



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**



POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**EFFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE LOS
SUPRESORES DE SEÑALES DE
CITOCINAS SOCS1 Y SOCS3 SOBRE LA
RESPUESTA DE LINFOCITOS T A LA
INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL DENGUE**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

PRESENTA:

B.M. ALICIA HELENA MÁRQUEZ BANDALA

ASESORES DE TESIS:

**D.C. LILIAN KAREM FLORES MENDOZA (CIBIOR-IMSS)
D.C. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA (CICM-ICUAP)**

PUEBLA, PUE.

ENERO, 2017

Dedicatoria

A mi Madre, mi Guía Espiritual, mi inspiración, mi más grande ejemplo y mi mayor fuente de fortaleza, la prueba de que hay Ángeles caminando en la Tierra. Todos estos años mi Madre siempre me aseguró que podría lograr lo que yo quisiera lograr y podría ser quien yo quisiera ser, me ha guiado con paciencia y amor y no estoy segura si es consciente que a lo único que en realidad he aspirado todo este tiempo es Ser como Ella.

A mi Padre, mi Maestro de Vida, quien todos y cada uno de los días me ha dado su apoyo. Gracias, porque en el más grande acto de Amor decidiste ser el puente a mi Despertar.

A mi hermana, porque no ha hecho más que amarme, apoyarme y admirarme. La responsabilidad de saber que fui y soy su ejemplo a seguir reafirma mi compromiso a seguir creciendo y superarme.

Agradecimientos

A la Dra. Lilian Flores directora de este trabajo de tesis quien sin duda se ha convertido en un ejemplo de profesionista, mujer y ser humano. Gracias por su paciencia, su calidez, su conocimiento y el apoyo en *todos y cada* uno de los aspectos. Mi más grande admiración hacia usted y no puedo más que sentir gratitud por la oportunidad de haber coincidido.

De manera muy especial al Dr. Julio Reyes-Leyva por abrirme las puertas sin dudarle y darme la oportunidad de aprender y conocer lo que a al día de hoy se vuelto mi objetivo de vida, por su entusiasmo en el trabajo, por sus pláticas y consejos que han llegado en el momento adecuado y, sobre todo, gracias por el voto de confianza en mí.

Dra. Rosa del Carmen Rocha co asesora de este trabajo de tesis y Dra. Patricia Lozano integrante del comité tutorial por no haber quitado el dedo del renglón y tutorial tras tutorial haberme alentado.

Dr. Miguel Castañeda Lucio por todo el apoyo a este su dolor de cabeza y por sus palabras durante estos dos años; Dra. Beatriz Eugenia Baca por su amistad, por su calidez, sus pláticas y sus consejos. Ambos profesionistas destacables y, en definitiva, un modelo a seguir.

A mi otra familia, Pamela Landa mi amiga y hermana, por no soltar mi mano a lo largo de estos años; Luis Pérez, mi confidente y amigo incondicional, gracias infinitas por estar; Edwin Méndez mi amigo, cómplice y hermano; Ezequiel Lizárraga, mi Ángel de la Guarda, porque tu apoyo y amor fue clave para todo este proceso; Jackeline Martínez, a quien tengo la fortuna de llamar amiga.

Jessica Gómez y Dalia Icea, mis puntos de destino, mis compañeras y amigas. Gracias por todos los momentos, por el aprendizaje y las lecciones de vida que hemos compartido. *Gracias por cumplir con nuestra cita, gracias por haber llegado a tiempo.*

A los integrantes del Laboratorio de Inmunología especialmente Wendy Ciriaco y Franco Amaro, ambos extraordinarios Seres, llenos de luz y alegría. En definitiva, esta experiencia no hubiera sido la misma sin todo su apoyo y compañía.

A los químicos Blanca Bañuelos, Luis Márquez y Martin Luna, por todo sus consejos, apoyo, paciencia y conocimiento.

Por último, pero no menos importante, al Dr. Mauricio Ochoa. Mau, sigues siendo un ejemplo para mí, un excelente profesionista y un gran ser humano, gracias, porque aún en la distancia tu amistad me sigue enriqueciendo.

Haz solo lo que amas y serás feliz. Y el que hace lo que ama está benditamente condenado al éxito, que llegará, cuando deba de llegar, porque lo que debe ser será y llegará así, naturalmente.

F. C.

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación Biomédica de Oriente del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIOR-IMSS) en colaboración con el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y la Comunidad del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas CIMC-ICUAP.

El presente trabajo recibió financiamiento por el Fondo de Investigación en Salud-IMSS (IMSS/FIS/PROT/G11/975) y Fondos para la infraestructura científica-IMSS (CTFIS/1ORD/12/2011).

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) el apoyo brindado mediante la beca número 333757 para cursar el programa de Maestría en Ciencias (Microbiología) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Se agradece al Instituto Mexicano del Seguro Social por el apoyo brindado como Becario de Investigación en el Centro de Investigación Biomedica de Oriente (matricula 98228724).

INDICE GENERAL

Resumen	I
Lista de Tablas	II
Lista de Figuras	II
Abreviaturas y Unidades de Medida	IV
I. Introducción	1
1. Virus Dengue	2
2. Ciclo de replicación	5
3. Epidemiología	7
4. Cuadro Clínico	9
5. Inmunopatología del Dengue	12
6. Papel de los linfocitos T en la infección por el virus dengue	15
7. Proteínas SOCS	16
8. Proteínas SOCS y la diferenciación de linfocitos Th1/Th2	19
II. Antecedentes	20
1. Proteínas SOCS y su relación con la respuesta antiviral	20
III. Justificación	22
IV. Hipótesis	22
V. Objetivos	23
1. Objetivo General	23
2. Objetivos Particulares	23
VI. Materiales y Métodos	23
1. Material Biológico	24
2. Separación de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMN)	24
3. Estandarización de la diferenciación de células dendríticas a partir de CMN de sangre periférica	25
3.1 Concentración óptima de CMN y determinación del tiempo óptimo para adherencia	25
3.2 Concentración óptima de las citocinas Interleucina 4 (IL4) y Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GMCSF) para inducir la diferenciación de células dendríticas	26
4. Fenotipificación de células dendríticas	26
5. Infección de Células Dendríticas	27
6. Estandarización de las condiciones de silenciamiento y silenciamiento de los genes <i>socs1</i> y <i>socs3</i> en linfocitos T	27
6.1 Condiciones de cultivo	28
6.2 Validación de PCR en tiempo real	28
6.2.1 Extracción de ARN y Transcripción reversa ...	28

