

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ACTIVACIÓN DE CÉLULAS DE LA
RESPUESTA INMUNE INNATA POR
RNAdc ROTAVIRUS EN UN MODELO DE
RATÓN *IN VITRO*”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

**BIOL. DENISSE JOSSOARY ROSALES
MARTÍNEZ.**

**TUTOR: Dr. FERNANDO ROGER ESQUIVEL
GUADARRAMA.**

MÉXICO, D.F.

Octubre, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología Celular de la Facultad de Medicina de la UAEM. Bajo la asesoría del Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama. Durante la realización de este trabajo se contó con una beca otorgada por CONACYT con No de registro: 189758 y por DGEP.

Agradecimientos:

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

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Ivonne Rosentein y Dra. Lourdes Guitierrez X. Gracias por su dirección y sus valiosas sugerencias en la realización de este trabajo.

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

Al Dr. Carlos Arias y a la Dra. Susana López por su amable disposición en la utilización del equipo PCR-TR.

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

A los miembros del Jurado:

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

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

Al Dr. Santa Olalla. Gracias por su gran ejemplo y ayudarme.

Amis Papas: por su apoyo incondicional, su amor y comprensión siempre.

Ami hermano; por darme tanto amor y ser el mejor hermano y a su nueva familia Judith y Victor, los quiero.

A toda mi familia los quiero mucho, por estar siempre a mi lado.

A mis compañeros del Laboratorio. Oscar, Tannya, Cecilia, Malu, Vanesa, Ernesto, Raúl, Marco, Coral, Diana, Ale, Heder, Gracias por su amistad, y apoyo.

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

A los del laboratorio del Dr. Arias. Camilo, Liliana, Jimena, Don Pedrito, Margarito, y los demás.

Amis amigos. Lila, Luci, Alejandra, Luis, Alejandro, David, Lupita Mtz, Uriel(a ti TAM) , gracias por alegrar mi vida los quiero mucho.

ABREVIATURAS

- BCR:** Receptor de célula B
- CD:** Células dendríticas
- CDp:** Célula dendrítica plasmocitoíde
- Células B:** Linfocitos B
- CE:** Células Epiteliales
- Células Tc:** Linfocitos T citotóxicos
- Células Th:** Linfocitos T cooperadores
- CPA:** Célula presentadora de antígeno
- DD:** Dominio de muerte
- DLP:** Partículas de doble capa
- EAP:** Epitelio asociado al folículo
- GLM:** Ganglio linfático mesentérico
- GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
- HSP:** Proteína del choque térmico
- IFN:** Interferón
- IL:** Interleucina
- iNOS:** Sintasa de Óxido Nítrico Inducible
- IRF:** Factor regulador de IFN
- ISRE:** Elemento de respuesta sensible a IFN
- LP:** Lámina propia
- LPS:** Lipopolisacárido
- LRR:** Repeticiones ricas en leucina
- MAL:** Proteína adaptadora tipo MyD88 también conocida como TIRAP
- MDI:** Multiplicidad de infección
- MHC:** Complejo principal de histocompatibilidad
- MIIC:** Compartimentos ricos en MHC II
- MO:** Médula ósea
- MyD88:** Molécula de diferenciación mieloide
- NK:** Linfocitos asesinos naturales
- NO:** Óxido Nítrico
- NOS:** Sintasa de Óxido Nítrico
- NSP:** Proteína no estructural
- PAMP:** Patrones moleculares asociados a patógenos

PKR: Proteína cinasa R
PMXB: Polimixina B
Poli I:C: Polímero Sintético de RNAdc
PP: Placa de Péyer
PRR: Receptores de reconocimiento de patógenos
R: Región
RER: Retículo endoplasmático rugoso.
RNAcs: Ácido ribonucleico de cadena sencilla
RNAdc: Ácido ribonucleico de doble cadena
RV: Rotavirus
SCID: Ratones con inmunodeficiencia severa
SFB: Suero fetal bovino
SBN: Sobrenadante
TCR: Receptor de célula T
TGF- β : Factor transformante de crecimiento
TI: Timo independiente
TIR: Receptor Toll/IL-1
TLR: Receptor tipo Toll
TNF: Factor de necrosis tumoral
TRAF: Factor asociado al receptor de TNF
TRIF: Molécula adaptadora un dominio TIR
UFF: Unidades formadoras de focos
VLP's: Pseudopartículas virales
VP: Proteína viral

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Generalidades	8
1.2 Estructura	
a) Genoma viral	8
b) Estructura viral	10
1.3 Clasificación y Epidemiología	13
1.4 Ciclo Replicativo	13
1.5 Patología	14
1.6 Generalidades de la respuesta Inmune	15
1.7 El Sistema Inmune	15
a) Respuesta Inmune Innata	15
1. Macrófagos	16
2. Células Dendríticas	18
3. Receptores tipo Toll	22
b) Respuesta Inmune Adaptativa	23
1.8 Respuesta Inmune en la infección por rotavirus	25
a) Respuesta Inmune Innata en la infección por rotavirus	25
b) Respuesta Inmune Adaptativa en la infección por rotavirus	26
II. ANTECEDENTES	29
III. JUSTIFICACIÓN	32
IV. HIPÓTESIS	33
V. OBJETIVOS	34
5.1 Objetivo general	34
5.2 Objetivos particulares	34
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	35
6.1 Ratones	35
6.2 Medios de cultivo	35
6.3 Líneas celulares	35
6.4 Virus	36
6.4.1 Determinación de rendimiento viral	36
6.4.2 Semipurificación de rotavirus por colchon de sacarosa	37
6.4.3 Purificación de rotavirus por Cloruro de Cesio	37
6.4.4 Obtención de RNAdc de rotavirus	38
6.5 Obtención de sobrenadante (SBN) rico en GM-CSF	38
6.6 Obtención de médula ósea de ratón	39
6.6.1 Generación de CD ⁺ a partir de células de médula ósea	39
6.7 Purificación positiva de células CD ⁺ 11c ⁺ por columna magnética	39
6.8 Estimulación de las CD de médula ósea (CDMO)	40
6.9 Obtención de macrófagos de médula ósea	40
6.10 Obtención de Sobrenadante de Intestino(SNB)	40
6.11 Ensayo de Oxido Nítrico	41

6.12 Citofluorometría	41
6.13. Determinación y Cuantificación de RNAm para citocinas (TNF- α , IL-12 e IL-10) y TLR-3	42
6.13.1 Purificación de RNA total de Macrófagos, CD	42
6.13.2 Obtención de cDNA	42
6.13.3 Reacción en cadena de la polimerasa – Tiempo real (PCR-TR)	43
6.14 Prueba Estadística	44
VII. RESULTADOS	45
7.1 Generación de células dendríticas y macrófagos a partir de médula ósea	45
7.2 Producción de NO por células estimuladas con rotavirus	47
7.2.1 Producción de NO por CD, macrófagos y células epiteliales con sobrenadante (SBN) de intestino de ratón	49
7.3 Expresión de CD40 en CD y macrófagos derivados de médula ósea estimuladas con rotavirus	52
7.4 Cuantificación de RNAm de citocinas TNF- α , IL-12, IL-10	53
7.6 Amplificación del mensajero para TLR3	56
VIII. DISCUSIÓN	57
IX. CONCLUSIONES	61
X. PERSPECTIVAS	62
XI. BIBLIOGRAFÍA	63

RESUMEN

Rotavirus es un agente etiológico importante causante de gastroenteritis severas en infantes humanos, que provoca cerca de 400,000 muertes anualmente a nivel mundial y principalmente en países en desarrollo. Debido a que la infección por rotavirus es de rápida resolución (8 días aprox), se propone que el sistema inmune innato intestinal juega un papel importante en la contención de la infección que ocurre sólo en los enterocitos maduros del intestino. Los macrófagos y las células dendríticas (CD) podrían ser las primeras células involucradas en sensor la presencia de patógenos en el intestino. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que las células epiteliales (CE) intestinales también pueden responder tempranamente a través de la secreción de moléculas microbicidas y citocinas. Los receptores tipo Toll (TLR's) son moléculas de superficie presentes en las células de la respuesta inmune innata que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). La interacción de los TLRs con los PAMP's genera una cascada de señalización intracelular que culmina con la inducción de genes involucrados en actividades anti-microbianas y en la maduración de las CPA's. El TLR3 reconoce RNA de doble cadena (RNAdc) y se expresa en CD, macrófagos y CE. Debido al papel tan importante que tiene el rotavirus en enfermedades diarreicas infantiles, es de relevancia entender la participación del sistema inmune innato, en la respuesta a la infección. Esto permitirá contar con más herramientas para el control de la enfermedad.

El objetivo de este trabajo consistió en determinar si el RNAdc de rotavirus es capaz de estimular a células de la respuesta inmune innata en un modelo *in vitro*. Se empleó la línea celular de enterocitos murinos transformados MODE-K, además de CD y macrófagos derivados de médula ósea de ratón. Las células se cultivaron en presencia del RNAdc del rotavirus y la activación se determinó a través de la producción de óxido nítrico (NO), aumento de la molécula CD40 y aumento de mensaje para TNF- α , IL-12 e IL-10. Como control positivo se utilizó RNAdc sintético (Poli I:C), que estimula a las células a través de TLR3. Además se incluyeron en los experimentos LPS que estimula células a través de TLR-4 y rotavirus de la cepa RRV purificado que está constituido por el genoma y 6 proteínas.

Se encontró que el genoma de rotavirus compuesto por RNAdc es capaz de estimular a células de la respuesta inmune innata como CD, macrófagos y células epiteliales de ratón muy probablemente a través de TLR-3. Sin embargo, el efecto sobre los marcadores analizados fue heterogéneo, predominando la respuesta microbicida de NO. Esto podría deberse a efectos diferenciales en los mecanismos de traducción de señal generados por TLR-3, dependiendo de la extirpe celular y los promotores involucrados. Se propone que en una infección *in vivo* por

rotavirus, las células epiteliales intestinales podrían responder al virus entrante reconociendo sus proteínas y su genoma a través de diferentes TLR's, incluyendo TLR-3 iniciando la respuesta inmune aún antes de que se haya establecido la infección. Los componentes de rotavirus producidos en la infección como partículas virales, subpartículas virales y RNAdc replicativo estimularían posteriormente a las CD y macrófagos intestinales, que estarían preactivados por las citocinas proinflamatorias secretadas por las células epiteliales.

SUMMARY

Rotavirus is a etiológico agent important cause of severe gastroenteritis in human infants, that cause annually near 400.000 deaths at world-wide and in countries mainly developing level. Because the infection by rotavirus is of fast resolution (8 days approx), it sets out that the intestinal innate immune system plays an important role in the containment of the infection that happens only in the mature enterocitos of the intestine. The macrophages and the dendríticas cells (CD) could be the first cells involved in sensar the presence of pathogens in the intestine. Nevertheless, recently one has demonstrated that the epithelial cells (EC) intestinal also can early respond through the secretion of microbicidas molecules and citocinas. The receivers Toll type (TLR's) are present molecules of surface in the cells of the innate immune response that molecular patrons recognize associate pathogens (PAMPs). The interaction of the TLRs with the PAMP's generates a cascade of intracellular signaling that culminates with the induction of genes involved in anti-microbial activities and the maturation of the CPA's. The TLR3 recognizes RNA of double chain (RNAdc) and it are expressed in CD, macrophages and EC. Due to the so important paper that it has rotavirus in infantile diarreicas diseases, it is of relevance to understand the participation of the innate immune system, in the answer to the infection. This will allow to count on more tools for the control of the disease.

The objective of this work consisted of determining if the RNAdc of rotavirus is able to stimulate to cells of the innate immune response in a model in vitro. The cellular line of murinos enterocitos transformed MODE-K, in addition to CD and macrophages derived from bone marrow of mouse was used. The cells were cultivated in the presence of the RNAdc of rotavirus and the activation was determined through the production of nitric oxide (NOT), increase of molecule CD40 and increase of message for TNF -, IL-12 and IL-10. As positive control were used synthetic RNAdc (Poli I:C), that stimulates to the cells through TLR3. In addition they were included in the experiments LPS that stimulate cells through TLR-4 and rotavirus of the purified stock RRV that is in favor constitutito of the genome and 6 proteins.

One was that the genome of rotavirus made up of RNAdc is able to stimulate to cells of the innate immune response like CD, macrophages and epithelial cells of mouse more likely through TLR-3. Nevertheless, the effect on the analyzed markers was heterogenous, predominating the microbicida answer of NO. This could be due to effects differentials in the mechanisms of translation of signal generated by TLR-3, depending on it extirpates cellular and the involved promoters. The immune response still sets out that in an infection in alive by rotavirus, the intestinal epithelial cells could respond to the incoming virus recognizing their different proteins and their genome through TLR's, including TLR-3 initiating before the infection has settled down. The produced components of rotavirus in the infection like virales particles, virales subparticles

and replicativo RNA_{dc} would later stimulate to the CD and intestinal macrophages, that would be preactivated by the proinflammatory citocinas secretadas by the epithelial cells.

I INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

Rotavirus es el principal agente etiológico de gastroenteritis virales severas en infantes humanos y causa directa de aproximadamente 352,000 a 592,000 muertes al año (Parashar *et al.*, 2003; Rivest *et al.*, 2004).

Es importante hacer notar que aunque la mortalidad debida a las infecciones por rotavirus es mucho mayor en países en desarrollo que en países desarrollados, la frecuencia de infección es muy similar en ambos tipos de países. Debido al papel tan importante que tienen los rotavirus en las enfermedades diarreicas infantiles y al hecho de que aún los niveles de higiene avanzados parecen no ser capaces de controlar significativamente las infecciones por estos virus, existe un interés considerable en desarrollar estrategias de vacunación que sean eficaces para controlar la severidad de la diarrea causada por estos virus (Kapikian *et al.*, 2001).

Los rotavirus en humanos fueron inicialmente descritos en 1973 por Ruth Bishop y colaboradores en Australia (Bishop, *et al.*, 1973), quienes encontraron la presencia de partículas virales al observar al microscopio electrónico biopsias de intestino delgado de niños que tenían diarrea severa de origen no bacteriano. En base a la morfología de estos virus, cuya apariencia al microscopio electrónico era la de una rueda de carreta antigua, estos virus fueron bautizados con el nombre de rotavirus, del latín rota, que quiere decir rueda (Flewett, *et al.*, 1974) (Figura 1). Desde entonces, estos virus han sido reconocidos como el principal agente etiológico de las gastroenteritis virales en las crías de un gran número de mamíferos (incluyendo al hombre), y de aves (Estes & Cohen, 1989). Así mismo se ha generado una gran cantidad de información sobre las propiedades biológicas y epidemiológicas de estos virus.

La infección por rotavirus es muy común, se ha observado que a la edad de 5 años, el 95% de los niños ya han sido infectados. El pico de incidencia de la enfermedad es entre los 6 y 24 meses de edad, siendo esta población la de alto riesgo de sufrir una diarrea severa, que frecuentemente requiere de hospitalización. La infección en los adultos es por lo regular asintomática, aunque ocasionalmente se presentan los síntomas en los padres de niños infectados, en pacientes inmunocomprometidos y en adultos de la tercera edad. La diarrea por rotavirus ocurre principalmente durante los meses de otoño e invierno en los países de climas templados; esta estacionalidad es menos marcada en los países con clima tropical (Cook, *et al.*, 1990).

La sintomatología típica de la infección por rotavirus es diarrea severa (más de 8 evacuaciones al día) acompañada de vómito y puede cursar con fiebre. Esta es una enfermedad autolimitante, con una duración promedio de aproximadamente cinco días. La gran mortalidad asociada a esta enfermedad es debida a la severa deshidratación que provoca la infección, por lo que la

recomendación principal en este padecimiento es la de rehidratar y mantener el balance electrolítico del paciente (Kapikian *et al.*, 2001). La principal ruta de transmisión de los rotavirus es la vía fecal-oral, aunque también se ha especulado que el contacto persona a persona, el contacto con secreciones respiratorias y el contacto con superficies contaminadas pudieran ser fuentes de transmisión, ya que los altos índices de infección por este virus en los primeros tres años de vida en todo el mundo son independientes de las condiciones higiénicas y sanitarias. La infección es especie-específica ya que la transmisión de rotavirus entre el hombre y animales no ha sido documentada, a pesar de que las cepas aisladas de humanos tienen una alta homología genética con las cepas aisladas de animales (Nakagomi & Nakagomi, 1991).

1.2 Estructura

a) Genoma viral

El rotavirus es un virus de RNA de doble cadena (RNAdc) perteneciente a la familia *Reoviridae*. Su genoma viral está constituido por once segmentos de RNAdc cuyos tamaños varían de aproximadamente 660 pb del gen más pequeño, hasta aproximadamente 3300 pb para el gen más grande (Both, *et al.*, 1994, Mattion, 1992). Esta diferencia de tamaños permite que estos segmentos al ser separados electroforéticamente presenten un patrón característico, típico y único para los rotavirus, lo que ha sido la base para desarrollar un método diagnóstico para estos virus. En general el patrón electroforético, o electroferotipo, consiste de un grupo de cuatro segmentos de RNA (1-4) de alto peso molecular; 5 segmentos de tamaño mediano (5 a 9) que incluyen un triplete muy característico formado por los segmentos 7, 8 y 9; y los dos segmentos más pequeños (10 y 11) (Figura 1).

El genoma viral desnudo (en ausencia de las proteínas de la cápside) no es infeccioso, ya que para transcribirse, necesita de una RNA polimerasa que pueda utilizar RNA como molde. Esta polimerasa no se encuentra en las células, por lo que el virus debe de proveer esta actividad para garantizar su replicación.

Los RNA mensajeros (RNAm) de rotavirus contienen la estructura de CAP en su extremo 5', pero a diferencia de la mayoría de los RNAm celulares, no tienen poli(A) en su extremo 3' (Imai, *et al.*, 1983, McCrae & McCorquodale, 1983). En general, la secuencia nucleotídica de los genes virales es rica en A/T (58- 67%). Cada segmento de RNA codifica para una proteína viral, excepto el gen 11 el cual contiene dos marcos abiertos de lectura, que codifican dos proteínas virales.

Actualmente, se conoce la secuencia nucleotídica de los once segmentos de RNA de varias cepas de rotavirus. El análisis comparativo de estas secuencias ha revelado que existen varias características compartidas entre todos los segmentos. Todos los genes de rotavirus están flanqueados en los extremos 5' y 3' por secuencias no traducidas; la longitud de estas

secuencias es variable entre los diferentes genes (entre 9 y 49 nucleótidos en el extremo 5' y entre 17 y 182 nucleótidos en el extremo 3'), pero se conserva entre los segmentos equivalentes de cepas aisladas de diferentes especies. Estas secuencias no traducidas flanquean un marco abierto de lectura en todos los segmentos, a excepción del segmento 11 que contiene dos marcos abiertos de lectura. Los primeros 10 nucleótidos del extremo 5', así como los últimos 8 nucleótidos del extremo 3' están altamente conservados entre todos los segmentos de las diferentes cepas; las secuencias consenso de estas regiones son : 5' (**GGC** A/U A/U **UA/U A** A/U A/U.....) y en el extremo 3': (....A/U **U** G/U U/G G/U A/G **CC**) (Estes & Cohen, 1989, Patton, 1995). La alta homología de estas secuencias consenso entre los diferentes segmentos sugiere que estas regiones contienen señales que son importantes para la transcripción, transporte, replicación y/o ensamblaje de los segmentos virales.

Recientemente se ha reportado que en las regiones no traducidas de los mensajeros de los rotavirus existen señales de replicación que actúan en *cis*. Entre éstas se ha definido una señal promotora mínima, esencial para la síntesis de la hebra negativa de RNA (que es la hebra de RNA complementaria al mensajero o hebra positiva) durante la replicación del genoma, la cual está formada por los últimos siete nucleótidos del extremo 3'. Se han identificado también otras dos regiones adicionales, que funcionan como reguladores positivos, ya que en presencia de estas secuencias se obtiene un nivel óptimo de síntesis de los RNAm virales; estas secuencias consisten de aproximadamente 25 nucleótidos, inmediatamente "río arriba" de la región promotora del extremo 3' y de al menos 10 nucleótidos en el extremo 5' del RNAm (Wentz, *et al.*, 1996).

Hasta ahora las secuencias que se han identificado representan señales para la replicación y la traducción de los RNA's mensajeros virales, sin embargo, aún no se han encontrado las señales que son necesarias para la encapsidación de los once segmentos diferentes en una sola partícula viral. La búsqueda de estas regiones es un tópico de arduo estudio en el campo de los virus cuyos genomas están formados por RNAs segmentados.

El genoma de los rotavirus se puede rearmar, esto sucede cuando una célula es coinfectada por dos cepas distintas de rotavirus, la progenie viral resultante de esta co-infección es una población de virus que contiene diferentes combinaciones de los diferentes genes parentales. Este tipo de rearrreglos génicos entre rotavirus de diferentes cepas es posible debido a las secuencias consenso que comparten todos los segmentos del genoma viral y es una fuente de variabilidad génica de esta familia de virus.

