inmunización oral con rotavirus**

En cortes histológicos de PP de ratones infectados con rotavirus EDIM, fue posible observar una redistribución celular dependiente del tiempo post-infección de las células CD11c+. Se observó una acumulación de las CD en el domo subepitelial de las PP de ratones infectados

posterior al inóculo oral del virus a las 48hrs post-infección, probablemente debido a la adquisición de antígeno ya que a este tiempo se lleva a cabo el pico máximo de replicación viral.

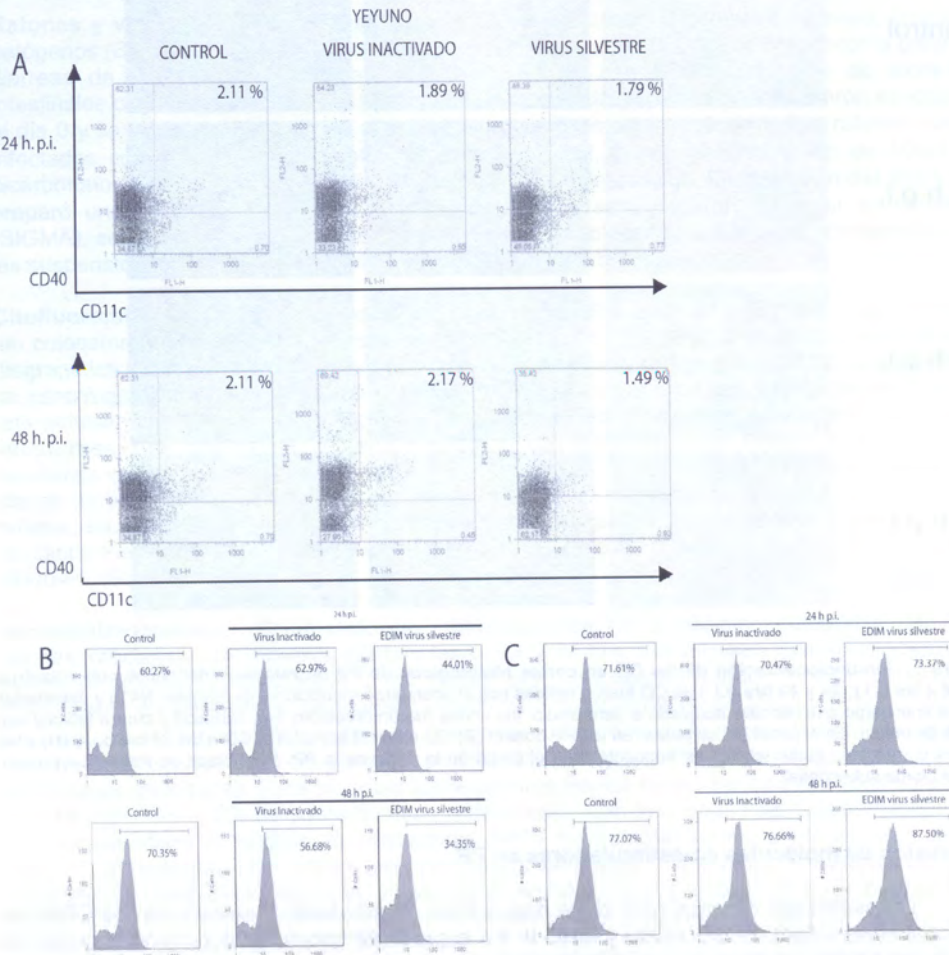


**Figura 1.** Inmunolocalización de las CD en cortes histológicos de PP de ratones infectados con rotavirus EDIM a las 0,12, 24 y 48 hrs p.i. Las CD fueron teñidas con el anticuerpo monoclonal de hámster N418 y detectadas con el anticuerpo anti-hámster acoplado a peroxidasa, los cortes fueron revelados con carbazol y contra teñidos con verde de metilo. En el panel (A) se muestran las PP control (B) CD a las 12 hrs p.i. (C) CD a las 24 hrs p.i. y (D) a las 48 hrs p.i. en este punto las CD se encuentran en el domo en la parte de la PP. PP= Placa de Peyer, L= Lumen, SED= Domo subepitelial.

#### **Expresión de moléculas co-estimuladoras en PP**

Las moléculas consideradas como marcadores de activación y maduración de CPAs son principalmente CD40, CD86, CD80 y MHC II. En el presente trabajo se determinó el porcentaje de células positivas totales para dichos marcadores a las 24 y 48 h posteriores a la infección por rotavirus. Como se muestra en la Fig 2, existen cambios en el porcentaje de células positivas para CD40. A las 48 h p.i. tiempo en el cual se alcanza el mayor pico en la replicación viral, usando virus de la cepa silvestre, observamos una disminución importante tanto en el porcentaje como en la intensidad media de fluorescencia para el marcador CD40 en células totales, así como en CD, sin embargo cuando se utilizó virus inactivado, es decir virus que conservan su estructura y determinantes antigénicos, pero sin capacidad replicativa esta disminución no es tan evidente, lo que demuestra que para que exista una regulación del marcador CD40 se requiere de la replicación viral. Para el marcador CD86 observamos que hay un aumento en el porcentaje

de células totales a las 48 h p.i., sin embargo no hay cambios con respecto al control en CD (dato no mostrado), lo que nos sugiere que existen otras poblaciones celulares como los linfocitos B, los cuales también se están activando y aumentando la expresión de moléculas coestimuladoras en su superficie.