	6.2.2 Construcción del rango dinámico para los genes <i>socs1</i> y <i>socs3</i>	28
	6.3 Concentración óptima (nM/mL) de siRNA	29
	7. Co-cultivo de células dendríticas diferenciadas y linfocitos T silenciados	30
	8. Cuantificación de IL10 por método de ELISA	32
	9. Análisis de Proliferación e Índice de Activación de células T proliferantes	33
	10. Análisis Estadístico	34
VII.	Resultados	34
	1. Estandarización de la diferenciación de células dendríticas a partir de CMN de sangre periférica	34
	1.1 Concentración óptima de Células Mononucleares CMN	34
	1.2 Concentración óptima de las citocinas Interleucina 4 (IL4) y Factor Estimulante de Granulocitos y Macrófagos (GMCSF) para inducir la diferenciación de células dendríticas	37
	2. Fenotipificación de células dendríticas	40
	3. Rango dinámico para los genes <i>socs1</i> y <i>socs3</i>	42
	4. Silenciamiento de los genes <i>socs1</i> y <i>socs3</i> en linfocitos T	42
	5. Efecto del silenciamiento de los genes <i>socs1</i> y <i>socs3</i> en la producción de IL10	44
	6. Proliferación y activación de células T	46
VIII.	Discusión	49
	1. Diferenciación de células dendríticas	49
	2. Silenciamiento de los genes <i>socs1</i> y <i>socs3</i>	51
	3. Efecto del silenciamiento de los genes <i>socs1</i> y <i>socs3</i> en la producción de IL10 y la activación y proliferación de células T	54
IX.	Conclusiones	56
X.	Perspectivas	57
XI.	Anexos	58
XII.	Referencias	58

Resumen

El dengue es una de las principales enfermedades virales de carácter epidémico. A pesar de la creciente comprensión de distintos aspectos de la enfermedad, la patogénesis del dengue aún no ha sido completamente elucidada; diversos estudios han puesto de manifiesto el papel del sistema inmune en el desarrollo de casos severos. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del silenciamiento de las proteínas Supresoras de Señales de Citocinas SOCS1 y SOCS3 en linfocitos T sobre la producción de IL10 para lo cual, a partir de sangre periférica de donadores sanos, se obtuvieron dos tipos celulares distintos: monocitos y linfocitos. Los monocitos fueron utilizados para obtener células dendríticas al diferenciarse con las citocinas IL4 y GM-CS y los linfocitos obtenidos fueron tratados con RNA de silenciamiento específico para los genes *socs1* y *socs3*, así como controles (que no inducen ningún silenciamiento). Ambas poblaciones, células dendríticas y linfocitos T silenciados, fueron puestos en contacto para determinar en linfocitos, el efecto del silenciamiento de las proteínas SOCS1 y SOCS3 en la producción de IL10 bajo el estímulo de células dendríticas infectadas con el virus dengue serotipo 2. Los resultados muestran que las concentraciones 2.5nM y 5nM de los siRNA específicos para *socs1* y *socs3* son eficientes para el silenciamiento de ambos genes y el patrón diferencial de expresión de transcritos de *socs* coincide con el reportado en la bibliografía; además, las concentraciones 2.5 nM de los siRNA para *socs1* y *socs3* induce la producción de menores concentraciones de IL10 respecto a las células control infectadas con DENV mientras que la concentración 5 nM del siRNA específico para *socs3* induce una mayor producción de IL10 en relación a las células control infectadas con DENV. La proliferación y activación de células T es dependiente de la concentración de ARNi.

Palabras Clave: Dengue, Proteínas SOCS, silenciamiento, siRNA, Interleucina 10 (IL10).

Lista de Tablas

Tabla I.	Iniciadores de PCR en tiempo real utilizados para los genes blanco	29
----------	--	----

Lista de Figuras

Figura 1.	Estructura del virión y esquema de la poliproteína del virus DENV	3
Figura 2.	Ciclo de replicación del virus DENV	6
Figura 3.	Áreas en riesgo de transmisión de Dengue	8
Figura 4.	Estructura de las proteínas SOCS	17
Figura 5.	Esquema de la función biológica de las proteínas SOCS ..	18
Figura 6.	Mapa de los ARN de interferencia utilizados para los genes A) <i>socs1</i> y B) <i>socs3</i>	30
Figura 7.	Protocolo de silenciamiento y diferenciación de células para el ensayo de co-cultivo	32
Figura 8.	Células diferenciadas obtenidas utilizando diferentes concentraciones de CMN y las concentraciones 200 ng/mL de GMCSF y 100ng/mL de IL4	35
Figura 9.	Evaluación de la concentración óptima de células mononucleares	36
Figura 10.	Células diferenciadas obtenidas utilizando diferentes concentraciones de las citocinas GMCSF e IL4	37
Figura 11.	Evaluación de la concentración óptima de las citocinas GMCSF e IL4	39
Figura 12.	Fenotipificación de células dendríticas	41
Figura 13.	Curvas de validación de RT-PCR en tiempo real para los genes <i>socs1</i> y <i>socs3</i> utilizando HPRT como gen endógeno	42
Figura 14.	Expresión relativa del gen <i>socs1</i> en Linfocitos T transfectados con las diferentes concentraciones del siRNA- <i>socs1</i>	43
Figura 15.	Expresión relativa del gen <i>socs3</i> en Linfocitos T transfectados con las diferentes concentraciones del siRNA- <i>socs3</i>	43
Figura 16.	Cinética de la producción de IL10 en cultivos de células dendríticas infectadas con DENV2	44
Figura 17.	Cinética de la producción de IL10 en co cultivos de células dendríticas y linfocitos T silenciados en <i>socs1</i> y <i>socs3</i>	45
Figura 18.	Cinética de la producción de IL10 en co cultivos de células dendríticas y linfocitos T silenciados en <i>socs1</i> y <i>socs3</i>	46

Figura 19.	Secuencia de análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo	47
Figura 20.	Índice de Proliferación de células T	48
Figura 21.	Índice de activación de células T	49
Figura 22.	Interacción entre células dendríticas y linfocitos T	58