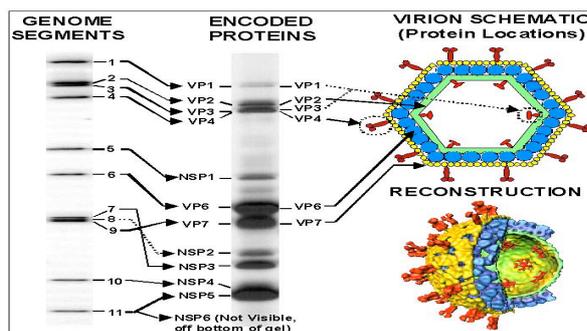


Figura 1. Representación esquemática de Rotavirus, Estes, 1996.

b) Estructura viral

Las 6 proteínas estructurales del virión son; VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7, y las 6 no estructurales; NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6 presentes solo en la célula infectada, las cuales juegan un papel importante en la replicación y morfogénesis del virus (Arias & López, 2000; Patton, 1995).

El virión maduro carece de envoltura lipídica, posee estructura icosaédrica y mide aproximadamente 75 nm de diámetro, además se conforma por 3 capas concéntricas de proteínas.

Capa Externa: formada por trímeros de la glicoproteína VP7 y sobre esta capa emergen 60 espículas de dímeros de la proteína VP4 (Arias & López., 2000). La glicoproteína es el principal componente y está agrupada en 260 trímeros triangulares que asociados entre si forman 132 canales acuosos (12 tipo I, 60 del tipo II y 60 del tipo III). La capa formada por VP7 tiene un grosor de \approx 35 nm. La función de los canales no ha sido completamente descrita, pero es posible que estén involucrados en la importación de metabolitos para la transcripción de RNA y la exportación de los transcritos nacientes para el proceso de replicación viral.

Dímeros de la proteína VP4 forman 60 espículas que traspasan la capa formada por VP7, insertados en los canales acuosos del tipo I. Las espículas a su vez también interactúan con la cápside intermedia formada por VP6. Estas interacciones de VP4 podrían participar en el mantenimiento de la geometría del virión, así como los dominios funcionales de las capsides. La proteína VP4 al ser cortada por tripsina (presente en el sitio natural de la infección) produce VP8* y VP5*. Este corte de VP4 está acompañado de un incremento en la infectividad del rotavirus, y con su entrada a la célula (Gray & Desselberg, 2000, Shaw *et al.*, 1999, Clark *et al.*, 2000, Estes, 1996).

Capa Intermedia: La capa intermedia del virus está formada por la proteína más abundante del virión, VP6, codificada por el gen 6. Esta proteína, de 397 aminoácidos, juega un papel muy importante en la estructura del virión dado que interacciona tanto con la proteína VP2, hacia el

interior de la partícula viral, como con VP4 y VP7 en la capa externa del virión (Prasad, 1988). VP6 forma espontáneamente trímeros y es muy estable; esta característica y el hecho de que contiene determinantes antigénicos (o epítopes) conservados entre diferentes cepas de rotavirus, son la razón de que VP6 sea el blanco antigénico principal en los ensayos de diagnóstico inmunológico para los rotavirus. Los epítopes de VP6 que son conservados entre todas las cepas de rotavirus del grupo A son llamados epítopes de grupo. En esta proteína también se han identificado otros epítopes, llamados epítopes de subgrupo, los cuales han sido utilizados como marcadores epidemiológicos para clasificar diferentes cepas dentro del grupo A. Si se remueve VP6 de las partículas de doble capa (DLPs) se pierde la actividad de transcriptasa de esta partícula, aunque hasta la fecha no se ha reportado que esta proteína tenga este tipo de actividad. Aparentemente el papel de VP6 en esta función es principalmente estructural, a través de mantener la conformación apropiada, o la organización del complejo transcripcional en la nucleocápside viral (Bican *et al.*, 1982, Sandino *et al.*, 1986). Recientemente se resolvió la estructura cristalográfica de esta proteína. Sabemos que la unidad estructural de VP6 es un trímero y que contiene un sitio de unión al ión calcio y un sitio de unión al ión zinc, aunque aún no es claro cual es la función de estos iones en la partícula viral (Mathieu *et al.*, 2001). Esta proteína es hidrofóbica y altamente antigénica e inmunogénica (Estes *et al.*, 1996, Gorziglia *et al.*, 1985, Sabara *et al.*, 1987).

Núcleocápside o core:

Las proteínas que conforman la nucleocápside son VP1, VP2 y VP3. Como ya mencionamos, es en estas partículas donde se lleva a cabo la replicación del RNA viral. La actividad responsable de esta función, la RNA polimerasa dependiente de RNA, forma complejos con otras proteínas virales. Las proteínas que constituyen los complejos varían, dependiendo de si la función del complejo es la de sintetizar RNA de doble cadena utilizando como templado el RNAm (partículas replicativas), o si se trata de sintetizar RNA mensajeros a partir del RNA de doble cadena (partículas activas en transcripción).

Recientemente se implementó un sistema libre de células para estudiar la replicación del genoma viral. Este sistema, consiste en nucleocápsides que han sido “abiertas” por exposición a bajas concentraciones de sales a las cuales se les añade RNAm viral, para que sea transformado en RNAdc. Con este sistema se ha caracterizado y ha permitido definir el papel de cada una de las proteínas involucradas, así como las regiones en los RNAm que son necesarias para que éstos puedan ser replicados (Chen *et al.*, 1994). También se ha implementado un sistema similar partiendo de la coexpresión de las proteínas virales (VP1, VP2 y VP3) en células de insecto.

Estas tres proteínas se ensamblan de manera espontánea y tienen actividad de replicasa si se les añade RNAm viral. Esto ha permitido determinar de manera más fina la importancia de cada

una de las proteínas en la replicación del RNA. En estos sistemas se ha observado que el RNAm funciona eficientemente como templado para la síntesis del RNAdc, sin embargo, el RNAdc viral no sirve como templado para la síntesis de RNAm, lo que es consistente con la observación de que los requerimientos estructurales, o las proteínas requeridas para la transcripción (síntesis del RNAm) son diferentes de los requerimientos para la replicación (síntesis de la cadena complementaria del RNAm). Los estudios realizados en este sistema de replicación han demostrado que VP2, y no VP6, es esencial para la actividad de replicasa de la partícula (Mansell *et al.*, 1994).

Estos resultados indican también que las partículas que forman la nucleocápside, o un subgrupo de estas proteínas, tienen la función tanto de replicasas, como de transcriptasas.

VP1. A pesar de que aún no existe evidencia directa para afirmar cual de las proteínas virales de la nucleocápside es la RNA polimerasa dependiente de RNA, la proteína VP1 (de 1088 aminoácidos), producto del gen 1 es la más probable, por las siguientes razones: i) La secuencia de la proteína contiene regiones que tienen homología con motivos conservados entre la RNA polimerasas dependientes de RNA de otros virus (Cohen *et al.*, 1989, Fukuhara *et al.*, 1989, Mitchell & Both, 1990); ii) VP1 está presente en partículas virales transcripcionalmente activas y se puede entrecruzar con el RNAm, utilizando luz ultravioleta como agente entrecruzador (Patton *et al.*, 1995); iii) VP1 es componente común de las partículas virales con actividad de RNA polimerasa (transcriptasa o replicasa) (Gallegos & Patton 1989). Además los complejos de VP1-VP2 coexpresados en células de insecto tienen la propiedad de sintetizar RNAdc in vitro a partir de RNAm viral (Zeng *et al.*, 1996).

VP2. El producto del gen 2, VP2 (de 881 aminoácidos) es la proteína más abundante de la nucleocápside y constituye la capa más interna del virus. VP2 es capaz de unirse a RNAs de cadena sencilla o doble, aunque tiene una mayor afinidad por los RNAs de cadena sencilla, función que podría estar relacionada con el empaquetamiento de los RNAs virales dentro de la nucleocápside (Labbe *et al.*, 1994). En experimentos de reconstitución utilizando proteínas purificadas, se ha encontrado que aunque muy probablemente VP1 es la RNA polimerasa viral, ésta requiere de VP2 para realizar su función (Mansell *et al.*, 1994).

VP3. Esta proteína (de 835 aminoácidos) es codificada por el segmento de RNA 3, es una proteína básica y al igual que VP1 existen muy pocas copias de este polipéptido por virión. A VP3 se le ha atribuido la actividad de guanilil-transferasa del RNA viral por las siguientes observaciones (Liu *et al.*, 1992, Patton & Chen, 1999, Pizarro *et al.*, 1991): i) Tiene una alta afinidad por RNA de cadena sencilla y no se une al RNA de doble cadena (Patton & Chen, 1999); ii) su secuencia contiene motivos estructurales que se han encontrado en otras guanilil transferasas (Fukuhara *et al.*, 1989, Mitchell & Both 1990); iii) une GTP de modo covalente en una reacción reversible. Dado que esta actividad es necesaria para la síntesis de los RNAs maduros, pero no para los RNAdc, VP3 debe de ser un componente esencial de los complejos

de transcripción y no de los complejos replicativos.

1.3 Clasificación y Epidemiología

En base a las características antigénicas de la proteína VP6, se han descrito al menos 7 grupos de rotavirus (A-G). Se ha reportado infección en humanos y animales con rotavirus de los grupos A, B y C, mientras que los rotavirus D, E, F y G sólo se han aislado de especies animales. Los rotavirus del grupo A son los más importantes por ser la principal causa de gastroenteritis severa y dentro de este grupo se encuentran los subgrupos I, II, III, y no-I, no-II, de acuerdo a la reactividad de 2 anticuerpos monoclonales con VP6.

Debido a que VP7 y VP4 son las únicas proteínas blanco de anticuerpos neutralizantes, surgió una clasificación dual similar a la que se utiliza para los virus influenza. Para VP7, hay al menos 14 diferentes tipos específicos, denominados tipos G (derivado de glicoproteína). Y para VP4, existen al menos 19 diferentes tipos específicos llamados tipos P (derivado de proteína sensible a proteasa). Todos los tipos específicos G y P pueden ser distinguibles por la secuencia de sus genes. Los genotipos de P se asocian con ciertos serotipos, por lo que parece haber correspondencia entre ambas propiedades. Cada virus tiene serotipo P indicado por un número que lo precede y es seguido por el genotipo P indicado por un número entre corchetes [ej. P1A (8)]. Debido a que VP4 y VP7 están codificados por diferentes segmentos de RNA, se pueden observar diversas combinaciones de tipos G y P en los rotavirus humanos y animales. (Gray & Desselberg, 2000, Shaw *et al.*, 1999, Clark *et al.*, 2000, Estes, 1996).

1.4 Ciclo Replicativo

Rotavirus tiene un tropismo específico por los enterocitos maduros localizados en las vellosidades del intestino delgado; sin embargo, el conocimiento que se tiene acerca de su ciclo replicativo se ha derivado principalmente de estudios realizados en la línea celular derivada de epitelio de riñón del mono reshus, MA-104 (Ciarlet & Estes, 2001, Raming *et al.*, 2004). Los eventos iniciales de la infección viral consisten de la unión del virus a la superficie celular seguida de la penetración a la célula. El éxito de estos eventos depende del reconocimiento de receptores específicos en las células, los cuales son determinantes del tropismo viral. Actualmente, se sugiere que el rotavirus interactúa secuencialmente con varias moléculas de la superficie celular antes de entrar en ella y para ello utiliza diferentes dominios de las proteínas VP4 y VP7. Las proteínas celulares involucradas en la entrada de rotavirus a la célula son: un receptor que contiene ácido siálico, probablemente un gangliósido; las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha x\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ y la proteína hsc70 (López & Arias, 2004). Después de unirse a la célula, el rotavirus se internaliza y pierde la capa externa. Este evento activa la transcripción viral (transcripción primaria). Los transcritos que se producen son utilizados para la síntesis de proteínas virales y

RNA_{dc} que formará el genoma de la progenie viral. Los RNA_m virales pueden traducirse en ribosomas libres (para la mayoría de las proteínas) o asociadas al RER para las proteínas NSP4 y VP7 (Estes & Cohen, 1989, López, 2003).

La replicación del virus y los primeros pasos de la morfogénesis viral se llevan a cabo en los viroplasmatas. En los viroplasmatas las proteínas virales y el RNA_m viral interactúan para formar intermediarios de replicación (RI) (Estes & Cohen, 1989, López, 2003). Se ha propuesto que los intermediarios de replicación se forman a partir de un complejo inicial denominado precoreRI, este complejo se compone de VP1 y VP3 y carece de actividad de replicación. A partir del precoreRI se ensambla el complejo coreRI que incluye las proteínas VP1, VP2, VP3, NSP2 y NSP5, este complejo tiene actividad de replicación. Por último, la adición de VP6 al coreRI da origen al complejo VP6RI, a partir del cual se originan las partículas de doble capa (DLP's, del inglés; double-layered particles) (Estes & Cohen, 1989, Lopez, 2003). La última etapa de la morfogénesis viral se lleva a cabo en el RER, en un proceso en el que las DLP's geman de los viroplasmatas al RER, cuya membrana está modificada con las glicoproteínas virales NSP4 y VP7. Como resultado de la gemación, las partículas se envuelven en la membrana del RER formando partículas intermediarias. Luego por un mecanismo aún no completamente dilucidado, las DLP's pierden la envoltura de lípidos y la proteína NSP4, pero retienen a las proteínas VP4 y VP7 que se ensamblan formando la tercera capa proteica, dando lugar a los virus maduros compuestos de tres capas (TLP's, del inglés; triple layered particles). Experimentos donde se ha utilizado la técnica de RNAi han mostrado que la pérdida de la membrana es un proceso dependiente de VP7 (López *et al.*, 2005), además se ha observado que VP4 no se requiere para el ensamble de VP7 durante la morfogénesis, ya que en su ausencia se forman partículas de tres capas sin espículas ("spikeless" TLP's); sin embargo, esta proteína es esencial para la infectividad del virus (Dector *et al.*, 2002). Finalmente, los viriones se acumulan en el lumen del RER hasta ser liberados por lisis celular, favorecida por alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática de la célula infectada (López, 2003, López *et al.*, 2005).

1.5 Patología

Los rotavirus infectan a las células apicales(enterocitos) de las vellosidades del intestino delgado, causando la muerte celular y su desescamación, las lesiones resultantes varían dependiendo de la especie y de la edad del animal infectado. Por ejemplo, los rotavirus porcinos causan una gran cantidad de daño tisular, mientras que en los murinos la destrucción es más selectiva. En la infección de especies jóvenes se produce mayor destrucción celular que en la infección en adultos. El despuntamiento de los vellos intestinales y la vacuolación de los enterocitos puede ser observada a pocas horas de la infección, antes de que sea detectable el antígeno viral. En la mayoría de las especies la producción del antígeno viral en el intestino puede ser observada entre las 48 y las 72 horas postinfección y una vez resuelta la infección, la

morfología celular regresa a su normalidad en alrededor de 5-7 días (Shaw *et al.*, 1999, Osborne *et al.*, 1998).

La necrosis de los ápices de las vellosidades intestinales reduce la digestión causando diarrea debido a una mala absorción de carbohidratos, provocando atrofia y diarrea osmótica secundaria, induciendo la hiperplasia de las células crípticas y el aumento de secreciones. La proteína NSP4 ha sido asociada a la inducción de diarrea, debido a los efectos de enterotoxina observados al ser administrada exógenamente (Gray & Desselberg, 2000, Shaw *et al.*, 1999, Clark *et al.*, 2000, Estes, 1996).

1.6 Generalidades de la respuesta inmune

1.6.1 El Sistema Inmune

El sistema inmune es una red compleja de células y órganos especializados que defiende al cuerpo de ataques por patógenos. Este lo hace a través de búsqueda y destrucción de moléculas extrañas a medida que éstas invaden el cuerpo.

El sistema inmune se encuentra distribuido por todos los órganos y fluidos de nuestro cuerpo, concentrándose en órganos especializados como; la médula ósea y el timo (que son lugares donde se producen los linfocitos B y T), los vasos linfáticos (que son la ruta de vuelta a la sangre de los líquidos intersticiales), los ganglios linfáticos (donde se producen las interacciones principales entre las células encargadas de iniciar una respuesta inmunitaria), el bazo (que es también un sitio de encuentro para células y antígenos que viajan por la sangre) y el hígado (que produce proteínas importantes durante la respuesta inmune y es un órgano hematopoyético al inicio de nuestra vida fetal) (Abbas *et al.*, 2002). Las células y moléculas del sistema inmune llegan a los tejidos por el torrente sanguíneo y regresan a la circulación por el sistema linfático. Esto lo logran por su capacidad de atravesar las paredes de los capilares y dirigirse a los sitios donde se les requiere.

Las células que constituyen el sistema inmune inician su diferenciación en la médula ósea. Este proceso se denomina hematopoyesis y a través de éste se generan todos los componentes celulares a partir de una célula madre pluripotencial. La diferenciación celular consiste de dos grandes ramas: la rama mieloide y la rama linfoide.

La rama mieloide da lugar a eritrocitos, plaquetas, basófilos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos. Mientras que la rama linfoide da lugar a linfocitos B, T y células asesinas naturales (NK). La respuesta inmune en vertebrados se divide en inmunidad innata y adquirida.

a) Respuesta Inmune Innata

Las características de la inmunidad innata se limitan a la capacidad de discriminar un microorganismo de otro en base a su naturaleza estereotípica, es decir, que la respuesta del sistema inmune sólo descarta tipos de microorganismos, p. ej., entre una bacteria gram negativa o gram positiva no distingue subtipos; y su función es muy parecida frente a la mayoría de los agentes infecciosos (Du Pasquier, 1992). Algunos de los elementos de la inmunidad innata son : 1) Barreras físicas y químicas, como epitelios y sustancias microbicidas producidas en la superficie epitelial; 2) Proteínas sanguíneas que incluyen miembros del complemento y otros mediadores de la inflamación y 3) Células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) y otros leucocitos, (Abbas, *et al.*, 2002).

Es importante notar que la inmunidad adaptativa no es independiente de la inmunidad innata. Las células fagocíticas son cruciales para efectuar una respuesta inmune adaptativa, tanto por el contacto a través de receptores como por la secreción de factores solubles. Debido a esto los macrófagos responden a microorganismos como una reacción de inmunidad innata, pero también sirven para disparar la respuesta de linfocitos específicos frente a un microorganismo. Por otro lado, algunos factores solubles que se producen durante la respuesta específica, son necesarios para incrementar la actividad de células mononucleares (Sompayrac, 2000), como son los anticuerpos opsonizantes, el INF- γ y otras citocinas.

1) Macrófagos

Dentro del sistema inmune, el sistema fagocítico mononuclear, que es el principal componente celular de la inmunidad innata, tiene la función principal de fagocitar a partículas extrañas al organismo, así como microorganismos que pueden resultar patógenos, tanto para su eliminación inmediata como para generar respuestas de activación de la inmunidad adquirida (Fearon & Locksley, 1996).

Las células del sistema fagocítico mononuclear se originan en la médula ósea, desde donde migran a diferentes tejidos y órganos. Los macrófagos pueden estar en tres estados principalmente:

1. En tejidos, los macrófagos se encuentran usualmente vagando y proliferando lentamente. En este estado de reposo, su función principal es de colector de desechos. Sensando todo lo que hay a su alrededor y dejando los tejidos libres de moléculas innecesarias (Sompayrac, 2000).
2. Después de que los macrófagos en estado de reposo reciben señales que lo alertan sobre el hecho que las barreras de defensa (piel o mucosas) han sido penetradas y existe la posibilidad de que se encuentren patógenos en el área, entran en una etapa a la que se conoce como activación. En este estado los macrófagos son capaces de ingerir grandes moléculas y además expresan en la superficie de membrana moléculas de complejo principal de

histocompatibilidad clase II (MHC II) (Sompayrac, 2000). El macrófago en el estado activado es un buen presentador de antígeno y puede eliminar patógenos.

3. El último estadio que sufre el macrófago es el hiperactivo, en el cual estas células incrementan su tamaño y la velocidad de fagocitosis es mayor (Sompayrac, 2000). Cuando los macrófagos están hiperactivos secretan citocinas, como puede ser el factor de necrosis tumoral TNF- α e IL-1 β y además son capaces de producir moléculas reactivas de oxígeno (Sompayrac, 2000).

Para poder realizar su función como célula reguladora de la respuesta inmune, los macrófagos muestran en su superficie antígenos que pueden ser reconocidos por linfocitos antígeno-específico. Esta función del macrófago la convierte en una célula presentadora de antígeno.

La activación del macrófago es consecuencia de la transcripción aumentada o nueva de algunos genes. Por ejemplo, la activación de macrófagos humanos puede consistir en el aumento de expresión de la enzima dependiente de citocromo que cataliza la generación de especies reactivas de oxígeno (Sompayrac, 2000).

Se considera un macrófago activado si realiza una función cuantificable en un análisis específico, por ejemplo, la muerte de un microorganismo (Abbas *et al.*, 2002).