**Figura 2. Expresión de CD40 sobre células provenientes de PP de ratones infectados a las 24 y 48 hrs. A)** Expresión de CD40 sobre CD a las 24 y 48 h de PP con virus inactivado o con virus silvestre. **B)** Expresión de CD40 sobre células totales de PP de ratones infectados con virus inactivado o virus silvestre a las 24 y 48 h p.i. **C)** Expresión de la molécula CD86 en células totales de PP de ratones infectados con virus inactivado o virus silvestre a las 24 y 48 hrs p.i..

## DISCUSION

La movilización de las células CD11c<sup>+</sup> en el domo de la PP fue más evidente a las 48 hrs, por lo que proponemos que probablemente esta redistribución celular se deba a la activación de las CD por señales de peligro provenientes de las células infectadas y a la adquisición de antígeno viral a través de las células M, ya que a las 48 hrs post infección es cuando se lleva a cabo el pico máximo de replicación viral en el intestino, el cual se mantiene a lo largo de 5 a 7 días. Esta redistribución nos sugiere que el antígeno viral está siendo captado y reconocido por las CD a través de los diferentes receptores de su membrana y posiblemente por TLRs (Toll-like receptors), ya que en estudios recientes de nuestro laboratorio, el reconocimiento a través de TLR3 parece estar participando en la activación de CD y macrófagos induciendo la producción de óxido nítrico *in vitro*. Por lo que, sugerimos que *in vivo*, este reconocimiento conlleva a la maduración y activación de las CD dentro de las PP y por tanto a la adquisición de receptores como CCR9 el cual se expresa en la región del epitelio asociado a folículo (FAE) y CCR6 y CCR7 que promueven el movimiento de las CD11c<sup>+</sup> hacia al domo, según lo reportado anteriormente por (12). Así mismo observamos una regulación negativa del marcador CD40 tanto en células totales como en las CD de PP provenientes de ratones infectados con rotavirus silvestre, ya que cuando se utilizó virus inactivado, el cual cuenta con todos sus elementos antigénicos, no hay diferencias con respecto al control. La molécula CD40 es un elemento que participa en la activación de las CPA, lo que las convierte en excelentes productoras de citocinas y activadoras de células T, sin embargo creemos que esta regulación negativa se debe a un fenómeno de homeostasis del intestino, en donde la respuesta inflamatoria se encuentra finamente regulada para evitar una respuesta exacerbada provoque un daño tisular que comprometa la integridad del intestino. En el caso del marcador CD86, no hay cambios en el porcentaje de CD que lo expresen, sin embargo sí en células totales, lo que nos sugiere, que la activación se lleva a cabo en varias poblaciones celulares como consecuencia de la replicación viral principalmente en células presentadoras de antígenos y en linfocitos B. Esta activación temprana, conlleva al desarrollo de una respuesta inmune protectora, en donde participan de manera muy importante las células B como productoras de IgA anti-rotavirus.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La infección por rotavirus tiene un efecto sobre las CD residentes de PP de yeyuno, provocando su movilización al domo de las PP. Determinamos que se requiere de la replicación viral para que exista regulación sobre la expresión de los marcadores de activación CD40 y CD86. A la fecha en nuestro laboratorio se contempla el análisis histológico de las PP con la finalidad de observar si las células que se movilizan se encuentran en contacto directo con el antígeno viral, así mismo se está evaluando la capacidad de estas células en la producción de citocinas, para determinar su participación en la contención y eliminación de la infección por rotavirus. Así mismo, nos encontramos analizando poblaciones de CD que expresen otras moléculas coestimuladoras como los son CD80 y MHCII para completar su perfil de activación durante las primeras etapas de infección, y así establecer su función como iniciadoras de la respuesta inmune intestinal.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Andoniu, C.E., et al., *Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity*. Nat Immunol, 2005. 6(10): p. 1011-9.
- 2.- Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. 392(6673): p. 245-52.
- 3.- Burns, J.W., et al., *Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity*. Science, 1996. 272(5258): p. 104-7.
- 4.- Carbone, F.R. and W.R. Heath, *The role of dendritic cell subsets in immunity to viruses*. Curr Opin Immunol, 2003. 15(4): p. 416-20.
- 5.- Franco, M.A. and H.B. Greenberg, *Immunity to rotavirus in T cell deficient mice*. Virology, 1997. 238(2): p. 169-79.
- 6.- Franco, M.A. and H.B. Greenberg, *Immunity to rotavirus infection in mice*. J Infect Dis, 1999. 179 Suppl 3: p. S466-9.
- 7.- Niedergang, F., et al., *Dendritic cells: the host Achille's heel for mucosal pathogens?* Trends Microbiol, 2004. 12(2): p. 79-88.
- 8.- Nochi, T. and H. Kiyono, *Innate immunity in the mucosal immune system*. Curr Pharm Des, 2006. 12(32): p. 4203-13.
- 9.- Perez-Vargas, J., et al., *Rotavirus vaccine: early introduction in Latin America-risks and benefits*. Arch Med Res, 2006. 37(1): p. 1-10.
- 10.- Sato, A. and A. Iwasaki, *Peyer's patch dendritic cells as regulators of mucosal adaptive immunity*. Cell Mol Life Sci, 2005. 62(12): p. 1333-8.
- 11.- Steinman, R.M. and H. Hemmi, *Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. 311: p. 17-58.
- 12.- Zhao, X., et al., *CCL9 is secreted by the follicle-associated epithelium and recruits dome region Peyer's patch CD11b+ dendritic cells*. J Immunol, 2003. 171(6): p. 2797-803.