Abreviaturas y Unidades de Medida

Abreviaturas

ADNc	ADN complementario
ANDEVA	Análisis de Varianza
ARNi	ARN de interferencia
CFSE	Carboxyfluorescein N-succinimidyl ester
CMN	Células mononucleares
DENV	Virus Dengue (Del inglés Dengue Virus)
FD	Fiebre por Dengue
FHD	Fiebre Hemorrágica por Dengue
GMCSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrofagos
hpc	Horas post co-cultivo
IL4	Interleucina 4
LPS	Lipopolisacarido
MOI	Indice de Multiplicidad de Infección
PHA	Fitohemaglutinina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Suero Fetal Bovino
siRNA	Pequeño ARN de interferencia (Del inglés Small Interfieriing RNA)
SD	Síndrome de Choque por Dengue

Unidades de Medida

kDa	Kilo Dalton
°C	Grados Centigrados
rpm	Revoluciones por minuto
cm	Centímetros
µg	Microgramo
mL	Mililitro
ng	Nanogramo
UI	Unidades Internacionales
nM	Nanomolar
mg	Miligramo
nm	Nanometro
min	Minuto
hr	Hora
µl	Microlitro
pg	Picogramos

I Introducción

El dengue es una de las principales enfermedades virales de carácter epidémico. Origina entre 50 y 100 millones de casos anuales en más de 100 países, convirtiéndola en la arbovirosis más importante a nivel mundial en morbilidad, mortalidad e importancia económica. En la mayoría de los casos, la enfermedad se presenta como síndrome gripal o cuadro febril indiferenciado conocido como Fiebre por Dengue (FD) sin embargo, algunos pacientes evolucionan a un cuadro clínico caracterizado por dolores intensos, fiebre alta y un incremento en la permeabilidad vascular lo cual conlleva a hemorragias pleurales y gastrointestinales; este cuadro es conocido como Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) y junto con el Síndrome de Choque por Dengue (SD) constituyen las manifestaciones más graves de la enfermedad (Fajardo-Dolci *et al.*, 2012; Torres-Galicia *et al.*, 2014).

El agente etiológico es el Virus Dengue, DENV, transmitido por mosquitos hembra del género *Aedes*, especies *aegypti* y *albopictus*, distribuidos en todos los países tropicales y subtropicales del mundo. La circulación de DENV ocurre cuando el mosquito se alimenta con la sangre de un individuo virémico, de esta manera, se favorece la infección de células epiteliales de su intestino; posteriormente, las partículas virales producidas en estas células son liberadas al hemocele y glándulas salivares, las cuales se convierten en órganos reservorios para el virus. La infección se presenta cuando el mosquito infectado se alimenta nuevamente, liberando saliva y virus durante la picadura (Velandia y Castellanos, 2011; Pérez, 2010).

A pesar de la creciente comprensión de distintos aspectos de la enfermedad, la patogénesis del dengue aún no ha sido completamente elucidada; diversos estudios han puesto de manifiesto el papel del sistema inmune en el desarrollo de casos severos, por lo que estudios que impliquen la evaluación del sistema inmunológico en pacientes con dengue son un factor clave para comprender los factores relacionados con los mecanismos de protección y patogénesis (Guglani y Kabra, 2005; Stephenson, 2011; De Matos *et al.*, 2015).

I.1 Virus Dengue

Los virus Dengue son virus de ARN pertenecientes al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*. El complejo está conformado por cuatro serotipos denominados DENV1 a DENV4 diferenciados de acuerdo a criterios biológicos, inmunológicos y moleculares. Los cuatro serotipos circulan periódicamente en áreas endémicas e hiperendémicas y, sin distinción alguna, causan la enfermedad conocida como dengue (Fajardo-Dolci *et al*, 2012; Torres-Galicia *et al.*, 2014).

Los viriones maduros consisten en un icosaedro de aprox. 50 nm conformado por una membrana lipídica sobre la cual se insertan las proteínas estructurales de membrana *M* (derivada de su proteína precursora prM), fundamental para la maduración de la partícula viral, y la proteína de envoltura *E*, principal inmunógeno del virus e importante por ser la proteína involucrada en la hemaglutinación, neutralización, unión a receptores celulares y tropismo. En el interior del virus, se encuentra un complejo riboproteico no segmentado y de polaridad positiva de aproximadamente 11 Kb el cual codifica para un polipéptido único; dicho polipeptido es procesado de manera co y post traduccional por señalasas del huésped que junto con una serin proteasa codificada por el virus dan lugar a las proteínas estructurales, C, prM y E, y siete proteínas no estructurales, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Fig. 1) (Faheem *et al.*, 2010; Farietta, 2003; Velandia y Castellanos, 2011).

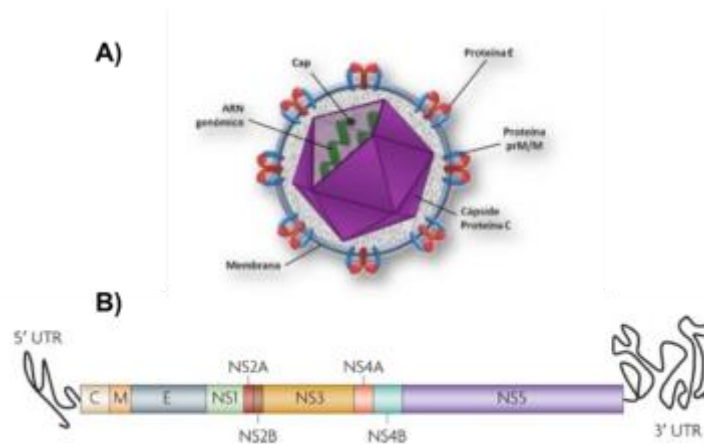


Fig. 1 Estructura del virión y esquema de la poliproteína del virus DENV. A) Conformación del virión de DENV; se muestra la disposición de las diferentes proteínas. B) Organización del genoma del virus dengue; el ARN de cadena sencilla posee un único marco de lectura abierto que comienza con el extremo 5' no traducido y contiene los genes estructurales y no estructurales. Modificado de Guzmán y colaboradores (2010).