Los agentes que originan la transcripción génica y por lo tanto la activación del macrófago, son citocinas solubles o pueden ser productos bacterianos, como los lipopolisacáridos (LPS), y moléculas de la matriz extracelular. En la fase efectora de algunas respuestas inmunitarias mediadas por células, los linfocitos T estimulados por el antígeno secretan citocinas que activan los macrófagos, en particular las células T tipo T1 (TH1) (Goldsby *et al.*, 2001). Uno de los más potentes activadores de macrófagos es el INF- γ secretado por las células NK y T activadas. El INF- γ , no es la única citocina que puede activar a los macrófagos ya que también pueden ser activados por el contacto con las células T del sistema inmune específico (Goldsby *et al.*, 2001).

En la mayoría de las situaciones los macrófagos activados adquieren funciones microbicidas y secretan citocinas pro-inflamatorias. Esta respuesta culmina en una respuesta inflamatoria y la atracción de células del sistema inmune, con la subsecuente eliminación del agente agresor (Schroder *et al.*, 2004).

Por otro lado, los macrófagos producen citocinas que estimulan la proliferación y diferenciación de linfocitos T. Por ejemplo, la IL-12 es especialmente importante para el desarrollo de la inmunidad mediada por células (Fearon & Locksley, 1996).

Para la eliminación de los agentes extraños y las células en apoptosis los macrófagos realizan el proceso de fagocitosis. Además pueden activar la respuesta inmune adquirida (Aderem *et al.*, 1999). El proceso de fagocitosis consiste en 3 pasos: 1) La unión, 2) la internalización y 3) la destrucción (Ravinovich, 1967). La interacción entre receptores y ligandos detona una respuesta fagocítica, la cual conduce a la formación de pseudópodos sobre la superficie de la partícula que pueden ser factores séricos como inmunoglobulinas y factores de complemento (a los que

llaman opsoninas), o componentes estructurales de la superficie de la partícula, para los cuales el macrófago posee receptores (Greenberg & Silverstein, 1993). Una vez que una partícula extraña ha sido fagocitada, los lisosomas y otras vesículas entran en contacto con el fagosoma y sus membranas, lo que da como resultado la formación del fagolisosoma. En esta nueva estructura son liberadas nuevas enzimas y sustancias bactericidas, por lo que el fagolisosoma se transforma en una vesícula digestiva que inicia inmediatamente la digestión de la partícula fagocitada. Los macrófagos tienen enzimas proteolíticas especialmente dispuestas para digerir bacterias y otras materias proteicas extrañas. Los macrófagos también contienen grandes cantidades de lipasa que digieren las espesas membranas lipídicas que rodean algunas bacterias. Además de la digestión lisosómica de bacterias ingeridas en los fagosomas, éstos también contienen agentes bactericidas que detienen el crecimiento, como son lactoferrina, que capta el hierro necesario para las bacterias o algunas proteínas que provocan la lisis de la membrana.

Entre los principales mecanismos bactericidas que posee el macrófago se encuentra la disminución del pH del fagosoma y la generación de una gran cantidad de agentes oxidantes, principalmente derivados del oxígeno y del óxido nítrico, con efectos mortales para la mayoría de los patógenos, aún cuando son producidos en cantidades muy pequeñas (Sompayrac, 2000, Schwarzer *et al.*, 2004).

Los macrófagos activados son una gran fuente de citocinas proinflamatorias, radicales tóxicos y mediadores lipídicos de la inflamación, lo cual puede conducir a estados patológicos. Por esta razón, la activación de los macrófagos debe de ser perfectamente regulada. La IL-10 y el factor de crecimiento transformante (TGF- β), son 2 citocinas que tienen un papel crucial disminuyendo la activación del macrófago. Estas 2 citocinas pueden ser secretadas por el mismo macrófago o linfocito T (Mosser, 2003).

Para que un macrófago produzca IL-10 es necesario que los receptores Fc γ R sean ligados por inmunocomplejos, pero además se requiere de otras señales, como son la activación a través de CD40 y CD44, en respuesta a estas señales el macrófago participará activamente en una respuesta antiinflamatoria, principalmente con la secreción de IL-10 (Mosser, 2003). Es interesante notar que la IL-4, posee la capacidad de activar la respuesta antiinflamatoria del macrófago, también inhibe la secreción de INF- γ , lo mismo que la IL-10 y el TFG- β (Schroder *et al.*, 2004).

2) Células Dendríticas

Paul Langerhans en 1868, fue el primero en hacer la visualización de las CD, sin embargo fue hasta comienzos de los 70's cuando Steinman y cols. describieron una nueva población celular en los órganos linfoides periféricos de ratón, siendo los primeros en denominar a estas células como CD (Steinman & Chon, 1973).

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

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

Las CD inmaduras pueden fagocitar eficientemente bacterias, levaduras y otros parásitos. Los antígenos internalizados son procesados por la vía endosomal lisosomal y posteriormente redistribuidos a la superficie de las células como péptidos asociados a la molécula MHC II ó alternativamente como péptidos asociados al MHC I derivados de proteínas citosólicas endógenas de antígenos tumorales o virales (Guermonprez *et al.*, 2002). Las CD inmaduras están adaptadas para endocitosis, expresando bajos niveles de moléculas MHC clase I y II y moléculas co-estimuladoras como CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) y CD40; después de detectar al patógeno o citocinas pro-inflamatorias las CD inmaduras se transforman en células maduras con capacidad reducida para captar el antígeno (Banchereau *et al.*, 2000), pero con una capacidad excepcional para estimular células T a través del incremento de las moléculas MHC cargadas con péptido antigénico en la superficie celular (Mellman & Steinman 2001). Además presentan otras características como mayor expresión de moléculas co-estimuladoras en la membrana celular, liberación de citocinas o quimiocinas y cambio en la morfología al extender largas dendritas que pueden incrementar la oportunidad para capturar e interactuar con células T a través de los ligandos CD28 para B7-1 y 2 y CD154 (CD40L) para CD40 (Mellman & Steinman 2001; Banchereau *et al.*, 2000). La señal de unión de las moléculas MHC-péptido de las CD con los TCR de las células T (señal 1) no es suficiente para activarlas, señales adicionales son proveídas por las moléculas co-estimuladoras (señal 2) y citocinas (señal 3). Además, la interacción de las CD con células T está mediada por algunas moléculas de adhesión, como las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ y miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (CD2, CD50, CD54 y CD58) (Banchereau *et al.*, 2000).

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

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

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

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

Aunque inicialmente la clasificación como linfoide y mieloide de las CD fue hecha con base en la expresión de la molécula CD8 α . Weissman y colaboradores (2000) demostraron, a través de ensayos de reconstrucción de CD, que tanto un progenitor linfoide como un progenitor mieloide podían diferenciarse en CD CD8 $^{+}$, CD8 $^{-}$ y CDP (Traver *et al.*, 2000). Asimismo, Martínez del Hoyo (2002) demostró que un precursor común CD11c $^{+}$, MHC II $^{-}$ presente en la sangre del ratón es capaz de generar CD CD8 $^{+}$, CD8 $^{-}$ y CDP después de transferir CD a ratones irradiados. Otros reportes afirman que la molécula CD8 α es un marcador de maduración más que un marcador de linaje linfoide (Moron *et al.*, 2002; Rescigno, 2002). Esto sugiere la existencia de un modelo más plástico en la diferenciación de las CD.

3) TLR's

Los TLRs (receptores tipo Toll) son conocidos como receptores esenciales de la inmunidad innata en mamíferos, plantas e insectos. Pertenecen a los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR, del inglés "patogen recognition receptors") y son codificados en la línea germinal (Akira *et al.*, 2001, Akira, & Takeda, 2004). Reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs del inglés "Pathogen Associated Molecular Patterns"). Estos PAMPs tienen tres características comunes que los hacen blanco para el reconocimiento inmune innato: 1) son producidos sólo por microorganismos y no por las células del huésped, 2) son invariantes entre microorganismos de una clase dada y 3) son esenciales para la sobrevivencia microbiana (Medzhitov, 2001).

Los TLRs son glicoproteínas integrales de membrana tipo 1. Con base en su región citoplasmática estos receptores se han clasificado dentro de una gran superfamilia que incluye al receptor para IL-1. Sin embargo, su región extracelular difiere, los TLRs contienen repeticiones ricas en Leucina, mientras que la región extracelular del receptor para IL-1 contiene tres dominios tipo Inmunoglobulina (Akira & Takeda, 2004). El gen Toll fue identificado primero en *Drosophila*, observando que las mutaciones en Toll producían un desarrollo embrionario dorso-ventral anormal (Hashimoto *et al.*, 1988). Estudios posteriores demostraron que Toll era importante en la defensa de *Drosophila* contra hongos, debido a que los mutantes de Toll eran susceptibles a infecciones por estos microorganismos (Lemaitre *et al.*, 1996). Trabajos subsecuentes revelaron la presencia de una familia de homólogos de Toll en mamíferos, que fueron denominados TLRs (Medzhitov *et al.*, 1997). Hay al menos 12 TLRs conocidos en el ratón; de los cuales al menos 11 son expresados en humanos siendo TLR 1-9 conservados entre las dos especies, aunque TLR10 es funcional sólo en el humano (Finberg & Kurt-Jones, 2004, Bowie & Haga, 2005; Takeda & Akira, 2005).

Hasta el momento se han descrito 13 TLRs en mamíferos que reconocen diferentes PAMPs, entre ellos TLR2 reconoce componentes de bacterias Gram positivas como peptidoglicanos y lipopéptidos, TLR4 reconoce al lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas, TLR5 que reconoce a la flagelina derivada de bacterias Gram-negativas (Akira, 2003). Estos receptores están presentes en la superficie celular de monocitos, células polimorfonucleares, CD y células B (Muzio, 2000). TLR9 es esencial para reconocer al DNA bacteriano conteniendo dinucleótidos CpG no metilados, TLR7 reconoce algunos tipos de imidazoquinolinas y TLR3 que reconoce RNAdc (Alexopoulou *et al.*, 2001) y se expresa principalmente en los endosomas de células epiteliales, macrófagos y CD. Cuando los TLR enlazan su ligando se genera una cascada de señalización que termina en la activación de los factores NF- κ B y AP1, que inducen la expresión de genes para la síntesis de citocinas proinflamatorias como IL-12, e IL-6, y en CD y

macrófagos incremento de las moléculas del MHC clase I y II, y de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86. (Akira, 2001).

b) Respuesta Inmune Adaptativa

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

La respuesta de la inmunidad específica tiene cuatro características importantes:

- Especificidad antigénica alta
- Diversidad
- Memoria inmunológica
- Reconocimiento de lo propio y lo no propio

La especificidad antigénica del sistema inmune permite distinguir pequeñas diferencias entre antígenos, por ejemplo, los anticuerpos son capaces de distinguir entre dos proteínas que sólo difieren en un aminoácido (Du Pasquier, 1992). El sistema inmune adaptativo, tiene una diversidad mayor que el innato, ya que sólo puede restablecer una respuesta contra un antígeno específico, no solamente con un tipo de célula, sino que cuenta con diferentes tipos celulares, además de proteínas como las inmunoglobulinas (Fearon & Locksley, 1996). Cuando el sistema inmune ha tenido contacto con un antígeno que es reconocido como extraño y ha tenido una respuesta contra éste, las células B y T, generan memoria hacia ese antígeno, ante al que, en una segunda exposición, el organismo reaccionará con mayor eficacia y rapidez (Sompayrac, 2000), característica conocida como memoria inmunológica.

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

El receptor de la célula T está constituido por dos cadenas unidas entre sí por puentes disulfuro, insertadas en la membrana celular con un dominio citoplasmático muy corto que se asocia a un

complejo proteínico denominado CD3. El complejo CD3 está conformado por tres proteínas homólogas insertadas en la membrana celular (γ , δ y ϵ) y a un homodímero de cadenas ζ . CD3 y ζ contienen dominios citoplasmáticos que dan inicio a la transducción de señales hacia el núcleo. El TCR sólo reconoce antígenos que estén combinados tanto con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I ó clase II en la superficie de CPA. Las principales poblaciones de células T son los linfocitos Th y Tc. Las células Th expresan la glicoproteína de membrana CD4, a través de su TCR reconocen péptidos de 14 a 25 aminoácidos derivados de la degradación de proteínas exógenas por CPA) unidos a MHC II en la membrana celular (Trombetta & Mellman, 2005). La activación de las células Th es esencial para la proliferación y diferenciación de las células Tc y células B a través de la secreción de citocinas e interacciones celulares. Las células Tc expresan la molécula CD8 y a través de su TCR reconocen péptidos de 8 a 10 aminoácidos producidos por la degradación de proteínas antigénicas en el citosol de CPA, asociados a las moléculas MHC I. La principal función de estas células es el reconocimiento y eliminación de células tumorales o células infectadas por patógenos intracelulares a través de citotoxicidad directa. La citotoxicidad puede ser mediada por perforina (que es capaz de formar poros en la membrana) y granzima (que penetra a la célula diana por los poros formados y es capaz de activar caspasas) o bien por inducción de apoptosis a través de la molécula Fas en la membrana celular. Las células Tc secretan proteínas antivirales y promotoras de la presentación de antígeno como el interferón gama ($\text{INF}\gamma$) y el factor de necrosis tumoral (TNF).

Las citocinas juegan un papel importante en la respuesta inmune, por lo que una vez que las células T han sido activadas, secretan citocinas. Las citocinas son factores solubles que modulan la actividad celular de proliferación, diferenciación y comunicación con otras células. Las citocinas están estrictamente reguladas, y se producen en pequeñas cantidades en respuesta a un estímulo determinado.

La primer citocina producida por las células T es la interleucina-2 (IL-2) la cual hace que las células salgan de la fase G_0 , entren y progresen en el ciclo celular. Posteriormente, en función de las interacciones específicas entre moléculas coestimuladoras entre linfocitos T, APC y de las citocinas presentes en el medio, secretadas por las APC, los linfocitos empiezan su diferenciación celular que se puede seguir por la síntesis de patrones de citocinas específicas, que modifican la acción de las células que van a eliminar el antígeno. Por esta razón se les denomina citocinas efectoras. Se han descrito tres principales patrones de citocinas, las cuales se clasifican en Tipo Uno, Tipo Dos y Tipo Tres.

Las poblaciones de células **Tipo Uno (T1)**: se caracterizan por la producción $\text{INF-}\gamma$, el cual tiene un efecto inductor sobre los fagocitos mononucleares activados que producen IL-12, que es la principal citocina inductora T1 y son responsables de la inmunidad mediada por células. Este tipo de respuesta permite la erradicación de patógenos intracelulares tales como virus, bacterias y protozoarios, a través de la activación de macrófagos y células T citotóxicas. Se han visto involucradas en enfermedades autoinmunes y en casos de inflamación crónica.

Las subpoblaciones **Tipo Dos (T2)**: secretan las citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, que promueven la inmunidad humoral, a través de la maduración de las células B y la desgranulación de células cebadas y eosinófilos. Estas células están implicadas en la patogénesis del asma y las alergias. Son responsables de la defensa frente a infecciones por helmintos, artrópodos, bacterias extracelulares y alérgenos ambientales.

La subpoblación **Tipo Tres (T3)**: tiene como citocina característica $\text{TGF-}\beta$, aunque en ocasiones se ha visto que también es capaz de producir IL-10, IL-4, o ambas. $\text{TGF-}\beta$ es secretado por plaquetas, macrófagos y los linfocitos. $\text{TGF-}\beta$ e IL-4 pueden inhibir las respuestas inmunitarias, y las células que secretan grandes cantidades de estas citocinas pueden actuar como células supresoras (Abbas *et al.*, 2002).

1.8 Respuesta Inmune en la infección por rotavirus

a) Respuesta Inmune Innata en la infección por rotavirus:

Rotavirus provoca una infección aguda y de rápida resolución, por lo que muy probablemente el sistema inmune innato intestinal está jugando un papel importante en la contención de la infección y en la generación de una respuesta inmune adquirida eficiente. Los macrófagos y las CD son las principales Células Presentadoras de Antígeno (CPA), por lo que podrían ser las primeras células involucradas en sensar la presencia de patógenos en el intestino. Sin embargo la participación de los componentes de la respuesta innata ha sido poco estudiada en la infección por rotavirus en el modelo de ratón. Aunque se sabe que éste es el mejor modelo de estudio en la infección por rotavirus. Debido a que tanto el ratón adulto como el neonato son susceptibles a la infección por rotavirus murinos o de otras especies (heterólogos). Sin embargo, (al igual que en el humano) sólo en neonatos se observa diarrea. En ratones adultos la infección es asintomática, por lo que el parámetro principal de infección es la cantidad de virus excretado en las heces (Ward *et al.*, 1990; Burns *et al.*, 1995).

Recientemente se ha demostrado que ratones deficientes en STAT-1, (un componente

indispensable para las respuestas inducidas por IFN tipo I y II), presentan títulos virales 100 veces más elevados que a los ratones control (Vancott *et al.*, 2003). En estos ratones se observó replicación viral extraintestinal, lo que sugiere que los IFN podrían estar participando en la contención de la infección al intestino. Las fuentes de esta citocina podrían ser los macrófagos, las CD o bien los linfocitos intraepiteliales, favoreciendo el inicio de la respuesta inmune y el bloqueo de la producción de partículas virales.

b) Respuesta inmune adaptativa contra rotavirus

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

También se demostró que ratones knockout del TCR $\alpha\beta$ y ratones Nude (atímicos) resolvieron la infección primaria contra rotavirus y desarrollaron anticuerpos IgA intestinales rotavirus específicos. Esto sugiere que las células T son importantes pero no esenciales para el desarrollo de anticuerpos IgA específicos contra rotavirus (Franco & Greenberg 1997). Cuando los ratones knockout del TCR $\alpha\beta$ (-/-) fueron desafiados 8 semanas después de la infección primaria, éstos fueron resistentes a la reinfección, sugiriendo que una respuesta de anticuerpos timo independiente (TI) y un mecanismo innato pueden contribuir a la inmunidad contra rotavirus

murino. En ratones normales esta respuesta corresponde aproximadamente al 20 % del total de IgA, siendo el 80 % restante resultado de inmunidad dependiente de células T.

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

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

En el modelo de ratón, los linfocitos Tc participan de manera importante en la limpieza de la infección primaria por rotavirus. Son esenciales para la pronta resolución de la infección, pero no indispensables para llevar a cabo este proceso, ni para la inducción de protección a una respuesta secundaria (Franco & Greenberg, 1997, Franco & Greenberg, 1999).

Dharakul y colaboradores (1990) encontraron que la presencia de rotavirus en heces fue abatida en ratones SCID, después de la transferencia pasiva de linfocitos Tc de ratones inmunocompetentes previamente inoculados con proteínas recombinantes producidas en baculovirus VP7, VP6, VP4 y VP1 de rotavirus. Además, cuando las células Tc fueron cotransferidas con células Th específicas contra rotavirus, la resolución de la enfermedad se llevó a cabo de manera más eficiente (McNeal *et al.*, 1997). Así también, se demostró que las células Th específicas contra rotavirus pueden ejercer una función protectora directa cuando son transferidas en ratones SCID con infección crónica. Más aún, se demostró que los linfocitos

Tc generados por ratones inoculados oralmente con rotavirus presentan una mejor reactividad cruzada con células blanco infectadas con vaccinia recombinante que expresa la proteína de cápside externa VP7 que aquellas que expresan las proteínas VP4 o VP6 (Offit *et al.*, 1994). Asimismo, se ha demostrado la existencia de epítopes específicos para linfocitos Tc en la proteína VP7 que sobrelapan con las secuencias señal H1 y H2 para la traslocación al RER (Franco *et al.*, 1993, Buesa *et al.*, 1999).

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

II. ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente, el sistema inmune innato reconoce PAMP's los cuales son esenciales para el reconocimiento de componentes microbianos y la activación del sistema inmune (Luster, 2002). En mamíferos los TLR's son ahora reconocidos como receptores primordiales del sistema inmune innato mediante la inducción de genes involucrados en la actividad antimicrobiana y en la maduración de las CPA's (Banchereau & Steinman, 1998). Hasta el momento se han identificado 13 TLR's en mamíferos, expresándose 11 TLR's en humano y 12 en ratón con funciones muy similares; sin embargo, su localización y los PAMPs que reconocen difieren; por ejemplo, TLR2 y TLR4 localizados en la superficie celular pueden reconocer lipopolisacáridos bacterianos y glicoproteínas virales, mientras que TLR9, TLR8, TLR7 y TLR3 se encuentran intracelularmente (en endosomas) y pueden detectar material genético bacteriano ó viral libre, con lo cual inducen la expresión de genes antimicrobianos (Bowie & Haga, 2005).