El polipéptido procesado tiene diversas funciones; la proteína de la cápside también conocida como *core* o de cubierta es una proteína básica de aproximadamente 11 kDa cuya estructura secundaria consiste en cuatro hélices alfa involucradas con el anclaje de la proteína a la membrana del retículo endoplásmico; particularmente, la hélice 1 ubicada en el extremo N-terminal de la proteína posee aminoácidos de carácter básico que se asocian y unen fuertemente el ARN genómico para formar el complejo riboproteico que protege al ARN viral de la degradación e induce su ensamblaje en partículas. La proteína precursora de membrana prM tiene un peso molecular de 26 kDa y está presente en los viriones inmaduros junto con la proteína M; la proteína es procesada después de la transducción por la proteasa celular furina y participa fundamentalmente en el proceso de maduración del virión. La proteína de envoltura E posee un peso molecular de 50 kDa y tres dominios denominados I, II y III, encontrándose expuesta en la superficie viral en forma de complejos homodiméricos. La importancia funcional de la proteína E radica en que es la única proteína viral que interactúa con las moléculas receptoras de la membrana plasmática de las células blanco y, participa en la fusión del virión con la membrana endosomal a pH ácido; además, la proteína E es el mayor antígeno determinante de la superficie del virus, por lo tanto estimula la respuesta inmune del

hospedero e induce la producción de anticuerpos neutralizadores (Faheem *et al.*, 2010; Umareddy *et al.*, 2007; Velandia y Castellanos, 2011).

Con respecto a las proteínas no estructurales, la proteína NS1 posee un peso de 46 kDa y se asocia a balsas lipídicas de la membrana plasmática; dado que se ha localizado en el sitio de replicación del ARN, se considera que tiene un papel importante en el proceso el cual no ha sido del todo esclarecido. La proteína NS2A es una proteína de aproximadamente 22 kDa relacionada con el ensamblaje del virión y la replicación del ARN, mientras que la proteína NS2B de aproximadamente 14 kDa actúa como cofactor para el complejo NS2B-NS3 serin proteasa. Respecto a la proteína NS3, se reconoce que es una proteína multifuncional de un peso aproximado de 70 kDa; posee en el extremo N-terminal un dominio proteasa y en el extremo C-terminal un dominio que actúa como trifosfatasa de nucleótidos estimulada por ARN (NTPasa) y como Helicasa del ARN (NS3Hel), ambas funciones son indispensables para la replicación viral y regulación del procesamiento de la poliproteína. La proteína NS4A forma parte del complejo de replicación viral; la región C-terminal sirve como secuencia señal para la translocación de NSB4 al lumen del retículo endoplásmico, además, regula la replicación del ARN mediante la interacción con NS3. Por último, la proteína multifuncional NS5 posee en el extremo N-terminal actividad enzimática de metiltransferasa y guanidiltransferasa responsables del capping y la metilación del extremo 5' del ARN genómico; por otra parte, en el extremo C-terminal se ubica el dominio de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRps) (Faheem *et al.*, 2010; Velandia y Castellanos, 2011).

Cabe mencionar que, la región 5' y 3' del genoma son secuencias no codificantes; sin embargo, la región 5' es importante para la replicación viral y traducción, mientras que la región 3' es una cola de poliadenilación relacionada con la circularización del genoma mediante interacción con la región 5' y sus elementos conservados influyen varias propiedades del virus tales como la especificidad del

vector, replicación viral, tropismo celular y patogenicidad y virulencia (Faheem *et al.*, 2010).

I.2 Ciclo de replicación

Se considera que DENV entra a la célula blanco a través de dos diferentes mecanismos; en el primero (Fig. 2), la infección inicia a través de un proceso de endocitosis mediada por receptores dependiente de clatrina (Green *et al.*, 2014); la unión de DENV a la célula es mediada por la proteína E y puede ocurrir a través de múltiples proteínas transmembranales de la célula huésped, las cuales tienen alta afinidad por el dominio III de la proteína. Los factores de unión identificados incluyen a las proteínas de choque térmico HSP90 y HPS70, el heparan sulfato, el receptor de alta afinidad a laminina GRP8/BiP y la molécula CD14; además, se reconoce que DENV puede unirse a través de receptores tipo lectina entre los que destacan el receptor de manosa CD206, el receptor CD209 DC-SIGN y su receptor homólogo L-SING, CLEC5A/MDL-11 y las integrinas $\alpha\beta 3$ (Fang *et al.*, 2013; Flipse *et al.*, 2013).

La interacción entre el virus y el receptor genera una vesícula endocítica que una vez dentro de la célula se transforma en un endosoma temprano y posteriormente en endosoma tardío el cual se fusiona con un lisosoma que acidifica el pH de la vesícula; el cambio de pH induce cambios en la conformación del dominio II de la proteína E que favorecen la exposición y el anclaje inmediato del péptido de fusión a la membrana de la vesícula, lo que conlleva finalmente a la liberación de la nucleocápside al citoplasma (Flipse *et al.*, 2013; Velandia y Castellanos, 2011). Una vez introducido en el citoplasma, la hebra de ARN es traducida y replicada en el retículo endoplásmico; el material genético codifica para una poli proteína la cual es subsecuentemente procesada por proteasas celulares y la actividad NS3pro para dar lugar a las siete proteínas estructurales no NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, así como a las tres proteínas estructurales C, prM y E.

Cabe destacar que, la replicación viral es un proceso que no está totalmente entendido, sin embargo, con base en estudios de microscopia electrónica se ha demostrado que la replicación del ARN de DENV ocurre en vesículas en la membrana del retículo endoplásmico inducidas por el virus, de igual manera, los mecanismos que promueven, regulan y coordinan el ensamblaje del virus no son conocidos completamente, sin embargo, se sabe que el proceso de ensamblaje comienza con la formación de la nucleocápside gracias a la interacción del ARN genómico y la proteína C en presencia de gotas de lípidos; sobre esta estructura se asocian las proteínas prM/M y E en un arreglo de dímero antiparalelo y las partículas ensambladas son transportadas a través de la red trans Golgi donde la proteasa celular furina escinde la proteína prM para generar tanto viriones inmaduros como parcialmente maduros que son secretados al espacio extracelular; una vez secretados y en presencia del pH neutro del espacio extracelular el péptido pr es disociado y la partícula viral madura y adquiere su capacidad infectiva (Flipse *et al.*, 2013; Green *et al.*, 2013; Velandia y Castellanos, 2011).

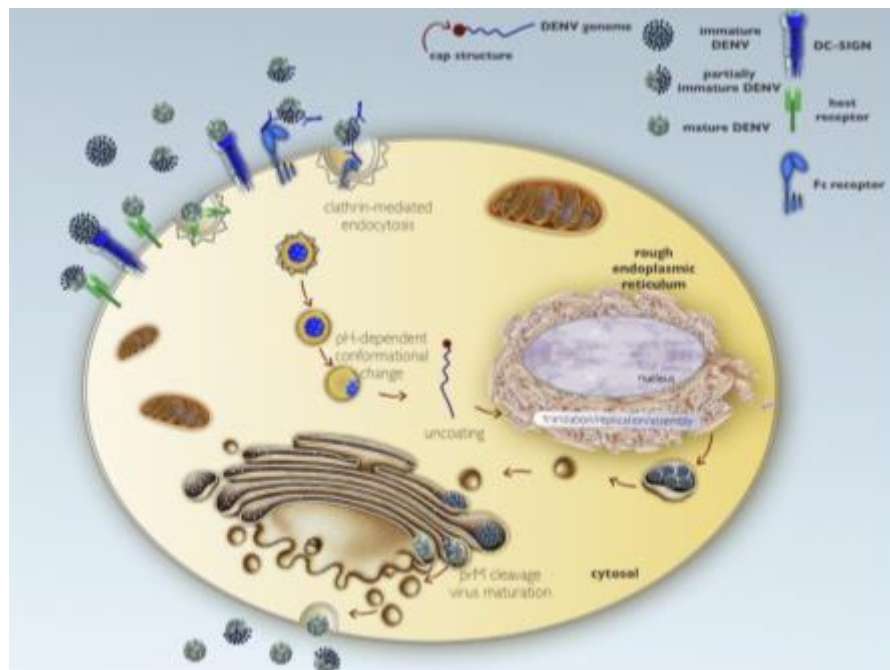


Fig. 2 Ciclo de replicación del virus DENV. El virus dengue infecta a la célula hospedera vía endocitosis mediada por receptor y después de la acidificación de la vesícula y cambios conformacionales de las proteínas prM/M y E, el ARN viral es descubierto y liberado al citosol. El ARN viral migra al retículo endoplásmico donde ocurre su traducción, replicación y ensamblaje. Los viriones empaquetados son transportados por la red *trans* Golgi donde son escindidos

por procesos proteolíticos, lo que deriva en la maduración del virus. Posteriormente las partículas virales maduras son exportadas mediante el sistema de secreción de la célula hospedera. Tomado de Green y colaboradores (2014).

El segundo mecanismo descrito se denomina “mecanismo de amplificación de la infección viral dependiente de anticuerpos” (Antibody-dependent enhancement ADE) (Avirutnant *et al.*, 1998); este tipo de infección ocurre durante infecciones secundarias de tipo heterólogas donde los viriones forman un complejo de alta afinidad con anticuerpos generados durante la infección previa; dicho complejo entra a la célula a través de los receptores de tipo Fc expresados en monocitos, macrófagos y células dendríticas generando un incremento tanto en el número de células infectadas como en el título viral (Flipse *et al.*, 2013; Green *et al.*, 2013). Adicionalmente, se ha demostrado que el DENV puede penetrar a través de balsas lipídicas (Pérez, 2010).

I.3 Epidemiología

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) el dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquito de más rápida propagación en el mundo. El principal vector es el mosquito *Aedes aegypti* distribuido en casi todos los países tropicales del mundo; por consecuencia, se estima que una tercera parte de la población mundial se encuentra en áreas de riesgo de infección (OMS, 2009).

En los últimos 50 años, la incidencia de la enfermedad ha aumentado 30 veces debido a la creciente expansión geográfica hacia nuevos países y el aumento de áreas urbanas rurales (Fig.3) y dado que en términos de distribución geográfica e incidencia de infección, los virus dengue tienen la tasa más alta entre los flavivirus, en el año 2005 durante la resolución WHA58.3 de la Asamblea Mundial de la Salud sobre el Reglamento Sanitario Internacional (RSI), se incluyó a Dengue como ejemplo de una enfermedad que puede constituir una emergencia de salud pública de interés internacional con implicaciones para la seguridad sanitaria (Faheem *et al.*, 2010; OMS, 2009).

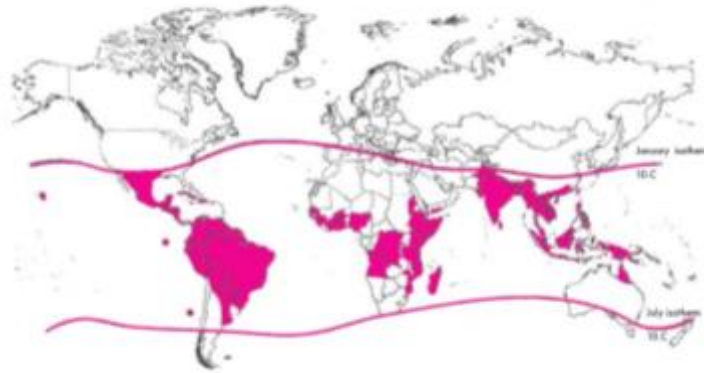


Fig. 3. Áreas en riesgo de transmisión de Dengue. Las líneas de contorno de los isotermos enero y julio indican los posibles límites geográficos de los hemisferios norte y sur para la supervivencia durante todo el año del mosquito *Aedes aegypti*, principal vector del virus Dengue. Tomado de WHO (2009).

Actualmente se estima que la incidencia global de las infecciones por dengue se encuentra entre 50 y 200 millones de casos anuales, sin embargo, estudios realizados utilizando enfoques cartográficos sugieren que el número real podría ser cercano a 400 millones. La rápida expansión de dengue se atribuye a diversos factores entre los cuales se encuentran el cambio climático y su relación con el incremento en la sobrevivencia del vector adulto, así como su migración a áreas fuera de los trópicos consideradas anteriormente como no endémicas, la globalización y viajes de tipo turístico y comercial que han promovido la movilidad tanto del vector como de las poblaciones humanas y los asentamientos humanos y factores socioeconómicos (Murray *et al*; 2013).

Particularmente en el continente americano, la interrupción de la transmisión del dengue en gran parte de la Región de las Américas de la OMS, fue el resultado de la campaña de erradicación de *Aedes aegypti* en dicha zona, principalmente durante la década de 1960 y principios de la década de 1970; sin embargo, no se mantuvieron las medidas de vigilancia y control del vector por lo que hubo re-infestaciones del mosquito seguidas de brotes en el Caribe, América Central y América del Sur; desde entonces, la enfermedad se ha propagado con brotes cíclicos que corren aproximadamente cada 3 a 5 años siendo el mayor brote registrado el ocurrido durante el año 2002 en el cual se notificaron más de un millón

de casos. Del año 2001 al 2007 más de 30 países en América notificaron un total de 4,332,731 casos de Dengue y un total de 106,037 casos de Fiebre Hemorrágica; el total de número de muertes fue de 1,299 con una tasa de letalidad por la forma hemorrágica de 1.2%. Cabe mencionar que, en Barbados, Colombia, República Dominicana, El Salvador, Guatemala, Guyana Francesa, México, Perú, Puerto Rico y Venezuela se identificaron simultáneamente los cuatro serotipos en un año durante este periodo. De acuerdo a datos disponibles de la OPS (2000-2007), el costo anual agregado de dengue para América durante este periodo fue de 2,100 millones (OMS, 2009).