En respuesta a patógenos y señales de peligro, representadas por PAMPs, los TLRs inician una cascada de señalización intracelular que culmina con la maduración de las CPA's; por ejemplo, TLR3 y TLR4 culmina en la síntesis de $INF\alpha$ citocina importante en la inducción de maduración de CD (Bancherau & Steinmam, 1998) y con la inducción de genes involucrados en actividades anti-microbianas, como es la producción de NO en macrófagos, CD, epiteliales, nerviosas, endoteliales e inflamatorias. Sin embargo, en los macrófagos es donde más se ha estudiado. Los macrófagos adquieren diferentes receptores y capacidades que les permite fagocitar, secretar citocinas y presentan Ag, pero son más eficientes cuando se encuentran activados.

La producción de NO es una característica de las células del sistema inmune y se genera en respuesta a estímulos infecciosos y es llevada a cabo por la enzima sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) (Nathan & Xie, 1994), la cual genera NO a partir del aminoácido L-arginina. La expresión de esta enzima es modulada por citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 e $INF\gamma$ (Natthan, 1992, Nathan & Xie, 1994). Existen tres formas de NOS, 2 denominadas constitutivas y dependientes del calcio (cNOS), que son la endotelial y la neuronal, las cuales sintetizan NO en condiciones normales, y una inducible e independiente del calcio (iNOS), que no se expresa o lo hace muy

débilmente en condiciones fisiológicas. En muchos casos la expresión de esta isoforma iNOS es inducida por estímulos inmunológicos o inflamatorios por lo que es dependiente de lipopolisacáridos (endotoxinas) y citocinas proinflamatorias (Salter *et al.*, 1991). La isoforma iNOS ha sido detectada en hepatocitos, células tumorales, neutrófilos, células plasmáticas, linfocitos, células mensajales, células endoteliales, dendríticas y células musculares lisas de la pared vascular (Wright, *et al.*, 1989, Moncada, *et al.*, 1991). También ha sido localizada en el citosol de los macrófagos purificados y activados de ratón, mostrando una conformación dimérica y una masa molecular de 135 kDa. En el mecanismo del NO en la inflamación, la NOS en los macrófagos no es constitutiva, sino inducida cuando estas células son activadas por citocinas; por ejemplo $INF\gamma$ u otros agentes, y no requiere el incremento en la concentración intracelular del Ca^{++} (Lowenstein, *et al.*, 1993).

Como se mencionó anteriormente existe una amplia gama de procesos biológicos en los que el NO puede estar implicado. Estos procesos incluyen diferentes mecanismos de activación de los factores de transcripción, la translocación de los RNAm, el metabolismo del hierro, la mutagénesis, la apoptosis, la glicólisis y el transporte de electrones mitocondriales, la fusión de mioblastos, la adhesión de las plaquetas y los neutrófilos. La producción incontrolada de NO por parte del macrófago en el caso de shock séptico puede producir vasodilatación periférica extrema con la consiguiente hipotensión que lleva al shock, a su vez el NO también ha sido involucrado en diversas enfermedades inflamatorias (Moncada *et al.*, 1991).

Se sabe que la inhibición de la iNOS en los ratones los hace susceptibles a infecciones y muestran una pobre función defensiva de los macrófagos contra los parásitos y las células tumorales (Griscavage *et al.*, 1993, Stuehr *et al.*, 1991). El NO, por lo tanto, puede actuar como protector o dañino en función de las diferentes circunstancias.

Debido a que la infección por rotavirus es de rápida resolución, se plantea que la inmunidad innata puede estar participando de manera importante en la contención de la infección y en el establecimiento de una respuesta inmune adaptativa adecuada. En el modelo de ratón la participación de los componentes de la respuesta innata ha sido poco estudiada. Se ha demostrado que los ratones deficientes en STAT-1, (un componente indispensable para las respuestas inducidas por IFN tipo I y II), presentan títulos virales muy superiores a los ratones control (Vancott *et al.*, 2003). En estos ratones se observó replicación viral extraintestinal, lo que sugiere que los IFN podrían

estar participando en la contención de la infección al intestino. Las fuentes de esta citocina podrían ser macrófagos, células dendríticas o bien linfocitos intraepiteliales, favoreciendo el inicio de la respuesta inmune y el bloqueo de la producción de partículas virales. Otros experimentos han demostrado que la activación de células B se debe a la glicoproteína viral VP7, por lo que se propuso que esta activación podría ser a través del TLR4 como ocurre con otras proteínas virales (Blutt *et al* 2004^a; Blatt *et al.*, 2004^b). Experimentos realizados por Matsumoto y *Colis* (Matsumoto *et al.*, 2003) demostraron que el genoma de rotavirus (RNA_{dc}) activaba fibroblastos y CD humanas a través del TLR-3, lo cual sugería que el TLR-3 podría estar involucrado en la respuesta inmune innata contra rotavirus.

Se ha reportado que el TLR-3 se expresa en varias extirpes celulares como las CD, macrófagos, fibroblastos y células epiteliales intestinales. TLR3 en los macrófagos reconoce RNA_{dc} y traduce señales para activar NF- κ b y el promotor del IFN- β . (Alexopoulou *et al.*, 2001). En humanos, los fibroblastos expresan TLR3 en la superficie celular y las CDi expresaron TLR3 intracelularmente, produciendo INF- α/β y IL-12p70 en respuesta a Poli I:C (Matsumoto *et al.*, 2003). En el caso de las células epiteliales de intestino recientemente se demostró que responden a Poli I:C activando la expresión de genes que promueven el reclutamiento de células y su activación (Kumar *et al.*, 2005).

III. JUSTIFICACIÓN

En la resolución de la infección por el rotavirus en el intestino, la respuesta inmune innata puede estar jugando un papel preponderante, por lo que un mejor entendimiento de la participación de la inmunidad innata, en particular de las células de la respuesta inmune innata como CD, macrófagos y células epiteliales permitirá contar con más herramientas que permitan favorecer el control de la enfermedad.

Como se expuso anteriormente, los TLR's son fundamentales en el inicio de las respuesta inmune contra patógenos. El descubrimiento de que el TLR3 reconoce RNAdc, lo hace un blanco de análisis obvio en la respuesta inmune contra el rotavirus, ya que el rotavirus es un virus con un genoma segmentado de RNAdc. Por lo que, en este trabajo nos propusimos determinar si el RNAdc de rotavirus activa CPA's, como las CD, los macrófagos, y una línea celular de enterocitos en un modelo *in vitro*, para en un futuro definir si esta activación depende de TLR-3.

IV. HIPOTESIS

El RNAdc de rotavirus participa en la activación inicial de células de la respuesta inmune innata muy probablemente a través del TLR3 en un modelo *in vitro*.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar si el genoma del rotavirus, compuesto por 11 segmentos de RNAdc, contribuye a la estimulación de células de la respuesta inmune innata en un modelo de ratón *in vitro*.

5.2 Objetivos particulares

1. Analizar la secreción de Óxido Nítrico como parámetro de la activación de los macrófagos, las células dendríticas derivadas de médula ósea y la línea celular epitelial MODE-k.
2. Evaluar la activación de las CD, los macrófagos y las células epiteliales inducida por el RNAdc del rotavirus a través del aumento de los niveles de superficie de CD40, así como la cuantificación del RNAm de las citocinas TNF- α , IL-12 e IL-10.
3. Determinar la presencia de RNAm de TLR-3 en las CD derivadas de médula ósea y macrófagos de ratones BALB/c.

Materiales y Métodos

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ratones

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

6.2 Medios de cultivo

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

RPMI⁻: RPMI 1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina y 2 gr de NaHCO₃, 5x10⁻⁵ M de 2-mercaptoetanol, 10 mM de Hepes, 40 µg/ml de gentamicina por litro.

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

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

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

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

6.3 Líneas celulares

MA-104: Células epiteliales de riñón fetal de mono Rhesus (Macaco mulatta)(Suceptibles a la infección por rotavirus) . Se cultivaron en medio de cultivo DMEM⁺ .

Mode-k: Células epiteliales transformadas de intestino de ratón neonato C3H/He(H-2^k) de 15 días de nacidos (Vidal, et al, 1993). Se cultivaron en medio RPMI⁺ .

CHO: Células de ovario de hamster chino (*Cricetulus griseus*). CHO transfectadas con el plásmido que contiene el gen que codifica para GM-CSF de ratón y un gen de resistencia a geneticina (Estas células fueron amablemente donadas por la Dra. Laura Bonifaz del Dpto. de enfermedades autoinmunes del Hospital Siglo XXI, IMSS) (Zal, et al., 1994). Se cultivaron en medio RPMI⁺ .

6.4 Virus

Se usó la cepa de rotavirus de mono Rhesus RRV (Sa/G3P11, SGII). Se propagó *in vitro* en la línea celular MA-104 en confluencia en frascos 162 cm². Las células se lavaron 2 veces con 6 ml de PBS (NaCl 137 Mm, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10.1 Mm, KH₂PO₄ 1.8Mm) posteriormente se infectaron con 3 ml de un lisado de células MA-104 infectadas con RRV conteniendo 1x10⁷ unidades formadoras de focos por mililitro (UFF) del virus, previamente tratado con 10 mg/ml de tripsina durante 30 minutos a 37 °C. Se agregó el virus activado al cultivo y se incubó a 37°C por 1hr para permitir que el virus se absorbiera. Posteriormente, se agregaron 27 ml de medio DMEM⁻ a cada frasco y se cultivaron por 24 hrs., a la misma temperatura hasta observar efecto citopático. Después se colectó el lisado de las células infectadas. La suspensión se congeló a –20°C y posteriormente se descongeló, repitiendo este procedimiento una vez más para romper las células y liberar las partículas virales. El lisado se alicuotó y se mantuvo a –20°C hasta su uso.

6.4.1 Determinación del rendimiento viral

Células MA-104 en confluencia en placas de cultivo de fondo plano de 96 pozos (Falcon) fueron infectadas por duplicado con 12 diluciones seriadas de lisados virales (RRV) activados con tripsina, comenzando con una dilución 1:8 (en un volumen de 50 µl). Se dejaron absorber los virus durante 1 hr. Posteriormente se retiró el medio rico en virus, las células se lavaron con 110 µl de PBS y se añadió 200 µl de DMEM⁻ a cada pozo. Las células se cultivaron por 14 hrs a 37°C y se revelaron por la técnica de inmunoperoxidasa. Todos los lavados subsecuentes se hicieron con 110 µl de PBS. Después de ese tiempo se retiró el medio y se lavaron las células 2 veces. A continuación, se agregó a cada pozo 110 µl de la solución PBS:acetona 1:4 dejando reposar la placa durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA) para fijar las células. En seguida se lavaron las células una vez y posteriormente se agregó a cada pozo 50 µl de una solución conteniendo el primer anticuerpo policlonal anti-RRV de conejo a una dilución 1:1500 en PBS. Se dejó reposar la placa por 1 hr a 37°C. En seguida las células se lavaron dos veces. Posteriormente se agregó 50 µl a cada pozo de una solución conteniendo proteína-A acoplada a peroxidasa (Amersham) a una dilución 1:2500 en PBS. Se incubó la placa por 2 hrs a 37°C y en seguida las células fueron nuevamente lavadas dos veces. A continuación se agregó 50 µl de buffer de revelado: (2 de carbazol: [4 mg/ml de dimetil formamida (SIGMA)], 8 ml de buffer de acetatos: [0.68 gr de acetato de sodio (SIGMA) en 100 ml de agua llevado a pH 5 con ácido acético (J.T. Backer)], 20 µl de peróxido de hidrógeno al 30 %) a cada pozo dejando reposar la placa por 10 minutos protegida de la luz. Posteriormente se retiró la solución de revelado y la placa se lavó una vez con agua bidestilada. Finalmente se contaron las UFF/ml (unidades formadoras de focos por mililitro) que son células ó grupos de células infectadas que se tiñeron de color café. Se obtuvieron los títulos virales a través de la fórmula: No de células X Dilución X

5.5 (superficie de conteo) X 20 (es la dilución que nos dará por ml), obteniendo la media del título viral de al menos tres diluciones.

6.4.2 Semipurificación de rotavirus por colchón de sacarosa

Lisado virales de células MA-104 infectadas con rotavirus fueron ultracentrifugados en tubos “ultra-claros” de 1 x 3.5 pulgadas (Beckman) a 25,000 rpm en un rotor SW 28 por 2 hrs/4 °C. El botón obtenido fue resuspendido en 6 ml de buffer TSC (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7.4) para evitar pérdida de la capa externa (VP7, VP4). Posteriormente, se adicionó un volumen igual de Freón y se agitó por 10 minutos manteniendo fría la solución. Luego se centrifugó a 6,000 rpm a 4 °C por 10 minutos, se separó la parte acuosa y a la parte orgánica se le añadió 6 ml de TSC repitiendo el procedimiento anterior dos veces más, cada vez recuperando la parte acuosa. El sobrenadante obtenido se ultracentrifugó en tubos “ultra-claros”, (Beckman) de 5ml a 40,000 rpm en el rotor SW50, durante 2 h a 4°C. El botón obtenido rico en virus fue resuspendido en 3.5 ml de TSC. En un nuevo tubo de 5 ml se agregó 1.5 ml sacarosa al 30% en TSC al cual fue añadidó 3.5 ml de la solución rica en virus. Se centrifugó por 2 h a 40,000 rpm en un rotor SW50 a 4°C. Finalmente el botón fue resuspendido en 1 ml de TSC y se preparó alicotas de 50 µl que se almacenaron a -70 C° hasta su uso.

6.4.3 Purificación de rotavirus por Cloruro de Cesio

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

KDa (Millipore). Finalmente se hicieron alícuotas de 50µl y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

6.4.4 Obtención de RNAdc de rotavirus

Lisados de células MA-104 infectadas con RRV, fueron ultracentrifugados a 20,000 rpm en un rotor SW28 a 4°C por 1 h. El botón que se obtuvo se resuspendió en 200µl de DMEM⁻ que se mezcló con 40µl de amortiguador disruptor 5X (Tris Base 2.6 M, EDTA 750 mM, SDS 450 Mm, NaCl 6.8 M, β-mercaptoetanol 1.8M). Se agregó 200µl de fenol saturado y se agitó en vortex durante 2 minutos. Pasado ese tiempo se adicionó 200µl de cloroformo, y se agitó nuevamente 2 minutos. Esta mezcla se centrifugó 5 minutos a 12,000 rpm en una microcentrifuga con un rotor Nr.12024H (Beckman); se recuperó el sobrenadante y se agregó 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 50 µl de acetato de sodio y se dejó precipitar toda la noche. Finalmente, se agitó con un vortex y se centrifugó 15 minutos a 12,000 rpm, se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 30 µl de solución salina libre de endotoxinas (0.9% NaCl) (PiSA). Las muestras se analizaron en geles nativos de acrilamida al 11%. La electroforesis se realiza durante 10 h a 200V. Al término de la corrida, el gel se colocó 30 minutos en solución fijadora (28.7% etanol, 0.3% ácido acético), posteriormente se colocó 30 minutos en una solución de nitrato de plata 11mM y se lavó 2 veces con agua destilada. Las bandas se observaron después de agregar la solución reveladora (NaOH 700mM, 0.8% formaldehído). Una vez que se hizo visible el patrón de bandas se retiró la solución reveladora y se detuvo la reacción con ácido acético al 10%.

6.5 Obtención de sobrenadante (SBN) rico en GM-CSF

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

centrifugado y filtrado a través de una membrana de 0.22µm (Millipore). Finalmente se hicieron alícuotas del SBN y se almacenaron a -20 C.

6.6 Obtención de médula ósea de ratón

Ratones BALB/c fueron sacrificados por dislocación cervical. Posteriormente, con ayuda de pinzas y tijeras estériles se obtuvieron tibias y fémures de cada extremidad cuidando no cortar los huesos, eliminando los restos del tejido con una gasa humedecida con PBS. Los huesos obtenidos se colectaron en 5 ml de RPMI⁻, posteriormente ya en condiciones estériles se colocaron por 2 minutos en 5 ml de etanol al 70 % y dos veces en 5 ml de RPMI⁻ para eliminar los restos de etanol. Después, empleando pinzas y tijeras estériles, se cortaron las epífisis de los huesos y con ayuda de jeringas de 10 ml con aguja de 27 G x 13 mm(Plastipack) se procedió a pasar 10ml de RPMI⁻ a través de la luz de los huesos para colectar la médula ósea en una caja petri de 100mm. En seguida las células fueron disgregadas por pipeteo vigoroso y lavadas una vez con RPMI⁻. Posteriormente, el botón celular fue resuspendido con Cloruro de Amonio 0.15M en medio de cultivo para eliminar los eritrocitos. La suspensión se dejó reposar por cinco minutos a TA, finalmente de esta se tomó una alícuota que fue mezclada con Azul de tripano 1:1 y se procedió a contar las células en una cámara de Neubauer multiplicando el número de células obtenidas por la dilución correspondiente.

6.6.1 Generación de CD a partir de células de médula ósea

Células de médula ósea fueron sembradas a una densidad de 0.5×10^6 células/ml en cajas petri de 100mm con 10 ml de RPMI⁺ suplementado con 15-20 % de sobrenadante rico en GM-CSF. Las células fueron cultivadas a 37° C en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % de humedad; el día de la siembra se tomó como día cero, al día 3 se alimentó el cultivo con 10 ml de RPMI⁺ suplementado con 15 -20 % de sobrenadante rico en GM-CS. Al día 6 las células en suspensión enriquecidas con CD inmaduras (CDi) fueron colectadas y utilizadas en los ensayos de estimulación. Para obtener un mayor enriquecimiento de CD en el cultivo las células fueron cultivadas hasta el día 10 alimentando el cultivo al día 6 y 8 para esto, la mitad del sobrenadante se colectó y centrifugó a 1,700 rpm en un rotor Nr.11133 (Beckman) por 7 minutos y el pellet celular colectado fue resuspendido en nuevo RPMI⁺ suplementado con 15 -20 % de sobrenadante rico en GM-CSF.

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

Las células de MO diferenciadas fueron colectadas al día 6 ó 10 de cultivo y las CD purificadas empleando el sistema de separación magnética (MACS, del inglés "Magnetic cell sorting") (Miltenyi Biotec, Alemania). Las células se centrifugaron, se lavaron y se resuspendieron en 99

µl de Buffer Macs (BM; 1 % de BSA , 2 mM EDTA en PBS) por cada 1×10^7 células. Posteriormente, las células fueron incubadas por quince minutos con el anticuerpo de ratón anti-CD11c biotinilado (HL3) (BD) a una dilución 1:100 por cada 1×10^7 células en BM. Después fueron lavadas dos veces y resuspendidas en 90 µl de BM por cada 1×10^7 células. En seguida fueron incubadas por 15 minutos con perlas magnéticas acopladas a Streptavidina (Miltenyi, Biotec) a una dilución 1:10 por cada 1×10^7 células en BM. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces y resuspendidas en 500µl del mismo buffer. Finalmente, las células se pasaron a través de una columna magnética pegada a una placa de metal. Se lavó y las células retenidas fueron despegadas retirando el imán. La porción correspondiente a CD se obtuvo al despegar la columna de la placa y al dejar pasar 1 ml de BM a través de ella.

6.8 Estimulación de las CD de médula ósea (CDMO)

CD de 6 días de diferenciación o purificadas positivamente fueron sembradas a una densidad de 0.5×10^6 células/ml en cajas para cultivo en suspensión de 35 mm, La estimulación se realizó durante 24 hrs empleando diferentes concentraciones de RNAdc de rotavirus, RRV purificado, LPS de la cepa de *E. coli* 055:B5 (SIGMA), como control positivo se empleó Poli I:C [(polímero sintético de RNAdc)(Amersham Biosciences)]. Las preparaciones fueron tratadas o no con el antibiótico Polimixina B (PMX-B)(SIGMA) en una proporción 1:100 (peso/peso).

6.9 Obtención de macrófagos de médula ósea

Los macrófagos fueron obtenidos de los cultivos de 6 días con GM-CSF que se describieron anteriormente para generar CD. En este caso se emplearon las células adherentes. Para esto se lavó 2 veces las células con PBS y fueron despegadas con tripsina/ EDTA (SIGMA) (0.025% de tripsina y 1Mm de EDTA en PBS). Se centrifugó a 1,700 rpm en un rotor Nr.11133 (Beckman) por 8 minutos, el botón celular colectado es resuspendido en nuevo RPMI-. Los macrófagos fueron sembrados a una densidad de 0.5×10^5 células/ml en cajas para cultivo de 96 pozos (Corning) con medio RPMI+.

6.10 Obtención de Sobrenadante de Intestino(SNB)

Se obtuvo el intestino delgado de un ratón BALB/c, se retiró la grasa con unas tijeras y se colocó en 5 ml de RPMI- frío. Posteriormente, ya en condiciones estériles, el intestino se lavó 2 veces, por lo que se procedió a pasar 10 ml de RPMI- a través él. Luego se cortó en 5 pedazos y se colocó en una caja petri de 100mm con 20 ml de RPMI+ incubándose por 24 hrs a 37°C. Al cabo de las 24hrs, se colectó el SBN rico en TGF-β (Smythies et al., 2005) y se centrifugó a 1800rpm con un rotor Nr. 11133 (Beckman) por 10' a 4 °C. Finalmente, se filtró el SBN por 0.22µm y se guardaron en tubos a -20°C hasta su uso.