En México, el patrón de diseminación epidemiológico ha sido de Sur a Norte a lo largo de los estados del sureste y golfo hacia la mayoría de las entidades de la república, sobre todo aquellas que por sus características geográficas, demográficas y sociales propician la presencia del vector y por tanto, de la enfermedad. Actualmente, es posible encontrar los cuatro serotipos y en algunas entidades hay evidencia de la circulación simultánea de dos o más. Estos fenómenos están relacionados directamente con la permanencia de la epidemia y el incremento de casos hemorrágicos graves (Fajardo-Dolci *et al.*, 2012).

I.4 Cuadro Clínico

La infección por dengue es una enfermedad sistémica y dinámica de un amplio espectro de presentaciones clínicas que incluyen manifestaciones clínicas graves y no graves. Después de la picadura del mosquito, existe un periodo de incubación de entre 3 y 14 días (promedio de 4 a 7 días) seguido de tres fases de evolución: periodo febril, periodo crítico y periodo de convalecencia (Guglani y Kabra, 2005; OMS, 2009).

Durante el periodo febril, se presentan síntomas no específicos tales como dolor de cabeza, dolor retro orbital, dolor en el cuerpo, náusea y vómitos, debilidad y erupciones; esta etapa febril es auto limitante y puede durar de 2 a 10 días. Cabe mencionar que durante la fase febril temprana puede ser difícil distinguir

clínicamente al dengue de otras enfermedades febriles por lo que se aplica la prueba de torniquete. Durante esta fase también se pueden observar manifestaciones hemorrágicas leves como petequias y sangrado de mucosas. Por otra parte, el hígado a menudo está aumentado de tamaño y la anomalía más temprana en el cuadro hemático es una reducción progresiva del número total de glóbulos blancos. Otras anomalías de laboratorio incluyen linfocitosis, trombocitopenia y enzimas hepáticas ligeramente elevadas (Guglani y Kabra, 2005; OMS, 2009).

La fase crítica de la enfermedad ocurre durante los días 3 a 7. Durante esta fase, se puede presentar un aumento en la permeabilidad capilar junto con mayores valores de hematocrito; particularmente esta característica marca el inicio de la fase crítica. La leucopenia progresiva seguida de una rápida disminución en el número de plaquetas precede usualmente a la extravasación que puede durar de 24 a 48 horas; el choque se presenta cuando la pérdida del volumen plasmático es crítico durante este periodo y por lo general está acompañado por signos de alerta como temperatura corporal por debajo de lo normal. Con un choque prolongado, la hipoperfusión resulta en el deterioro orgánico progresivo, acidosis metabólica y coagulación intravascular diseminada. En lugar de la leucopenia que se observa generalmente durante esta fase del dengue, el número total de glóbulos blancos puede aumentar en los pacientes con sangrado grave. Además, también se puede desarrollar un deterioro orgánico importante, con hepatitis, encefalitis o miocarditis y también sangrado grave, sin extravasación plasmática evidente o choque. Los pacientes que mejoran después de la caída de la temperatura son considerados como casos de dengue no grave mientras que los que empeoran presentan signos de alerta que pueden agravarse hasta llegar a dengue grave (WHO, 2009).

Durante la fase de recuperación que ocurre durante las 48 a 72 horas posteriores a la fase crítica, se observa una reabsorción gradual de líquidos en el paciente, disminuyen los síntomas gastrointestinales, se estabiliza el estado hemodinámico y el conteo de leucocitos generalmente comienza a subir inmediatamente después de

la disminución de la fiebre, aunque la recuperación del número de plaquetas generalmente es posterior a la del número de leucocitos (WHO, 2009).

Por otra parte, los cuadros de fiebre hemorrágica son la manifestación severa del dengue y están caracterizados por un inicio similar, pero con presencia de manifestaciones hemorrágicas e insuficiencia circulatoria durante las primeras 24 horas de remisión de la fiebre. Las características principales de FHD son el incremento en la permeabilidad capilar con ausencia de daño morfológico al endotelio, trombocitopenia, alteraciones en el recuento de leucocitos y daño hepático; de igual manera, la patología incluye un aumento en la permeabilidad vascular que deriva en extravasación de fluidos, hemoconcentración e hipotensión, además de fuga plasmática y hepatomegalia con enzimas hepáticas elevadas. El diagnóstico clínico de dengue hemorrágico se basa en 4 principales manifestaciones, fiebre sostenida por 2 a 7 días, tendencia a hemorragia con prueba de torniquete positiva (petequias o epistaxis), trombocitopenia y evidencia de fuga plasmática manifestada por hemoconcentración y derrame pleural (Guglani y Kabra, 2005; Basu *et al.*, 2008; Whitehorn y Simmons, 2011), y el diagnóstico clínico por laboratorio se realiza mediante el aislamiento del virus por cultivo, PCR de una muestra clínica obtenida durante la fase febril temprana o por pruebas serológicas como el incremento en la prueba de inhibición de la hemaglutinación en suero de pacientes en etapa aguda o convaleciente, o bien, a través de la prueba negativa a IgM/IgG específicas para dengue en ensayos de inmunoabsorción (ELISA) (Chuansumrit *et al.*, 2010).

Los cambios en la epidemiología del dengue han conducido a problemas con el uso de la actual clasificación de la OMS. En el 2009, las infecciones sintomáticas por el virus del dengue se agruparon en tres categorías: fiebre indiferenciada, fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue, además, esta última se clasificó en cuatro grados, según su severidad, en donde los grados III y IV corresponden al síndrome de choque por dengue. Las dificultades en la aplicación de los criterios clínicos para la fiebre hemorrágica por dengue, junto con el aumento en los casos de dengue clínicamente graves que no cumplen con los estrictos criterios para ese diagnóstico,

llevaron a solicitar que se reconsiderara la clasificación. Actualmente, la clasificación de fiebre por dengue/fiebre hemorrágica por dengue/síndrome de choque por dengue continúa utilizándose ampliamente (Guglani y Kabra, 2005; OMS, 2009).

I.5 Inmunopatología del Dengue

A pesar del extenso trabajo realizado en las últimas décadas, la patogénesis del Dengue aún no ha sido completamente elucidada. Aunque varios mecanismos pueden estar involucrados de manera simultánea, la importancia de cada uno aún permanece sin definir (Basu *et al.*, 2008). De manera general, se reconoce que después de la picadura del mosquito, diferentes células residentes presentes en la piel tales como células de Langerhans, keratinocitos y fibroblastos pueden ser infectadas por DENV y participan en la producción de diversas citocinas que establecen un ambiente pro inflamatorio. Se ha demostrado que el papel principal de las células de Langerhans es propagar la infección de la piel a nódulos linfáticos donde monocitos, macrófagos o células dendríticas residentes son infectadas; consecuentemente, la infección es amplificada y el virus es diseminado a través del sistema linfático (Martina *et al.*, 2009; Cedillo-Barrón, 2014). La eficiencia de replicación del virus en los diferentes tipos celulares colectivamente determina el título viral en sangre el cual, representa un importante factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad ya que esencialmente esta viremia primaria determina el curso de la respuesta inmune a DENV (Martina *et al.*; 2009). Otro de los eventos iniciales después de la picadura y que contribuye de manera significativa a la respuesta innata es la respuesta mediada por IFN; esta respuesta incluye células que sintetizan IFN de tipo α y β en respuesta a la infección viral y es ampliamente aceptado que es la respuesta antiviral más inmediata e importante por parte del hospedero; una vez que un estado antiviral eficiente ha sido establecido, células como macrófagos y células NK pueden controlar la infección (Cedillo-Barrón, 2014). Adicionalmente, el sistema inmune adaptativo juega un papel importante en la resolución de la enfermedad ya que células T y B específicas para DENV son generadas aproximadamente 6 días después de la infección y ayudan a controlarla por completo; los viriones de DENV son reconocidos por anticuerpos dirigidos hacia

las proteínas estructurales E y prM, y la neutralización viral mediada por estos puede ocurrir en dos niveles, a nivel de unión celular a través de la inhibición de la interacción del virus con los receptores de superficie celular y a nivel de la fusión viral a través del bloqueo de los cambios conformacionales de la proteína E que son requeridos para la fusión de membrana (Flipse *et al.*, 2013). Múltiples estudios han establecido que esta protección contra DENV mediada por anticuerpos neutralizantes induce una respuesta de anticuerpos fuerte y de larga duración hacia un serotipo homólogo, además de una resistencia transitoria a serotipos heterólogos; sin embargo, esta respuesta del sistema inmune adaptativo puede tener consecuencias no favorables (Rothman, 2011).

Para dar explicación al desarrollo de cuadros clínicos severos de dengue (FHD y SCD), la asociación con infecciones secundarias producidas por un serotipo heterólogo es una de las más aceptadas. El modelo de la potenciación mediada por anticuerpos (antibody-dependent enhancement ADE) postula que, durante una infección secundaria, las células del sistema inmune producen anticuerpos dirigidos predominantemente hacia el serotipo causante de la infección primaria, fenómeno conocido como el pecado antigénico original. La mayoría de los anticuerpos producidos durante esta segunda infección tendrán propiedades no neutralizantes y se unirán al serotipo heterólogo en un complejo de alta afinidad promoviendo así el fenómeno de potenciación mediante la infección de células con receptores de tipo Fc. El fenómeno de potenciación de la infección estimula también la activación de linfocitos y macrófagos, induciendo la liberación de citocinas y otros factores solubles que alteran, entre otros aspectos, la fisiología del tejido endotelial y favorecen la elevada replicación viral, así como el aumento de la viremia lo cual condiciona y favorece el desarrollo de la forma grave de la enfermedad (Arias, 2011; Velandia y Castellanos, 2011; Flipse *et al.*, 2013)

Cabe recalcar que no todos los cuadros graves de dengue son el resultado del fenómeno ADE; estudios realizados en relación a la naturaleza transitoria de la fuga plasmática y su asociación con la fase tardía del periodo febril así como la ausencia

de daño estructural en el sistema vascular sugieren que los factores en circulación en sangre podrían ser responsables del fenómeno; los estudios han demostrado que los niveles en plasma de citocinas vasoactivas y pro inflamatorias en pacientes con cuadros clínicos de fiebre hemorrágica por dengue se encontraban elevados antes y durante la fuga plasmática y el nivel de elevación correlaciono directamente con la gravedad de la enfermedad; al igual que en el caso de infecciones por virus como influenza o hantavirus, el escenario propuesto es que la activación excesiva del sistema inmune genera una cascada o tormenta de citocinas que resulta en el incremento de la permeabilidad vascular (Rothman, 2011). De manera similar, la inflamación excesiva podría contribuir a la patogénesis de casos severos de dengue; aunque es posible encontrar altos niveles de citocinas proinflamatorias y quimiocinas en pacientes con cuadros de FD, la mayoría de ellas se encuentran en niveles más altos en pacientes con cuadros severos, tal es el caso del Factor de Necrosis Tumoral α ($TNF\alpha$), IL6, IL8, IL10, CCL3, CXCL8, CXCL10 e $IFN\gamma$ (Vasconcelos *et al.*, 2013). Otra de las teorías propone que existe una correlación directa entre la carga viral y la severidad de la enfermedad; sin embargo, el estudio de casos clínicos severos sugiere que la carga viral *per se* no es el factor principal que deriva en casos graves, lo cual refuerza las teorías que sustentan que es la respuesta inmune al virus más que el virus *per se* la causante de la patología observada (Knipe y Howley, 2007). Por otra parte, las diferencias en virulencia entre las diferentes cepas virales y especialmente entre los distintos genotipos virales también tiene un papel importante en el desarrollo de la enfermedad; por ejemplo, el virus DENV serotipo 3 genotipo III que incluye aislados del Este de África, el sur de Asia y Latinoamérica ha sido asociado con el incremento de casos de FHD/SCD en esas regiones (Vasconcelos *et al.*, 2013). Finalmente, dado que la inmunopatología mediada por linfocitos T inducida por virus ha sido demostrada para el caso de otros virus tales como el Virus Sincicial Respiratorio (RSV) y el LCMV en ratones, el desarrollo de cuadros clínicos graves podría estar relacionado con la respuesta generada por este subtipo celular (Mongkolsapaya *et al.*, 2006).