6.11 Ensayo de Medición del Óxido Nítrico

CD, macrófagos obtenidos de médula ósea, así como la línea celular MODE-k fueron cultivados en medio de cultivo RPMI⁺, y activados o no con 100 U/ml de INF γ (ratón recombinante) por 24 hrs. Posteriormente se estimularon con diferentes concentraciones de; RNAdc de rotavirus, RRV purificado, LPS de la cepa *E. Coli* 055:B5 (SIGMA), Lisado de células MA-104 infectadas con rotavirus, como control positivo se empleó Poli I:C (polímero sintético de RNAdc) y como control negativo células sin estimular y células MA-104 sin infectar. Posteriormente, las células se incubaron por 72 hrs, al cabo de ese tiempo de incubación, se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos y se midieron los niveles de oxido nítrico por el método de Griess. Para esto, se agregó a los sobrenadantes 100 μ l de la reacción de Griess [sulfanilamida (Sigma) al 1% y naftielamina al 0.1% (Sigma) disueltos en 2.5% de H₃PO₄], se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 570nm. En paralelo se realizó una curva control de nitrito. Todos los ensayos se realizaron en presencia o no de polimixina B (SIGMA) en una proporción 1:100(peso/peso), para poder descartar posible contaminación de las preparaciones con LPS.

6.12 Citofluorometría

Las CD y los macrófagos de médula ósea fueron sometidos a los diversos tratamientos descritos anteriormente, fueron colectados, centrifugados 10 minutos a 1700 rpm, lavadas una vez con RPMI⁻ y resuspendidas en 500 μ l de Buffer de Enlace para ser contadas (BE, 0.01 % de Azida de sodio, 2mM de EDTA y 2 % de SFB en PBS). Posteriormente, las células fueron repartidas en pozos de fondo V de placas no tratadas(Costar), similar al número de tinciones requeridas. Las células fueron centrifugadas y el BE fue retirado para ser resuspendidas en 50 μ l de BE-suero de conejo (SC) al 1% o BE 1% de SC-anti-CD16/CD32 (2.4G2) (1:400) a 4° C durante 30 minutos para bloquear los receptores Fc. Posteriormente, las células fueron lavadas con 150 μ l de BE y en seguida fueron incubadas por 20 minutos en oscuridad con los segundos o terceros anticuerpos para marcadores externos en un volumen de 50 μ l, haciendo dos lavados con 100 μ l de BE entre la adición de cada anticuerpo. Finalmente, las células se resuspendieron en 300 μ l BE, se fijaron con 100 μ l de p-formaldehído al 4 % y fueron analizadas en el citofluorómetro. Todos los anticuerpos fueron obtenidos de BD a menos que se indique otra cosa empleándose a diferentes diluciones en BB-1 % de suero de conejo: Fab-FITC (Jackson Immunoresearch)(1:20), anti-CD11c-Biotina (HL3)(1:400), anti-CD40-PE (3/23)(1:200) y anti-CD11b-PE ó FITC (M1/70)(1:400), anti-IgG1 \square -PE (R3-34)(1:400), anti-IgG_{2b} κ -FITC (M1/70)(1:400), Streptavidina-FITC(1:300) y Streptavidina-PE(1:300).

6.13. Determinación y Cuantificación del RNAm para citocinas (TNF- α , IL-12 e IL-10) y TLR-3

CD y macrófagos derivados de médula ósea estimulados o no con: RNAdc viral, RRV purificado, RNAdc sintético y LPS, en presencia de Polimixina B por 24 hrs., fueron recolectadas al término de ese tiempo las células y se lisaron con Trizol (Gibco BRL), posteriormente se aisló el RNAm y se sintetizó cDNA y en el caso de TLR3 se amplificó por PCR la secuencia de TLR-3 de ratón usando primers específicos. El RNAm de las citocinas se cuantificó por PCR tiempo real usando oligonucleótidos de TNF- α , IL-12 e IL-10 (AB).

6.13.1 Purificación del RNA total de Macrófagos, CD

Para el aislamiento del RNA total, se usó el reactivo Trizol (Gibco BRL), el cual contiene una solución de fenol e isotiocianato de guanidina que rompe las células y precipita las proteínas, manteniendo la integridad del RNA.

Una vez colectadas las células, se lavaron con PBS y al pellet celular se le agregó Trizol (1 ml) (Gibco BRL). Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir una disociación completa del complejo núcleo-proteína. Se agregó 200 μ l de cloroformo, se agitó manualmente y se centrifugó a 12000 rpm en frío a 4°C por 15 min. Se tomó el sobrenadante y se pasó a un tubo nuevo, al cual se le adicionó 0.5 ml de alcohol isopropílico y se incubó durante 10 min., para precipitar el RNA. Se centrifugó y tomó el sobrenadante lavándolo con etanol al 75%. Se centrifugó por última vez, se desechó el sobrenadante, se secó y se disolvieron las muestras en 30 μ l de agua tratada con DEPC.

La densidad óptica de las muestras se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm (5 μ l de RNA en 495 μ l de agua ultrapura) para determinar la concentración del RNA.

6.13.2 Obtención de cDNA

Para obtener el cDNA se utilizaron 1.5 μ g de RNA, ajustando a un volumen de 15 μ l con agua destilada, al cual se le agregó 1.5 μ l de oligo dT 25 μ M. Se incubó a 72°C por 10 minutos y se dejó enfriar lentamente (hasta que bajó la Temperatura 37°) para permitir la hibridación del primer dT con los segmentos de polyA del mRNA. Posteriormente, se agregó una mezcla de reacción con los siguientes reactivos: RNaseout (40 U/ μ l) (GIBCO BRL), Buffer (5X) (GIBCO BRL), DTT (0,1M) (GIBCO BRL), dNTPs (10mM), Reversa transcriptasa (RT 200U/ μ l) (GIBCO BRL). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 30 μ l y se realizó durante 1 hr. a 37°C. En esta reacción se obtiene un cDNA únicamente del RNA mensajero, ya que los segmentos de polyA a los que hibridiza el primer sólo están presentes en este tipo de RNA.

6.13.3 Reacción en cadena de la polimerasa – Tiempo real (PCR-TR)

Se basa en ciclos de amplificación exponencial de un fragmento específico. Para llevar a cabo esta reacción se tomaron 2 μ l de la reacción de cDNA, y se agregaron los siguientes reactivos de un kit Taq Man de amplificación para PCR en tiempo real: Taq Man Master mix (12.5 μ l) (AB), Primer Mix de; TNF- α , IL-12p40 e 1IL-10 (1 μ l) (AB) y agua mili Q (9.5 μ l), ajustándose a un volumen final de 25 μ l. La modalidad de PCR se basa en ciclos de amplificación exponencial de un fragmento específico. Para que el PCR se lleve a cabo es necesario tener los siguientes reactivos: primers, deoxinucleotidos (A, G, C, T), DNA polimerasa, DNA de estudio. La reacción comienza con la separación de las 2 cadenas de DNA mientras que la enzima DNA polimerasa (Taq-polymerasa) va copiando el DNA usando cada cadena como templado. En la primera parte del proceso se separan las 2 cadenas del DNA, posteriormente una baja de temperatura permite la unión de los primers y la extensión de la cadena complementaria o extensión del DNA, copiándose el templado y completándose de ésta manera el ciclo. Al finalizar cada ciclo se obtiene una duplicación de cada segmento de DNA. Este ciclo se repite más de 30 veces, cada segmento de DNA que ha sido sintetizado actúa como templado de modo que después de 30 ciclos se producirán aproximadamente 1 billón de copias a partir de un segmento de DNA.

El PCR en tiempo real es una técnica cuantitativa que nos permite detectar la amplificación de nuestro gen de interés conforme va ocurriendo, de modo que en lugar de comparar cantidades discretas de una muestra, se comparan las curvas de amplificación. Esta técnica se basa en la emisión de una señal fluorescente dependiente de cada ciclo de amplificación, que es detectada por un equipo especial, que envía los datos a una computadora, Existen varios métodos en esta investigación, se utilizó el método TaqMan en el cual la sonda fluorescente es un tercer fragmento de DNA complementario a una parte intermedia del DNA que queremos amplificar. Esta primer lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher"), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la DNA polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de DNA que se está amplificando. Para cuantificar el mensajero de la citocinas en las muestras, se compararon las curvas de las amplificaciones de las mismas con respecto a un gen interno, en este caso el 18s.

6.14 Prueba Estadística

Los resultados reportados se realizaron con un número mínimo de 3 experimentos independientes, con 3 repeticiones, estos resultados fueron analizados con la prueba estadística t de Student y fue realizado con el Software STATISTICA versión 6.0 (Tulsa, OK USA). Las diferencias entre los resultados fueron determinados a través de la prueba Kruskal-Wallis, con una probabilidad de 0.05 ($P \leq 0.05$) considerados como significativos.

VII. RESULTADOS

7.1 Generación de células dendríticas y macrófagos a partir de médula ósea

CD y macrófagos fueron derivados a partir de precursores de MO de ratones BALB/c cultivadas durante seis días en presencia de 15 – 20% de medio de cultivo condicionado rico en GM-CSF de ratón (Del inglés “Granulocyte-macrophage colony stimulating factor) (Lutz et al., 1999). Las CD fueron obtenidas a partir de las células no adherentes en suspensión, inmunomarcadas para CD11c+ (marcador de CD) y analizadas por citofluorometría usando como control células de MO frescas (para cada muestra se capturaron 10,000 eventos). Se encontró que en las células en suspensión se generó una población de células más grandes y granulosas (2B), en comparación con células de médula ósea sin diferenciar (2A). Al analizar la población total de las células en suspensión para la presencia de CD11c, se encontró que aproximadamente un 30 % de células expresaban este marcador (2C), en comparación con un 2 % en células de MO sin diferenciar. Estos resultados claramente nos indican que las células en suspensión derivadas de MO en presencia de GM-CSF por 6 días, contienen un alto porcentaje de CD. Como se mencionó anteriormente, la gráfica de tamaño y granulocidad presentó 2 poblaciones bien definidas (2B), por lo que éstas fueron analizadas para la expresión de CD11c de manera individual. Se definió como R0 a la región con menor tamaño y granulocidad y como R1 a la nueva población con mayor tamaño y granulocidad. Se encontró que en R1 aproximadamente el 30-40 % de las células expresaban CD11c (2D), en comparación con un 8 % presente en la R0. Esto indica claramente que la región R1 es donde se localizan predominantemente las CD generadas. De esta manera, todos los resultados reportados en este trabajo sobre las CD se referirán a la R1.

Previamente se ha reportado que las células adherentes de los cultivos de MO diferenciados con GM-CSF, son predominantemente macrófagos (Inaba et al., 1992;Lutz et al., 1999). Cuando esta población adherente en nuestros cultivos de MO de 6 días fue analizada por citofluorometría para el marcador CD14 (característico de macrófagos), se encontró que un 40 % de las células presentaban este marcador (datos no mostrados). Por lo que definimos a esta población enriquecida como macrófagos de médula ósea.

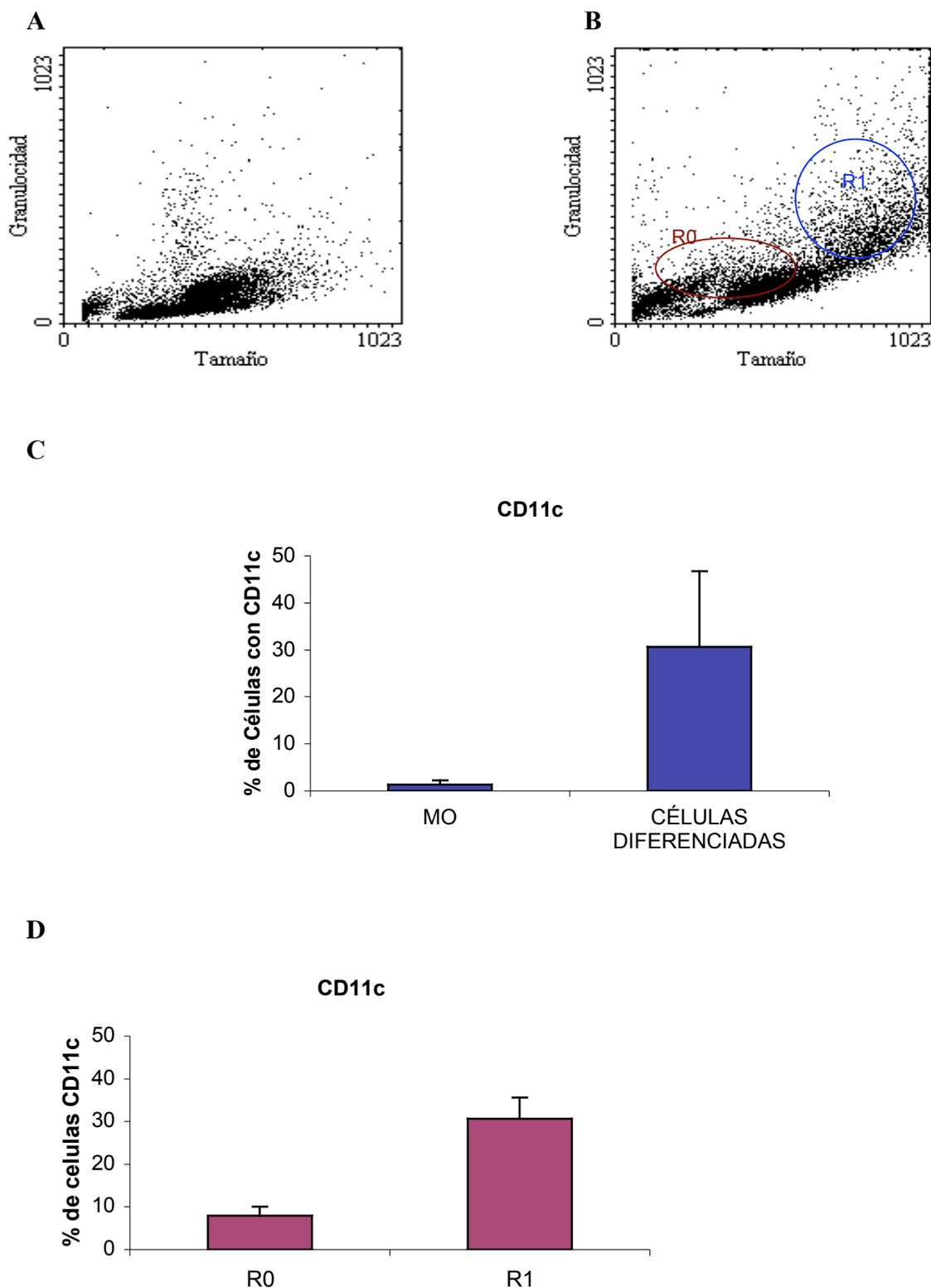


Figura 2. Generación de CD derivadas de MO. A) Gráfico de granulocidad y tamaño de células no diferenciadas. B) Gráfico de granulocidad y tamaño de las células CD11c en región R1. C) Expresión de CD11c en células de médula ósea y células diferenciadas. D) Analisis de la expresión de CD11c en células diferenciadas en 2 diferentes regiones; R0 indica que ninguna región fue elegida y R1 corresponde a la mayor expresión de CD11c.

7.2 Producción de NO por células estimuladas con rotavirus

CD y macrófagos derivadas de médula ósea, así como las células epiteliales de intestino de ratón transformadas Mode-K recibieron *in vitro* diferentes estímulos y 72 hr después de la activación evaluaron a través de los niveles de NO excretado al medio de cultivo. Las células fueron activadas o no previamente (24 hr) con INF- γ , sin embargo, solamente las células Mode-K requirieron de la activación previa para responder adecuadamente a los estímulos (datos no mostrados). Se usaron diluciones seriadas (0.001 a 100 $\mu\text{g/ml}$) de virus purificado RRV y RNAdc viral. Como controles positivos de activación se emplearon diluciones seriadas de Poli I:C y LPS. Poli I:C es un RNAdc sintético que estimula a las células a través de TLR-3 y LPS es un producto bacteriano que estimula a través de TLR4.

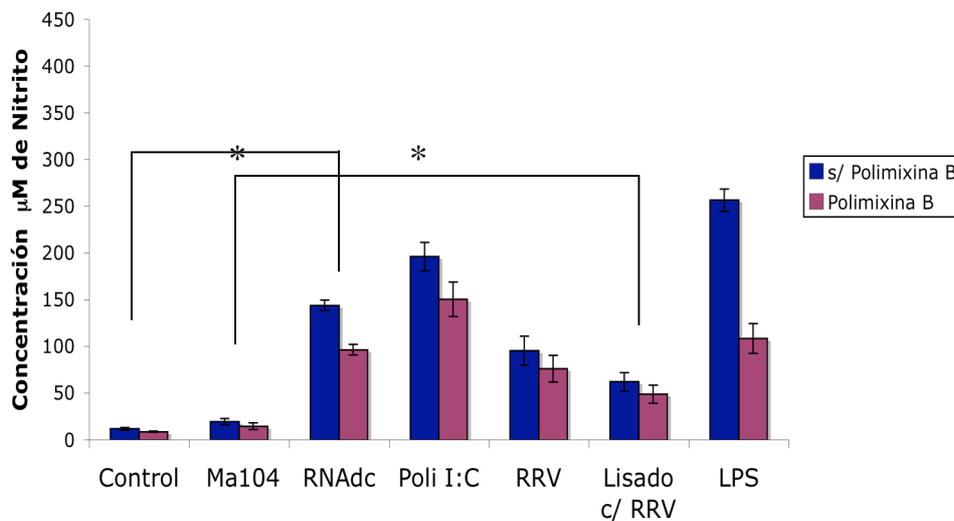
En las figuras 3 a,b y c, se muestran los niveles máximos de producción de NO por las diferentes células en el rango de concentraciones utilizadas para los diferentes estímulos. Todas las células respondieron positivamente a los estímulos por el virus purificado RRV, el RNAdc viral, Poli I:C y LPS, sin embargo, las células epiteliales tuvieron una respuesta inferior a la encontrada con los macrófagos y las CD. Por otro lado, el estímulo por Poli I:C requirió en todos los casos de 100 veces más concentración que RNAdc y RRV para generar la respuesta máxima (100 $\mu\text{g/ml}$ vs 1 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente), Para descartar que la estimulación observada con RRV, RNAdc viral y Poli I:C no fuera debida a una contaminación por LPS residual, el mismo ensayo fue realizado en presencia de Polimixina B, el cual es un antibiótico que se une al lípido A del LPS y bloquea su actividad. Como se puede observar en las figuras 3a,b y c, la activación inducida por RRV, RNAdc viral y Poli I:C se redujo ligeramente con respecto a los niveles encontrados sin el antibiótico, sin embargo, en todos los casos se mantuvo la tendencia descrita previamente. Es posible que la reducción encontrada se haya debido a una leve contaminación con LPS que claramente no modifica el hecho que RRV y RNAdc viral son capaces de estimular a las células para la producción de NO. La actividad neutralizante de Polimixina B (SIGMA) se demostró por el hecho que redujo substancialmente, aunque no totalmente, la estimulación inducida por LPS.

En una infección natural es de esperarse que las CD, macrófagos y células epiteliales reciban el estímulo no sólo de los componentes del rotavirus (proteínas, genoma etc.) sino también de proteínas celulares como HSP y citocinas (INF's, quimiocinas, etc.). Tratando de simular este evento *in vitro* incubamos a las células con diluciones seriadas de lisados de células epiteliales de riñón de mono MA-104 infectadas con RRV (debido a que estas células son susceptibles a la infección por rotavirus) en presencia o en ausencia de Polimixina B. Como control negativo se utilizaron diluciones seriadas de lisado de células MA-104 sin infectar. Estos ensayos se realizaron dentro de la serie de experimentos mencionados anteriormente. Como se observa

en las gráficas 3 a,b y c, el lisado de células MA-104 infectadas con RRV indujo la producción de NO en los 3 tipos de células, sin embargo, los niveles de NO en CD y células epiteliales fueron más altos que en macrófagos. El control negativo dio niveles de NO basales. Al igual que lo mostrado anteriormente, la presencia de Polimixina B solo redujo ligeramente la producción de NO.

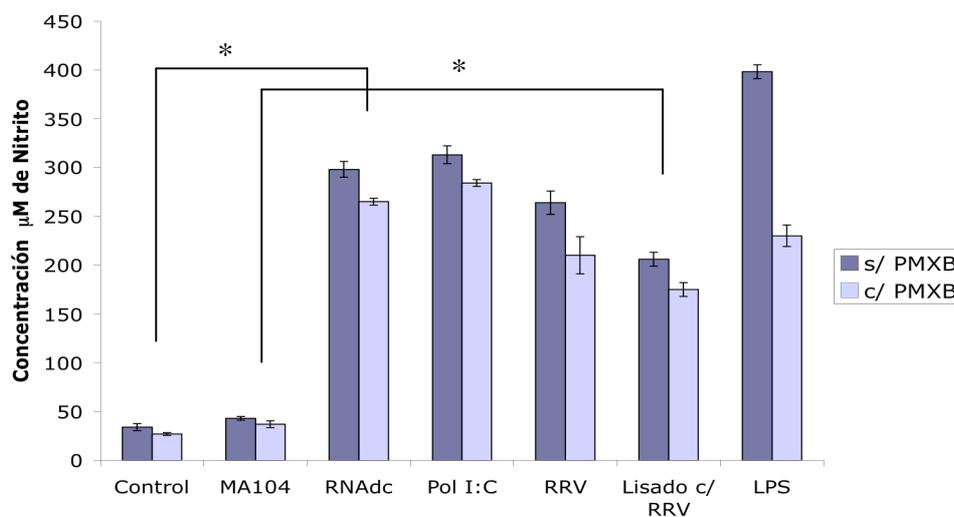
a)

Producción de NO por Macrófagos de MO.



b)

Producción de NO por CD de MO.(CD11c)



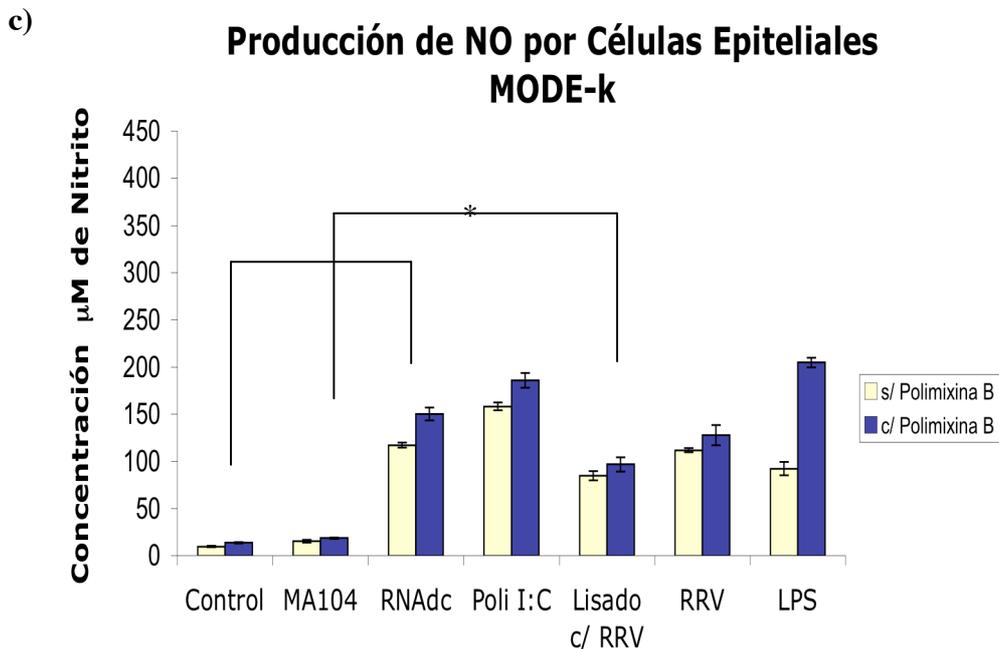


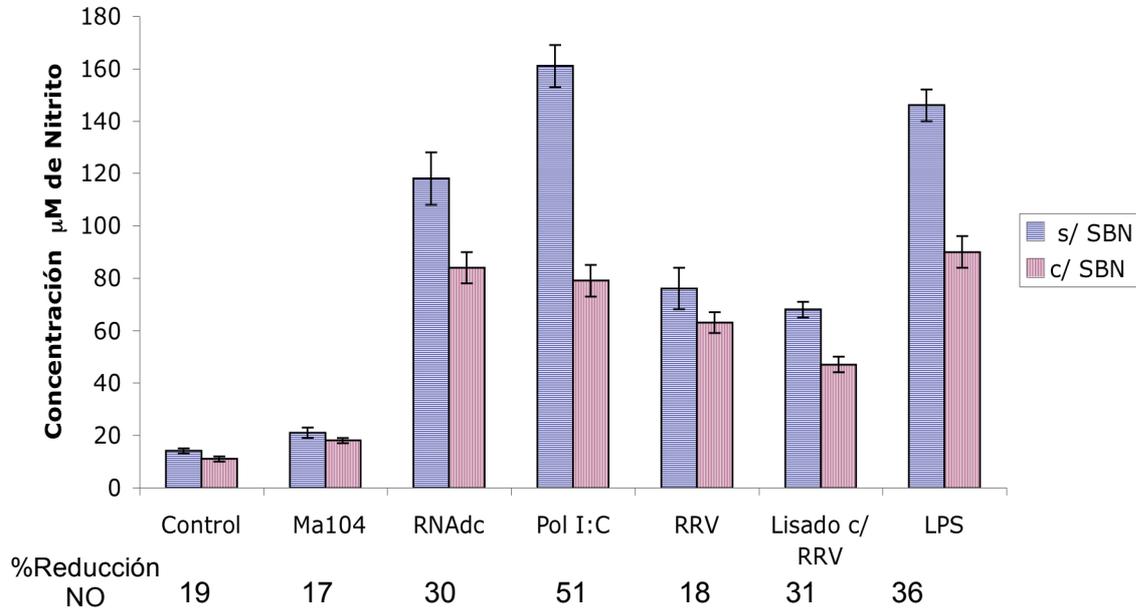
Figura 3. Producción de Oxido Nítrico (NO) en células de la respuesta inmune innata. A) Producción de NO por Macrófagos derivados de Médula Ósea, B) Producción de NO por CD CD11c+ , C) Producción de NO por Células Epiteliales MODE-k. Se muestran los niveles máximos de NO producidos por las diferentes células estimuladas con RNAdc (1μg/ml) de rotavirus, Poli I:C (100μg/ml), RRV (1μg/ml), LPS (1μg/ml), lisado de MA-104 infectadas con RRV y lisado de Ma-104 sin infectar durante 72 horas *in vitro*. Los niveles de NO fueron determinados por el método de Griess. Las CD y las células epiteliales Mode-k fueron preactivados por 24 hrs con 100U/ml de INF- γ . En todos los experimentos se utilizó Polimixina B a una concentración de 100U/ml más el estímulo empleado. Todos nuestros resultados son estadísticamente significativos (n=3) con una * p<0.05, cuando se compararon con el control.

7.2.1 Producción de NO por CD, macrófagos y células epiteliales con sobrenadante (SBN) de intestino de ratón

En el intestino existe un ambiente inmunológico anti-inflamatorio, lo que garantiza que no existan respuestas inmunes dañinas contra bacterias comensales y proteínas exógenas alimentarias. Los principales elementos anti-inflamatorios son las citocinas TGF- β e IL-10 secretadas entre otras células por linfocitos T, neutrófilos, macrófagos, CD y células del estroma intestinal (Smythies et al., 2005). Por lo que decidimos determinar si la respuesta de NO encontrada en CD, macrófagos y células epiteliales era afectada por sobrenadantes de cultivos intestinales ricos en TGF- β e IL10. De esta manera, intentamos simular el ambiente en el que las células inmunes intestinales reaccionarían contra el genoma de rotavirus.

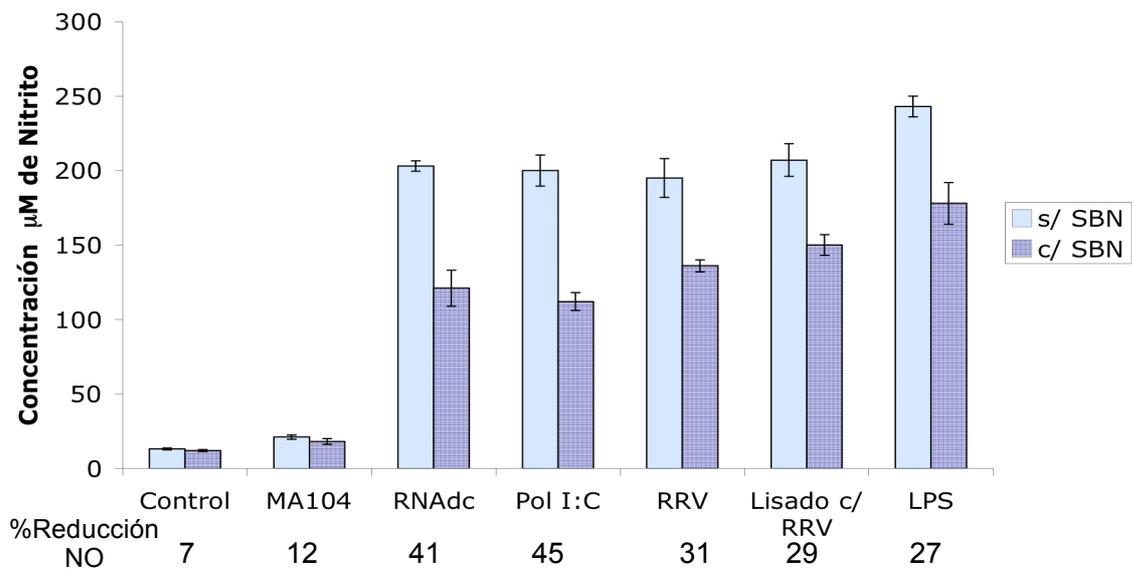
a)

Efecto de SBN de Intestinos sobre la producción de NO en Macrófagos



b)

Efecto de SBN de Intestinos sobre la producción de NO por CD de MO.



c)

Efecto de SBN de Intestinos sobre la producción de NO por MODE-k

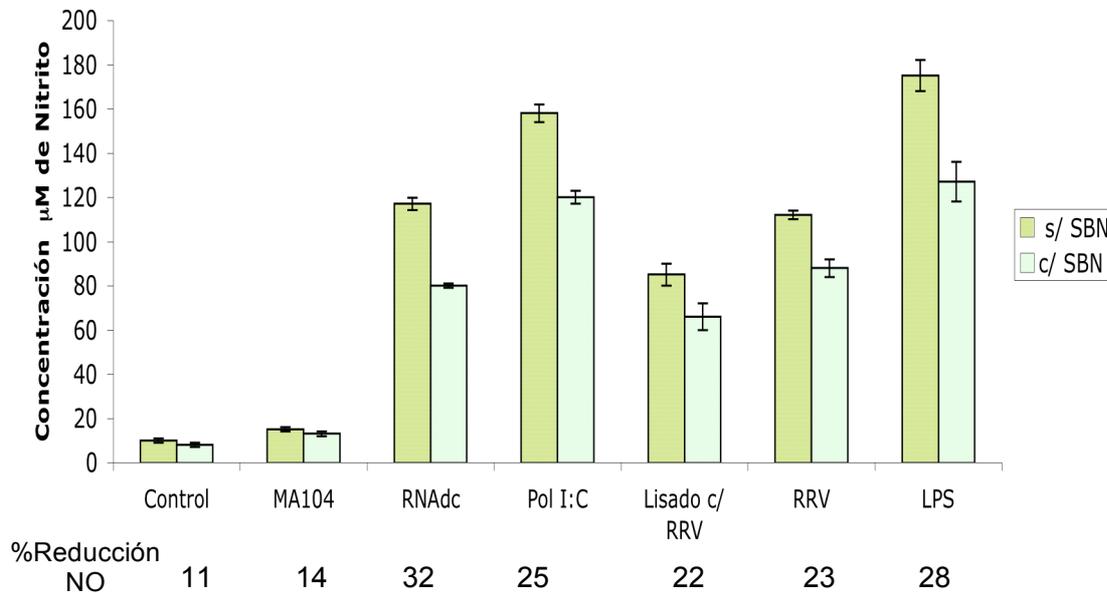


Figura 4. Producción de NO en células de la respuesta inmune innata en presencia de sobrenadante condicionado de intestino. A) Producción de NO por macrófagos derivados de MO. B) Producción de NO por CDMO, C) Producción de NO por Células Epiteliales MODE-k. Se muestran los niveles de reducción de NO producidos por las diferentes células, a las cuales se les agregó SBN condicionado de intestino por 2hr antes del estímulo con RNAdc (1µg/ml) de rotavirus, Poli I:C (100µg/ml), RRV (1µg/ml), LPS (1µg/ml), Lisado de MA104 infectadas con RRV y Ma104 durante 72 horas *in vitro*. Los niveles de NO fueron determinados por el método de Griess. Las células epiteliales Mode-k fueron preactivadas por 24 hrs con INF- γ . En todos los experimentos se utilizó Polimixina B a una concentración de 100U/ml más respecto al estímulo empleado. Todos nuestros resultados son estadísticamente significativos (n=3) con una * p<0.05, cuando se compararon con el control.

A CD, macrófagos y células epiteliales Mode K, sembradas en cajas para cultivo de 96 pozos, se les agregó o no sobrenadante de intestino de ratón (intestinos cultivados *in vitro* por 24 hr; ver metodología) a una concentración final de 50 % y se incubaron por 2 hrs. Posteriormente, las células se estimularon con diluciones seriadas (0.001 a 100 µg/ml) de RNAdc de rotavirus, RRV purificado, Poli I:C, y LPS. Asimismo, las células se estimularon con diluciones seriadas (1:8 a 1:64) de lisados de células Ma-104 infectadas o no con RRV. Las células se incubaron durante 72 horas y los niveles de NO en el sobrenadante fueron determinados por el método de Griess. Todos los ensayos se realizaron en presencia de Polimixina B a una concentración de 100U/ml y solamente las células epiteliales Mode-K fueron preactivadas por 24 hrs con 100 U/ml de INF- γ .

Se encontró que efectivamente la presencia del sobrenadante de intestinos en los cultivos de los 3 tipos celulares analizados redujo significativamente los niveles de producción de NO en comparación con los cultivos control sin sobrenadante de intestinos. De manera general, se puede decir que el sobrenadante indujo una reducción que varió de un 20 a un 50% en los diferentes estímulos utilizados (Figuras 4 a, b y c), lo cual dependió del tipo celular analizado. Sin embargo, es claro que tanto RNAdc, Poli I:C y LPS fueron los estímulos que más se vieron afectados. Estos resultados sugieren que en un ambiente intestinal las CD, macrófagos y células epiteliales, aunque reducida, podrían tener una respuesta microbicida a través de NO en un encuentro con antígenos de rotavirus, en particular el RNAdc viral.

7.3 Expresión de CD40 en CD y macrófagos derivados de médula ósea estimuladas con rotavirus

Se realizó el análisis por citofluorometría de los niveles de expresión de CD40 en CD y macrófagos en respuesta a la estimulación con diferentes componentes del rotavirus, para evaluar su activación. Las CD y los macrófagos fueron cultivados por 24 hr en presencia de 10 µg/ml de rotavirus RRV purificado y 1 µg/ml RNAdc de rotavirus. Como controles positivos se usaron 100 µg de Poli I:C y 1 µg de LPS y como control negativo células con medio. Todos los ensayos se realizaron en presencia de Polimixina B. Se encontró que en CD RRV indujo un marcado incremento en la expresión de CD40, similar al encontrado con LPS (Tabla 1). Sin embargo, tanto el RNAdc viral como el sintético indujeron un reducido incremento del marcador. En el caso de los macrófagos, tanto el virus purificado como el RNAdc viral indujeron un aumento significativo en la expresión de CD40, similar al encontrado con Poli I:C (Tabla 1). Por otro lado, LPS indujo el mayor incremento de CD40 en el ensayo. Estos datos nos indican que rotavirus es capaz de inducir la expresión de CD40 en ambos tipos celulares, sin embargo, el RNAdc viral induce la expresión de este marcador predominantemente en macrófagos.

Tabla 1. Rotavirus induce la expresión de CD40 en la superficie de Macrófagos y CD de MO.

Estímulo	CD de MO *	Macrófagos de MO. +
Control	5	18
Poli I:C	14	32
RNAdc	8	24
RRV	40	27
LPS	50	38

*Las CD y + los macrófagos y se obtuvieron *in vitro* a partir de médula ósea de ratones BALB/c tratados con GM-CSF durante 6 días, se estimularon por 24 horas con 1µg/ml de RNAdc de rotavirus, 100µg/ml de Poli I:C, 10µg/ml de RRV y 1µg/ml de LPS, al cabo de las 24 hrs se tiñeron y analizaron por citometría de flujo.

7.4 Cuantificación de RNAm de citocinas TNF- α , IL-12, IL-10

TNF- α e IL-12 son citocinas pro-inflamatorias secretadas por los macrófagos y las CD, que se incrementan en algunas infecciones por patógenos intracelulares, siendo capaces de participar en respuestas antivirales *in vivo* (Abbas *et al.*, 2000). En cambio la citocina IL-10 funciona como inhibidor o regulador de macrófagos y CD activados en las respuestas inmunitarias. (Lalani *et al.*, 1997). Con la finalidad de determinar si el genoma de rotavirus es capaz de inducir la producción de TNF- α , IL-12 e IL-10 en los macrófagos y las CD derivadas de MO, cultivos de estas células fueron estimuladas con 1 μ g/ml de RNAdc viral, 100 μ g/ml de Poli I:C, 10 μ g de RRV purificado y μ g/ml de LPS por 24 hr en presencia de Polimixina B. Como control negativo las células se cultivaron solamente con medio de cultivo. Al término de este tiempo las células fueron recolectadas y el RNA total fue obtenido por el método de Trizol. A partir de este RNA se sintetizó cDNA y los mensajeros para TNF- α , IL-12 e IL-10 fueron cuantificados por PCR de tiempo real con primers específicos.

En las CD solamente el virus RRV purificado estimuló de manera importante la inducción del mensaje para las 3 citocinas con respecto a su control (Figura 5 y Tabla 2). Sin embargo, es importante mencionar que en el caso de IL-12 e IL-10 los niveles de mensajero son sumamente bajos comparados con TNF- α , por lo que el incremento mencionado se refiere al índice de estimulación con respecto al control para cada citocina (Tabla 2). Por otro lado, en los macrófagos el mensaje para TNF- α fue inducido fuertemente por Poli I:C y a niveles bajos pero detectables por RNAdc viral y LPS. El mensaje de IL-12 fue inducido a niveles altos solamente por LPS. En el caso del mensaje para IL-10 RRV purificado y LPS generaron niveles altos de estimulación y RNAdc indujo una respuesta intermedia (Figura 6 y Tabla 3). Estos resultados muestran claramente que las CD y los macrófagos responden de manera diferencial a la inducción de los mensajeros de las citocinas analizadas con los diferentes estímulos utilizados. Las CD no responden al genoma de rotavirus, pero sí lo hacen a las proteínas del virus purificado. Por otro lado, los macrófagos mostraron una respuesta baja pero detectable para TNF- α e IL-10 cuando fueron estimuladas con el genoma viral y positiva para el virus purificado solamente en el caso de IL-10.

Expresión del RNAm para diferentes citocinas en CDMO estimuladas con rotavirus

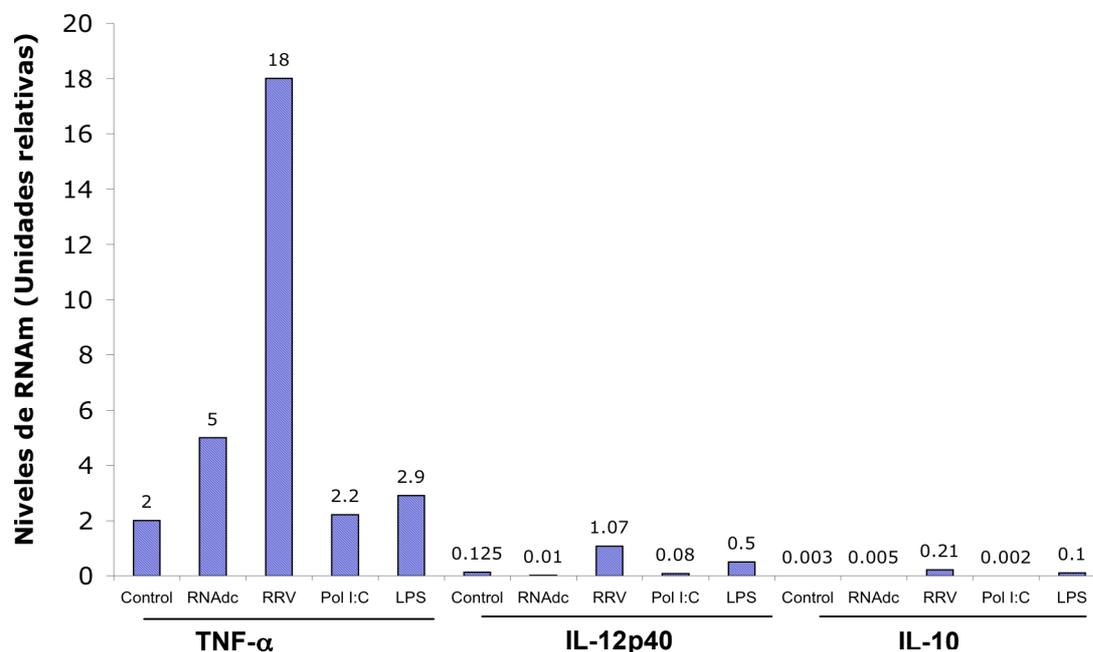


Figura 5. Expresión de Citocinas TNF- α , IL-10, IL-12p40 en CDMO estimuladas. CD fueron estimulados por 24 horas con 1 μ g/ml de RNAdc de rotavirus, 10 μ g/ml RRV purificado (P) 1 μ g/ml de LPS de la cepa de *E. coli* 055:B5 (SIGMA), como control positivo se empleó 50 μ g/ml de Poli I:C (polímero sintético de RNAdc)(Amersham Bioscenses). Las preparaciones fueron tratadas con el antibiótico Polimixina B (PMX-B)(SIGMA) en una proporción 1:100 (peso/peso). Al cabo de las 24 horas, se recolectaron las células y se obtuvo el RNA total, por el método de trizol, posteriormente realizo una RT para obtener el cDNA de las células y proseguimos a realizar el PCR-RT.

Tabla 2. Niveles de expresión del RNAm para TNF- α , IL12p40 e IL-10 en CD* estimuladas con rotavirus.

ESTIMULO	TNF- α	IL-12	IL-10
RNAdc	2.5	0.8	1
RRV purificado	9	8.6	70
Poli I:C	1.1	0.6	0.6
LPS	1.5	4	33.3

*CD de MO enriquecidas con GMS-CF durante 6 días, se estimularon por 24 hrs con 1 μ g/ml de RNAdc de rotavirus, 10 μ g/ml RRV purificado (P), como control positivo se empleó 50 μ g/ml de Poli I:C (polímero sintético de RNAdc)(Amersham Bioscenses). Las preparaciones fueron tratadas con el antibiótico Polimixina B (PMX-B)(SIGMA) en una proporción 1:100 (peso/peso).

Expresión del RNAm para diferentes citocinas en Macrófagos de MO estimulados con rotavirus

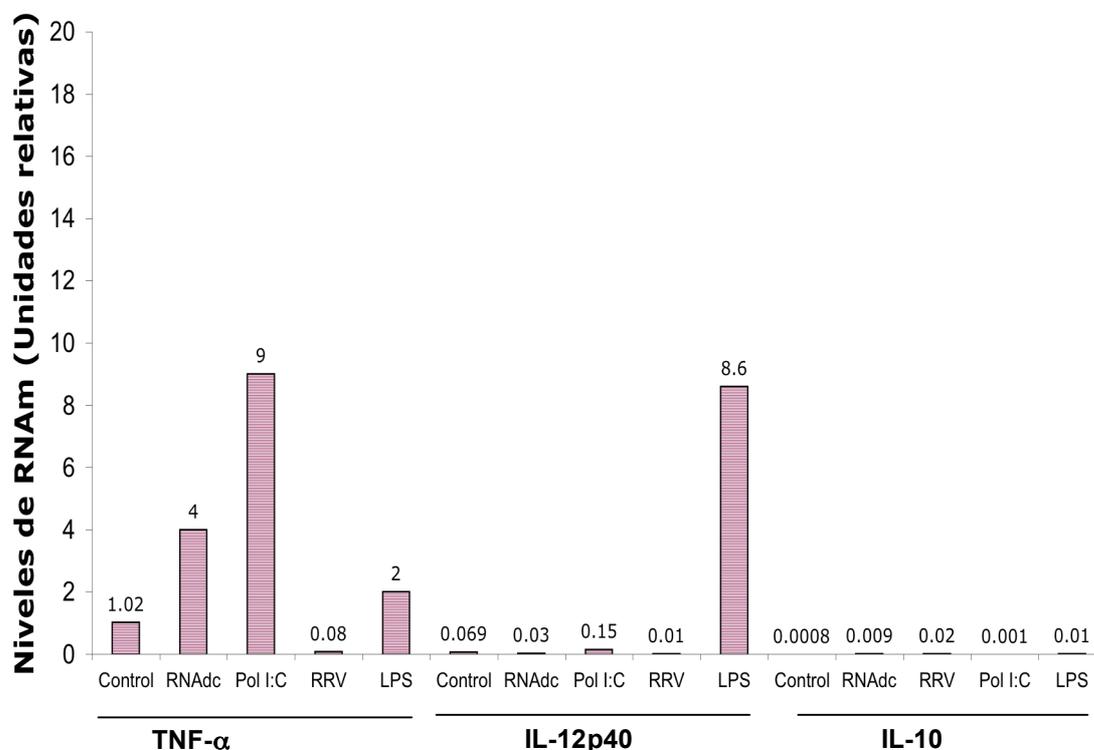


Figura 6. Expresión de Citocinas TNF- α , IL-10, IL-12p40 en células estimuladas. Macrófagos de médula ósea, fueron estimulados por 24 horas con 1 μ g/ml de RNAdc de rotavirus, 10 μ g/ml RRV purificado (P) 1 μ g/ml de LPS de la cepa de *E. coli* 055:B5 (SIGMA), como control positivo se empleó 50 μ g/ml de Poli I:C (polímero sintético de RNAdc)(Amersham Biosciences). Las preparaciones fueron tratadas con el antibiótico Polimixina B (PMX-B)(SIGMA) en una proporción 1:100 (peso/peso). Al cabo de las 24 horas, se recolectaron las células y se obtuvo el RNA total, por el método de trizol, posteriormente realizó una RT para obtener el cDNA de las células y proseguimos a realizar el PCR-RT.

Tabla 3. Niveles de expresión del RNAm para TNF- α , IL12p40 e IL-10 en Macrófagos* estimulados con rotavirus.

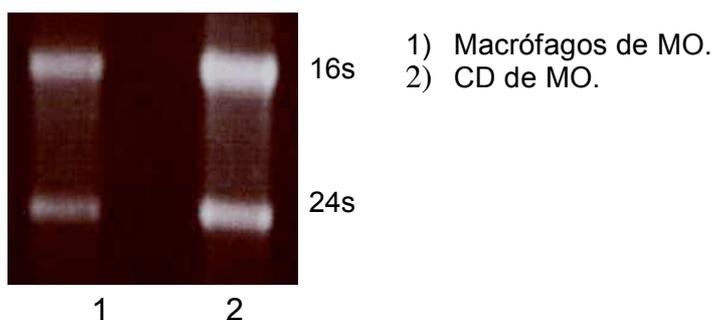
ESTIMULO	TNF- α	IL-12	IL-10
RNAdc	4	0.43	11
RRV	0.08	0.14	25
Poli I:C	9	0.21	0.11
LPS	2	125	12.5

*Macrófagos de MO enriquecidos con GMS-CF durante 6 días, se estimularon por 24 hrs con 1 μ g/ml de RNAdc de rotavirus, 10 μ g/ml RRV purificado (P), 1 μ g/ml de LPS de la cepa de *E. coli* 055:B5 (SIGMA) como control positivo se empleó 50 μ g/ml de Poli I:C (polímero sintético de RNAdc)(Amersham Biosciences). Las preparaciones fueron tratadas con el antibiótico Polimixina B (PMX-B)(SIGMA) en una proporción 1:100 (peso/peso). Estos aumentos son comparados con respecto a su control por cada citosina.

7.5 Amplificación del mensajero para TLR3

Por los resultados anteriores es claro que las células empleadas en los ensayos responden al RNAdc, y es muy probable que esta estimulación se realice a través de TLR-3. Aunque se ha demostrado que tanto las CD y los macrófagos expresan esta molécula en los endosomas (Matsumoto *et al.*, 2003), se quiso verificar si en realidad las CD y los macrófagos derivados de médula ósea que se utilizaron en los ensayos de estimulación expresaban el mensajero para TLR-3. De esta manera, se obtuvo el RNA total de CD y macrófagos y a partir del cDNA se amplificó el mensajero para TLR-3 usando primers específicos. Como control de expresión constitutiva se amplificó el mensaje para β -actina. Como se puede ver en la figura 7 tanto las CD como los macrófagos expresan mensaje para TLR-3.

A) RNA



B)

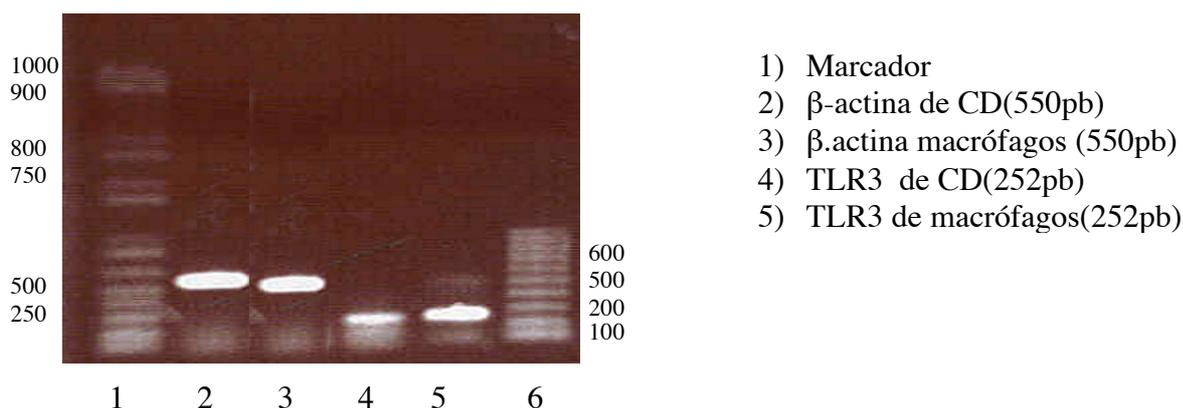


Figura 7. Mensajero de TLR3. A) Gel de agarosa muestra las bandas de RNA de CD y macrófagos de MO. B) Mensajero de β - actina y TLR3 en CD y macrófagos de MO.

VIII. DISCUSIÓN

La principal función fisiológica del sistema inmune es proteger al hospedero contra patógenos, tradicionalmente ha sido dividido en inmunidad innata e inmunidad adquirida (Fleisher T, & Bleesing J., 2000). Las principales diferencias entre ambas respuestas son los mecanismos y los tipos de receptores usados para el reconocimiento antigénico. En la inmunidad innata, los receptores reconocen estructuras altamente conservadas presentes en un gran grupo de microorganismos (Medzhitov R, & Janeway C, 2000). Estas estructuras son designadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y dentro de los receptores involucrados en identificarlas se encuentran los TLR's (Medzhitov R, & Janeway C, 2000).

En respuesta a procesos infecciosos las CD, los macrófagos y las células epiteliales generan una serie de eventos dirigidos a eliminar al agente patógeno, como es la producción de NO, un potente antimicrobiano, aumento de los correceptores de membrana como es el CD40 y la producción de citocinas, participando así en la primera línea de defensa de la respuesta inmune (Abbas *et al.*, 2002). Se sabe que estas células expresan TLRs, por lo que un amplio rango de patógenos y sus constituyentes pueden ser reconocidos. En este trabajo, se investigó si estas células de la respuesta inmune innata podrían responder a un estímulo con el genoma de rotavirus que está constituido por 11 segmentos de RNAdc, a través de la producción de NO, aumentando la expresión de CD40 e induciendo la expresión de citocinas.

Se encontró que tanto los macrófagos, como las CD y las células epiteliales produjeron NO en respuesta a la estimulación con el RNAdc del rotavirus y Poli I:C., muy probablemente a través del TLR-3, ya que ha sido reportado que esta molécula reconoce a ambos tipos de RNAdc (Alexopoulou *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2003). Como evidencia indirecta, en este trabajo demostramos que tanto las CD y macrófagos derivados de médula ósea expresaban el mensajero para TLR-3, sin embargo, para demostrar esta interacción necesitaríamos (a) bloquear la respuesta con anticuerpos anti TLR-3 ó (b) generar CD y macrófagos de médula ósea de ratones Knockout en TLR-3 los cuales no deberían responder a estos estímulos. De cualquier forma estos resultados claramente indican que el genoma de rotavirus puede estimular a células de la respuesta inmune innata para la producción de un producto microbicida como NO.

Un resultado interesante fue que, en términos de concentración para dar una estimulación máxima, el RNAdc fue aproximadamente 100 veces más potente para inducir la producción de NO en las células que el Poli I:C. Poli I:C ha sido empleado como adyuvante en diferentes

modelos de respuesta inmune (Salem et al., 2005). Esto abre la posibilidad de emplear RNAdc de rotavirus como adyuvante.

Por otro lado, el rotavirus RRV purificado, el lisado de células MA-104 infectadas con RRV y LPS también indujeron la producción de NO en las células. Sin embargo, la respuesta inducida por los dos primeros fue en general menor a la encontrada con los RNAdc. Los viriones del rotavirus están compuestos por 6 proteínas no estructurales y el genoma de 11 segmentos de RNAdc, los cuales constituyen un 80% y un 20 % respectivamente de la masa total, por lo que en 1 µg/ml (estimulación máxima encontrada) de masa viral se tendrían aproximadamente 200 ng/ml contenidos en los viriones. Esto en parte podría explicar la menor estimulación inducida por los virus purificados, sin embargo, es claro que por lo menos la proteína externa VP7 podría ser capaz de estimular a las células a través del TLR-4 como lo mostró Blutt et al en células B (Blutt *et al*, 2004b) y como los sugieren resultados previos de nuestro laboratorio con CD (Vázquez T., 2005). De hecho la estimulación a través de TLR-4 en estas células se demostró con la estimulación encontrada con el LPS. En nuestros experimentos es posible que la interacción de VP7 con TLR-4 en la membrana celular y el genoma del virión con TLR-3 en los endosomas pudo haber contribuido a la estimulación. Sin embargo, para determinar la contribución de los componentes del virión para la inducción de NO se deberán realizar en el futuro experimentos más controlados bloqueando TLR-4 y TLR-3 ó usando células derivadas de ratones Knockout. El mismo argumento puede manejarse para la inducción encontrada con los lisados celulares infectados que no solamente contienen viriones sino también subpartículas virales, subpartículas virales incompletas, RNAdc de replicación, proteínas celulares y muy probablemente citocinas proinflamatorias.

El incremento de la expresión de la molécula de membrana CD40 en CD y macrófagos derivados de médula ósea estimulados es otro parámetro de activación de estas células, por eso realizamos el análisis por citofluorometría de la expresión CD40 en CD y en macrófagos estimulados con componentes del rotavirus. CD40 es un receptor de superficie que pertenece a la familia de receptores de TNF- α . Se expresa en células B, CD, monocitos, macrófagos y células epiteliales. Su ligando CD154 es expresado principalmente en células T CD4⁺ (Banchereau *et al.*, 1994; Van Kooten *et al.*, 2000). La unión de CD40 con su ligando tiene importantes consecuencias en las CD como incremento en la sobrevivencia de las células, secreción de citocinas (IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α). Además, esta unión altera el fenotipo de las CD al aumentar la expresión de moléculas co-estimuladoras sobre la superficie de las células, tales como CD80 y CD86. De tal manera que la activación de CD40 es una de las señales críticas que permiten la completa maduración de las CD y por lo tanto, da lugar a una

CPA más potente, capaz de inducir la activación y proliferación de células T vírgenes (Banchereau & Steinman 1998; Van Kooten *et al.*, 2000).

En nuestro modelo el RNAdc del virus y el Poli I:C indujeron niveles bajos de expresión de CD40 en las CD, sin embargo, RRV purificado y LPS indujeron niveles altos. Esto sugiere que aunque las CD responden al RNAdc viral y sintético, la inducción de CD40 se da principalmente por las proteínas virales, como se mencionó anteriormente, muy probablemente a través de TLR-4. En el caso de los macrófagos, el incremento en la expresión de CD40 fue bajo cuando se estimuló con el RNAdc viral y el virión purificado y ligeramente mayor con poli I:C y LPS. Estos resultados nos sugieren que los niveles de TLR-3 y TLR-4 en las CD y macrófagos pudieran ser diferentes, sin embargo, no se puede descartar que exista una diferencia en la traducción de señal dependiente de TLR-3 y 4 en las dos extirpes celulares.

La comunicación entre células inmunes es mediada principalmente por citocinas, que promueven crecimiento, diferenciación y activación celular. Estas moléculas efectoras son producidas transitoriamente y controlan localmente la amplitud y la duración de la respuesta. Como se mencionó anteriormente TNF- α , IL-12 son citocinas pro-inflamatorias secretadas por los macrófagos y las CD, que se incrementan en algunas infecciones por patógenos intracelulares y por la estimulación a través del TLR-3 y 4, siendo capaces de participar en respuestas antivirales *in vivo*. En cambio la citocina IL-10 funciona como regulador de macrófagos y CD activados en las respuestas inmunitarias. Con la finalidad de determinar si los componentes del rotavirus son capaces de inducir la producción de TNF- α , IL-12 e IL-10 en macrófagos y CD derivadas de MO, el RNAm para estas citocinas se cuantificó por PCR tiempo real. En las CD los RNAdc viral y sintético casi no indujeron ninguna de las citocinas analizadas, sin embargo, el RRV purificado indujo una respuesta potente de las 3 citocinas, por lo que muy probablemente en estas células las proteínas virales y no el genoma del rotavirus son las principales estimuladoras. En los macrófagos las respuestas fueron más heterogéneas ya que el RNAdc viral indujo tanto TNF- α como IL-10, Poli I:C TNF- α solamente y el virión indujo solamente una respuesta potente de IL-10. Esto sugiere que en el caso de los macrófagos el RNAdc viral podría estar generando una respuesta un poco diferente que el RNAdc sintético probablemente por sus características fisicoquímicas particulares y que el virión pudiera estimular predominantemente una respuesta inhibitoria principalmente a través de alguna(s) de sus proteínas.

En conclusión, podemos decir que el genoma de rotavirus compuesto por RNAdc es capaz de estimular a células de la respuesta inmune innata como CD, macrófagos y células epiteliales de ratón muy probablemente a través de TLR-3. Sin embargo, el efecto sobre los marcadores

analizados fue heterogéneo, predominando la respuesta microbicida del NO. Esto podría deberse a efectos diferenciales en los mecanismos de traducción de señal generados por TLR-3, dependiendo de la extirpe celular y los promotores involucrados. De esta manera, sería sumamente interesante en un futuro analizar en detalle la traducción de señal de estas células en respuesta a un estímulo con RNAdc. Finalmente, estos resultados confirman y amplían observaciones previas por Matsumo (2003) y Alexopoulou (2001).

En base a lo anterior, se podría proponer que en una infección in vivo las células epiteliales intestinales podrían responder al virus entrante reconociendo sus proteínas y su genoma a través de diferentes TLR's, iniciando la respuesta inmune aún antes de que se haya establecido la infección. En ese momento las células epiteliales podrían secretar INF's del tipo I y quimiocinas que activarían a los macrófagos y CD de la lámina propia intestinal y placas de Peyer. Una vez que la infección se haya establecido los viriones, las subpartículas virales y el RNAdc en formación podrían generarse en gran cantidad y al morir las células estos productos entrarían en contacto en forma masiva con los compartimientos mencionados y activarían aún más a los macrófagos y CD, conduciendo a un estado antimicrobiano en el intestino y a una eficiente respuesta inmune adquirida. Aunque el ambiente intestinal es un ambiente regulador por la gran cantidad de TGF- β e IL-10 presente, es muy probable que in vivo las CD, macrófagos y células epiteliales puedan responder hacia los componentes del rotavirus a través de los TLRs como sugieren los resultados de las células incubadas en presencia de SBN de intestinos mostrados en este trabajo.

IX. CONCLUSIONES

1.- El genoma de rotavirus, compuesto por 11 segmentos de RNAdc, es capaz de estimular a células de la respuesta inmune innata como las CD, los macrófagos y las células epiteliales, muy probablemente a través de TLR-3.

2.- La estimulación por RNAdc en las CD y los macrófagos resulta en la inducción diferencial de NO, CD40 y citocinas. La respuesta más marcada es con la producción de NO. Esto pudiera ser probablemente resultado de diferentes niveles de expresión de TLR-3 y de la traducción de señal regulada por el tipo celular y el umbral de activación de los promotores específicos.

3.- En base a estos resultados, es muy probable que tanto los enterocitos como las CD y los macrófagos intestinales, entre otras células de la respuesta inmune innata, juegan un papel importante en el inicio de la respuesta inmune contra la infección por el rotavirus al ser estimuladas por sus proteínas y su genoma a través de diferentes TLR's.

X. PERSPECTIVAS

1. Medir la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80, CD86 y MHCII en CD, macrófagos y epiteliales cultivadas en presencia de SBN de intestino de ratón infectado o no con rotavirus.
2. Medición de otras citocinas implicadas en la infección por rotavirus en células dendríticas y macrófagos.
3. Realizar ensayos de transferencia de CD, macrófagos estimulados con RNAdc y virus purificado RRV para determinar si el estímulo dado por las CD y macrófagos es capaz de dar protección.
4. Realizar ensayos de transfección de células que no expresen TLR-3 con el gen de esa proteína y evaluación del RNAm por RT-PCR en células transfectadas y presencia de proteína.
5. Identificación de TLR3 a nivel de proteína con Ac específicos por citofluorometría en células dendríticas, macrófagos y epiteliales estimuladas con RNAdc de rotavirus.
6. Bloquear la respuesta con anticuerpos anti TLR-3 ó generar CD y macrófagos de médula ósea de ratones Knockout en TLR-3 los cuales no deberían responder a estos estímulos.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, A., Lichtman, A., & Pober, J., 2002. *Inmunología Celular y Molecular*. McGraw-Hill, United states of America.
2. Aderem, A & Underhill, D.M.1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Ann. I Rev. Immunol.* **17**: 593-623.
3. Akira, S. 2003. Mammalian toll-like receptors. *Current Opinion in Immunol.* **15**:5-11.
4. Akira S, & Takeda K. 2004 Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *C R Biol.* **32** (6) :581-9.
5. Akira, S., Takeda K., & Kaisho, T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquire immunity. *Nature Immunology* **2** (8): 675-680.
6. Arias, C. F. & López, S. 2000. Los rotavirus. (Ed) Martínez E y Martínez JC (Ed). *Microbios en línea*. Cap 17.CIFN. UNAM. México 1-16.
7. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov & Clavel R. 2001. Recognition of double stranded RNA and activation of NF-kB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**. 732-738.
8. Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi JP, van Kooten C, Liu YJ, Rousset F, & Saeland S. 1994. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol.***12**:881-922.
9. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y, Pulendran B, & Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunology.* **18**:767-811.
10. Bancherau J & Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of inmunity. *Nature* **329**:245-252.
11. Bican P, Cohen J, Charpilienne A, & Scherrer R. 1982. Purification and characterization of bovine rotavirus cores. *J Virol. Sep;***43**(3):1113-7.
12. Bishop, R. F., G. P. Davidson, I. H. Holmes. & B. J. Ruck 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet*:1281-1283.
13. Blutt SE, Crawford SE, Warfield KL, Lewis DE, Estes MK. & Conner ME .2004. The VP7 Outer Cpasid Protein of Rotavirus Induces Polyclonal B-Cell Activation. *J. of Virology* **78**(13):6974 –6981.
14. Blutt S, Crawford S, Warfield K, Lewis D, Estes M. & Conneer M. 2004^b. B cell activation by rotavirus requires TLR4 and VP7. 8TH International Symposium on Double-Stranded RNA viruses. Il Ciocco Castevecchio Pascoli, Italy. P99.
15. Blutt S, Warfield KL, Lewis DE. & Conner ME. 2002. Early response to rotavirus infection involves massive B cell activation. *J Immunol.* **168**(11):5716-21.
16. Bowie AG. & Haga IR. 2005. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Mol Immunol.***42**(8): 859-67.
17. Both, G. W., A. R. Bellamy. & D. B. Mitchell 1994. Rotavirus protein structure and function. *Curr Top Microbiol Immunol* **185**:67-105.
18. Bruce M, Campbell I, Xiong Y, Redmon M. & Snodgrass D. 1994. Recognition of rotavirus antigens by mouse L3T4-positive T helper cells. *J Gen Virol.* Aug. **75** (8):1859-66.
19. Buesa J, Raga J, Colomina J, Souza O, Munoz C. & Gil M. 1999. Rotavirus-specific Cytotoxic T lynfocytes recognize overlapping epitopes in the amino-terminal region of the VP7 Glycoprotein. *Virology.***257**(2):424-37.
20. Burns J, Siadat-Pajouh M, Krishananey A. & Greenberg H. 1995. Protective effect of Rotavirus VP6-Specific Ig A monoclonal antibobies that lack neutralizing activity. *Science.* **272**:104-107.
21. Carbone F, Heath W. 2003. The role of dendritic cell subset in immunity to viruses. *Current Opinion in Immunol.* **15**:416-420.
22. Clark F, Glass, R.I. & Offit, P.A. 2000. Rotavirus Vacciness. Selected vaccines of the future.987-1005.
23. Chan CW, Crafton E, Fan HN, Flook J, Yoshimura K, Skarica M, Brockstedt D, Dubensky TW, Stins MF, Lanier LL, Pardoll DM. & Housseau F. 2006 Interferon-producing killer

- dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med.* **12**(2):207-13. Epub. Jan 29.
24. Chen, D., C. Q. Zeng, M. J. Wentz, M. Gorziglia, M. K. Estes, & R. F. Ramig 1994. Template-dependent, in vitro replication of rotavirus RNA. *J Virol.* **68**:7030-7039
 25. Cohen, J., A. Charpilienne, S. Chilmonczyk, & M. K. Estes 1989. Nucleotide sequence of bovine rotavirus gene 1 and expression of the gene product in baculovirus. *Virology.* **171**:131-140.
 26. Ciarlet, M. & Estes, M.K. 2001. Interactions between rotavirus and gastrointestinal cells. *Curr Opin Microbiol* **4**: 435-41.
 27. Cook, S. M., R. I. Glass, C. W. LeBaron, & M.-S. Ho 1990. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ.* **68**:171-177.
 28. Dharakul T, Rott L, & Greenberg HB. 1990. Recovery from chronic rotavirus infection in mice with severe combined immunodeficiency: virus clearance mediated by adoptive transfer of immune CD8+ T lymphocytes. *J Virol. Sep*; **64**(9):4375-82.
 29. Dector MA, Romero P, Lopez S. & Arias CF. 2002. Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO Rep.* **3**(12):1175-80.
 30. Du Pasquier, L. 1992. Origin and evolution of the vertebrate immune system. *APMIS.* **100**: 383-392.
 31. Esquivel FR, Lopez S, Guitierrez L, Arias C. 2000. The internal rotavirus protein VP6 primes for an enhanced neutralizing antibody responses. *Arch Virol.* **145** (4) :813-25
 32. Estes, M. K. & J. Cohen 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev.* **53**:410- 449.
 33. Estes MK. 1996. Rotavirus and their replication. *Viol. B. N. Fields. D. N. Knipe, P. M. Howley et al. New York. Raven Press.* **2**: 1625-1655.
 34. Fearon, D. T. & Locklsey, R.M. 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired response. *Science.* **272**:50-53
 35. Finberg W. & Kurt-Jones. 2004. Viruses and Toll-like receptors. *Microbes and infection* **6**:1356-1360.
 36. Fleisher TA, Bleesing JJ. 2000. Immune function. *Pediatr Clin North Am.* Dec; **47**(6):1197-209. Review.
 37. Flewett, T H., Bryden, A.S. Davis, H. Woode, G.N. & Bridger J.C. 1974. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* **2**:61-63.
 38. Franco M. & Greenberg H. 1997. Immunity to rotavirus in T cell deficient mice. *Virology.* **238**(2):169-179.
 39. Franco MA, Feng N. & Greenberg HB. 1996. Rotavirus immunity in the mouse. *Arch Virol* **12**: 41-52.
 40. Franco M, Prieto I, Labbé M, Poncet D, Borrás-Cuestas F. & Cohen J. 1993. An immunodominant cytotoxic T cell epitope on the VP7 rotavirus protein overlaps the H2 signal peptide. *J Gen Virol.* **74** (12):2579-86.
 41. Franco MA & Greenberg HB. 1999. Immunity to rotavirus infection in mice. *J Infect Dis.* **179** (3):S466-9.
 42. Fukuhara, N., K. Nishikawa, M. Gorziglia. & A. Z. Kapikian 1989. Nucleotide sequence of gene segment 1 of a porcine rotavirus strain. *Virology.* **173**:743-749.
 43. Gallegos, C. O., & J. T. Patton 1989. Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology.* **172**:616-627.
 44. Gorziglia, M., C. Larrea, F. Liprandi, & J. Esparza 1985. Biochemical evidence for the oligomeric (possibly trimeric) structure of the major inner capsid polypeptide (45K) of rotaviruses. *J Gen Virol.* **66**:1889-1900.
 45. Goldsby R.A., Thomas, J. K., Osborne B. A. Kuby Immunology. W.H. Freeman and company. Cuarta Edición. 2001.
 46. Gray, J. & Desselberg, U. Rotavirus. *Methods and Protocols.* Human Press. 2000.
 47. Greenberg, S. & Silverstein, S. 1993. Phagocytosis. In: Poul, w. E. (ed) *Fundamental Immunology*, Raven Press. 941.

48. Griscavage JM, Rogers NE, Sherman MP, & Ignarro LJ. 1993. Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. *J Immunol.* Dec 1; **151**(11):6329-37.
49. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel, L, Thery C. & Amigorena S. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* **20**:621-667.
50. Hashimoto C, Hudson K L. & Anderson K V. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorso-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell.* **52**: 269-279.
51. Heath R & Villalobos A. 2005. No driving without a license. *Nature Publishing Group. News and Views.*
52. Imai, M., K. Akatani, N. Ikegami, & Y. Furuichi 1983. Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. *J Virol.* **47**:125-136.
53. Inaba K. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *JEM.* **176**: 1693-1702.
54. Kapikian A, Hocino Y. & Chanock RM. 2001. Rotaviruses. In: Knippe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*, Vol II. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins. pp. 1787-1834.
55. Kumar-Vijay M., Gentsch JR, Kaiser, JW, Borregaard N, Offermann KM, Neish SA. & Gewirtz, AT. 2005. *J. of Immunology*, **174**:6322-6331.
56. Kushnir N, Bos N A, Zuercher A W, Coffin S E, Moser C A. & Cebra J J. 2001. B2 but no B1 cells can contribute to CD4⁺ T-cell-mediated clearance of rotavirus in SCID mice. *Journal of Virology.* **75**:5482-90.
57. Labbe M, Baudoux P, Charpilienne A, Poncet D, Cohen J. 1994. Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein. *J Gen Virol.* Dec; **75** (Pt 12):3423-30.
58. Lalani I, Bhol K, & Ahmed AR. 1997. Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. *Ann Allergy Asthma Immunol.* Dec; **79**(6):469-83. Review. Erratum in: *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998 Mar; **80**(3):A-6.
59. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J M, & Hoffmann J A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* **86**: 973-983.
60. Litinski MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Casali P, & Cerutti A. 2002. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through Blys and APRIL. *Nature Immunology.* **3**(9):822-828.
61. Liu, M., N. M. Mattion, & M. K. Estes 1992. Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology.* **188**:77-84.
62. Lopez S. & Arias C. 2003. Los rotavirus en línea. [Http://biblioweb.dgsca.UNAM.mx/libros/microbios/cap 17/](http://biblioweb.dgsca.UNAM.mx/libros/microbios/cap 17/).
63. Lopez S. & Arias C. 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol* **12**:271-8.
64. Lopez T, Camacho M., Zayas M., Najera R., Sánchez R., Arias CF., & Lopez S., 20005^a. Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J Virol* **79**: 189-92.
65. Lopez T, Camacho M., Zayas M., Ayala- Breton C., Arias CF., & Lopez S., 20005^b. Reduced expresión of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. *J Gen Virol* **86**: 1609-17.
66. Lowenstein DJ, Alley LW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH. & Russell SW. 1993. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*; **90**: 9730-9734.
67. Luster DA. 2002. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Current Opinion in Immunol.* **14**: 129-135.
68. Lutz M, Kukutsch N, Ogilvie A, Röchner S, Koch Franz, Nikolaus R. & Schuler G. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunol Methods* **223**: 77-92.

69. Mansell, E. A., R. F. Ramig, & J. T. Patton 1994. Temperature-sensitive lesions in the capsid proteins of the rotavirus mutants tsF and tsG that affect virion assembly. *Virology*. **204**:69-81.
70. Martin P, Del Hoyo GM, Anjuere F, Arias CF, Vargas HH, Fernandez-L A, Parrillas V, Ardavin C. 2002. Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood*. Jul 15;**100**(2):383-90.
71. Martínez del Hoyo G, Martin P, Vargas HH, Ruiz S, Arias CF. & Ardavin C. 2002. Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature*. **415**(6875):1043-7.
72. Mathieu, M., I. Petitpas, J. Navaza, J. Lepault, E. Kohli, P. Pothier, B. V. Prasad, J. Cohen, & F. A. Rey. 2001. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *Embo J*. **20**:1485-1497.
73. Mattion NM., Mitchell DB., Both GW.,& Estes MK. 1991. Expresión of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology* **181**, 295-304.
74. Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A. & Seya T. 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol*. 171(6):3154-62. Erratum in: *J Immunol*. Nov 1;171(9):4934.
75. McCrae, M. A. & J. G. McCorquodale 1983. Molecular biology of rotaviruses. V. Terminal structure of viral RNA species. *Virology*. **126**:204-212.
76. McNeal M, Rae M. & Ward R. 1997. Evidence that resolution of rotavirus infection in mice is due to both CD4 and CD8 cell-dependent activities. *J. Virol*. **71**:8735-8742.
77. Medzhitov R, Janeway C Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. 2000. *Trends Microbiol*. Oct;**8**(10):452-6. Review
78. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P. & Janeway C A Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptative immunity. *Nature* **388**: 394-97.
79. Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. **1**(2):135-45.
80. Mellman I. & Steinman M. 2001. Dendritic cells: Specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* **106**:255-258.
81. Mitchell, D. B., and G. W. Both 1990. Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequences of segments 1, 2, and 3. *Virology*. **177**:324-331.
82. Moncada S, Palmer RMJ. & Higgs EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*; **43**: 109-142.
83. Moron G, Rueda P, Casal I and Leclerc C. 2002. CD8 α ⁻, CD11b⁺ dendritic cells present exogenous virus like particles to CD8⁺ T cells and subsequently express CD8 α and DEC-205 molecules. *J. Exp Med*. 1233-1245.
84. Mosser, M. D.2003. The many faces of macrophage activation. *Journal of leukocyte Biology*. **73**:209-212.
85. Muzio, M. Bosisio, D., Polentarutti, N., Ciovanna, D`amico G, Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van` t Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena, P. & Mantovani, A.2000. Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: Selective expression of TLR-3 in dendritic cells. *J Immunol*.5998-6004.
86. Nakagomi, O. & T. Nakagomi 1991. Genetic diversity and similarity among mammalian rotaviruses in relation to interspecies transmission of rotavirus. *Arch Virol*. **120**:43-55.
87. Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* **6**: 3051-3064.
88. Nathan C. & Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; **269**: 13725-13728.
89. Offit PA, Coupar BE, Svoboda YM, Jenkins RJ, McCrae MA, Abraham A, Hill NL, Boyle DB, Andrew ME. & Both GW. 1994. Induction of rotavirus-specific cytotoxic T lymphocytes by vaccinia virus recombinants expressing individual rotavirus genes. *Virology*. **198**(1):10-6.
90. Osborne MP, Haddon SJ, Collins J, Starkey WG, Wallis TS, Clarke GJ, Worton KJ, Candy DC, Stephen J. 1998. An Electron Microscopic Investigation of Time- related

- changes in the intestine of neonatal mice infected of murine rotavirus; *Journal of pediatric Gastroenterology and Nutrition*; **7**:236-248.
91. Parashar U D, Hummelman E G, Bresse J S, Millar M A, & Glass R I. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* **9**(5): 565-72.
 92. Patton. JT.1995. Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *J Gen Virol.* **76**(11):2633-44.
 93. Patton, J. T. & D. Chen 1999. RNA-binding and capping activities of proteins in rotavirus open cores. *J Virol.* **73**:1382-1391.
 94. Patton. J. T. & Spencert, E. 2000. "Genome replication and packaging of segment double-stranded RNA viruses". *Virology.* **277**:217-225.
 95. Pizarro, J. M., J. L. Pizarro, J. Fernandez, A. M. Sandino & E. Spencer 1991. Effect of nucleotide analogues on rotavirus transcription and replication. *Virology.* **184**:768-772.
 96. Pulendran B, Maraskovsky E, Banchereau J, Maliszewski C. 2001. Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends in Immunol.* **22**:41-47.
 97. Prasad, B. V.V. & Chiu, W. 1994. "Structure of rotavirus" . *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.* **185**: 9-29.
 98. Prasad BV, Wang, GJ, Clerx JP and Chiu W. 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Bio.* **199**: 296-275.
 99. Ramig RF. 2004. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol.* Oct;**78**(19):10213-20.
 100. Rabinovich, M. 1967. The dissociation of the attachment and ingestion phases of phagocytosis by macrophages. *exp. Cell res.* **46**:19
 101. Reis e Sousa C. 2004. Toll-like receptors and dendritic cells: for Whom the bug tolls. *Seminars in Immunology.* **16**: 27-34.
 102. Rescigno M. 2002. Dendritic cells and the complexity of microbial infection. *Trends in Microbiology.* **10** (9): 425-431.
 103. Rivest P, Proulx M, Lonergan G, Lebel M. & Bédard L. 2004. Hospitalisations for gastroenteritis: the role of rotavirus. *Vaccine* **22**: 2013-2017.
 104. Roake J A, Rao A S, Morris P J, Larsen C P, Hankins D F. & Austyn J M. 1995. Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J Exp Med.* **181**: 2237-2247.
 105. Sabara, M., K. F. Ready, P. J. Frenchick, & L. A. Babiuk 1987. Biochemical evidence for the oligomeric arrangement of bovine rotavirus nucleocapsid protein and its possible significance in the immunogenicity of this protein. *J Gen Virol.* **68**:123-133.
 106. Salem ML, Kadima AN, Cole DJ. & Gillanders WE. 2005 Defining the antigen-specific T-cell response to vaccination and poli (I:C)/TLR3 signaling: evidence of enhanced primary and memory CD8 T-cell responses and antitumor immunity. *J Immunother.* **28**(3):220-8.
 107. Salter M, Knowles RG, & Moncada S. 1991. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett* **291**: 145-149.
 108. Sandino, A. M., M. Jashes, G. Faundez, & E. Spencer 1986. Role of the inner protein capsid on in vitro human rotavirus transcription. *J Virol.* **60**:797-802.
 109. Shaw R D, Greenberg H B, & Estes M K. 1999. Rotaviruses (*Reoviridae*). *Acad. Press.* Schwarzer, E., Turrini, F., Ulliers, D., garibaldi, g., Ginsburg, H., & Arase, P., 2004. impairment of macrophages functions after ingestion of Plasmodium falciparum- infected erithrocites or isolated malaria pigment. *J. exp. Med.* **176**:1033-1041.
 110. Shroder, K., Hertzog, P., Ravasi, T., & Hume, D., 2004. Interferon-g: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leuk Biol.* **75**:163-189.
 111. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, & Smith PD. 2005. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest.* Jan;**115**(1):66-75.
 112. Sompayrac, L., 2000. How the immune system works. Blackwell Science. USA.

113. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, & Nathan CF. 1991. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 1; **88**(17):7773-7.
114. Steinman R M, & Cohn Z A. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* **137**; 1142-1162.
115. Takeda K & Akira S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*. **17**:1, 1-14.
116. Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG. & Weissman IL. 2000. Development of CD8 α -positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science*. **15**;290(5499):2152-4.
117. Trombetta S E, & Mellma I. 2005. Cell Biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol*. **23**:975-1028.
118. Vancott, J.L., Mcneal, M.N., Choi, A.H. & Ward, R.L. 2003. The role of interferons in rotavirus infections and protection. *J. Interferon Cytokine Res*. **23**:163-170.
119. Van Kooten C, & Banchereau J. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*. Jan; **67**(1):2-17.
120. Vidal K, Grosjean I, Revillard JP, Gespach C. & kaiserlian D. 1993. Immortalization of mouse intestinal epithelial cells by the SV40-T gene Phenotypic and immune characterization of the MODE-K cell line. *J. of Immunological Methods*. **166**: 63-73.
121. Ward RL, McNeal MM & Sheridan JF. 1990. Development of an adult mouse model for studies on protection against rotavirus *J. Virol*. **64**, 5070-5075.
122. Ward RL. 1996. Mechanisms of protection against rotavirus in humans and mice. *J Infect Dis*. Sep; **174** Suppl **1**:S51-8.
123. Weissman, Travel. 2000. Development of CD8 α positive dendritic cells from a common myeloid progenitor *Science* 2152-2154.
124. Wentz, M. J., J. T. Patton, & R. F. Ramig 1996a. The 3'-terminal consensus sequence of rotavirus mRNA is the minimal promoter of negative-strand RNA synthesis. *J Virol*. **70** (11) : 7833- 7841.
125. Wentz, M. J., C. Q. Y. Zeng, J. T. Patton, M. K. Estes, & R. F. Ramig 1996b. Identification of the minimal replicase and the minimal promoter of (-)-strand synthesis, functional in rotavirus RNA replication in vitro. *Arch Virol*. **12**:59-67.
126. Wright CD, Mülsch A, Busse R, & Oswald H. 1989. Generation of nitric oxide by human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* **160**: 813-819.
127. Zal T, Volkman A, & Stockinger B. 1994. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med*. Dec 1; **180**(6):2089-99.
128. Zeng, C. Q. Y., M. J. Wentz, J. Cohen, M. K. Estes, & R. F. Ramig 1996. Characterization and replicase activity of double-layered and single-layered rotavirus-like particles expressed from baculovirus recombinants. *J Virol*. **70**:2736-2742.