I.6 Papel de los linfocitos T en la infección por el virus dengue

Los linfocitos T tienen un papel central en la respuesta inmune a la infección por dengue; las células T durante una infección primaria han mostrado una variedad de patrones de respuesta que indican la complejidad del sistema inmune del hospedero y diferentes patrones de proliferación y producción de citocinas que pueden estar relacionados con diferentes resultados (Guglani y Kabra, 2005).

Una vez establecida la infección, el virus es fagocitado por células dendríticas las cuales procesan y presentan el antígeno a los linfocitos T. Epítopes para células T se encuentran a lo largo de toda la poliproteína de DENV; estos epítopes suelen seguir los principios básicos de la inmunogenicidad de epítopes para células T y presentan la cinética de unión a moléculas de MHC similar a otros epítopes virales inmunodominantes. La mayoría de los epítopes tanto para células CD4+ como CD8+ se encuentran asociados a la región de proteína NS3; después de la presentación antigénica, las células T específicas reconocen a las células infectadas por el virus y responden con diversas funciones efectoras tales como la proliferación, lisis celular y la producción de citocinas las cuales tienen efectos pleiotrópicos, incluyendo la inducción o el incremento de la inflamación y la alteración de la permeabilidad vascular (Rothman, 2011).

La interacción entre respuestas de células T pre existentes, factores virales y del hospedero también son importantes en el desarrollo de la enfermedad. Se ha demostrado que algunos pacientes no desarrollan cuadros clínicos de FHD o SCD en infecciones secundarias; estos pacientes no presentaron proliferación o alta producción de citocinas como resultado de la infección por el virus heterólogo lo cual se atribuye a una respuesta tipo CD4 disminuida durante la infección primaria y/o una respuesta de células T la cual disminuyó con el tiempo (Guglani y Kabra, 2005). Por otra parte, hipótesis alternativas de la patogénesis del dengue incluyen el efecto de respuestas secundarias mediadas por linfocitos T que son desencadenadas debido a la estimulación de células T de memoria que resultan en

la generación de linfocitos CD4+ y CD8+ heterotípicos los cuales tienen una capacidad efectora disminuida pero que siguen generando la liberación de citocinas inflamatorias que pueden contribuir a la severidad de la enfermedad mediante la generación de un ambiente propicio para el incremento de la virulencia de DENV y la reactividad cruzada entre la proteína NS1 y las plaquetas humanas (Guzman *et al.*, 2010). En soporte al papel de los linfocitos T en el desarrollo de cuadros severos de la enfermedad, diversos estudios han reportado mayores niveles solubles de moléculas de superficie de las células T tales como CD4, CD8 e IL2R en pacientes con cuadros de fiebre hemorrágica o dengue severo lo que sugiere una mayor activación de células T que aquella que se presenta en cuadros de Fiebre por Dengue (Guglani y Kabra, 2005).

I.7 Proteínas SOCS

Las células involucradas en la inmunidad innata y específica responden a estímulos antigénicos a través de una variedad de receptores intracelulares y de superficie encargados de la producción de señales vía citocinas. La existencia de mecanismos de control encargados de regular la duración y amplitud de la señalización del receptor son necesarios para prevenir la hiperactivación de una respuesta inmune que pudiera derivar en daño tisular y autoinmunidad (Dimitriou *et al.*, 2008).

Los supresores de señales de citocinas, SOCS, son reguladores negativos tanto de la inmunidad innata como adquirida vía inhibición de la señalización por citocinas tales como IFN tipo I y II (Chulbul *et al.*, 2010). La familia contiene ocho miembros, SOCS1 a SOCS7 y la proteína CIS, cada una con un dominio carboxilo terminal conservado conocido como motivo SC o caja SOCS y un dominio SH2 encargado de ligar de manera específica residuos de tirosina fosforilados. Particularmente, SOCS1 y SOCS3 contienen una región denominada KIR cuya función radica en actuar como pseudosustrato e inhibir la actividad cinasa; además, algunos de los miembros contienen un dominio efector en la región N terminal (Fig. 4). Colectivamente, esta serie de estructuras proveen de un amplio rango de funciones

biológicas (Giordanetto y Kroemer, 2003; Valle y Soto, 2005; Nowolaslawski y Benveniste, 2011).

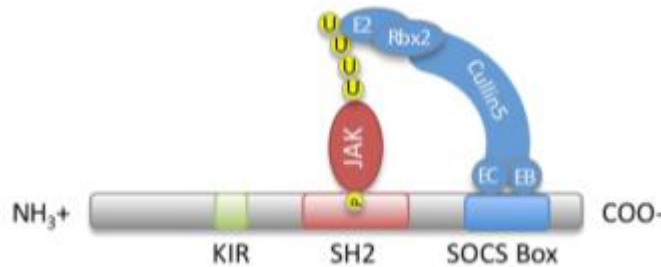


Fig. 4. Estructura de las proteínas SOCS. Se muestra la estructura básica de los miembros de la familia que contiene un dominio central SH2 y una región C-terminal conocida como caja SOCS la cual interactúa con la maquinaria de ubiquitinación que incluyen Elongina B (EB), elongina C (EC), Cullin5, la proteína Rbx2 (RING-box-2) y la enzima E2. Algunos miembros contienen también una región N-terminal inhibidora de la actividad cinasa. Tomado de Nowolaslawski y Benveniste (2011).

La función mejor descrita de las proteínas SOCS es la regulación negativa de la vía de señalización JAK-STAT (Fig. 5); los miembros de la familia SOCS regulan la vía de manera miembro específica mediante la unión a sustratos conformados por el complejo señal-receptor JAK-STAT e inhiben su activación mediante la ubiquitinación y degradación de los receptores unidos a la caja SOCS, competencia por los residuos fosforilados con los activadores STAT o inhibición de la actividad de los reguladores JAK mediada por la región KIR. Se considera que las proteínas SOCS1 y SOCS3 unen residuos de fosfotirosina entre el asa de activación de las proteínas JAK y/o cerca de los residuos del dominio citoplasmático del receptor e inhiben la transducción de señales a través del dominio KIR o la caja SOCS; adicionalmente, SOCS1 puede inhibir la vía NF-κB mediante la ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma de la subunidad p65 o los componentes de señal MAL o IRAK; por otra parte, SOCS3 puede inhibir las vías NF-κB y JNK/p38 mediante la unión de la molécula señal TRAF6 previniendo su asociación y activación de TAK1. Otros de los miembros de SOCS también han sido reportados como reguladores de otras vías de señalización (Nowolaslawski y Benveniste, 2011).

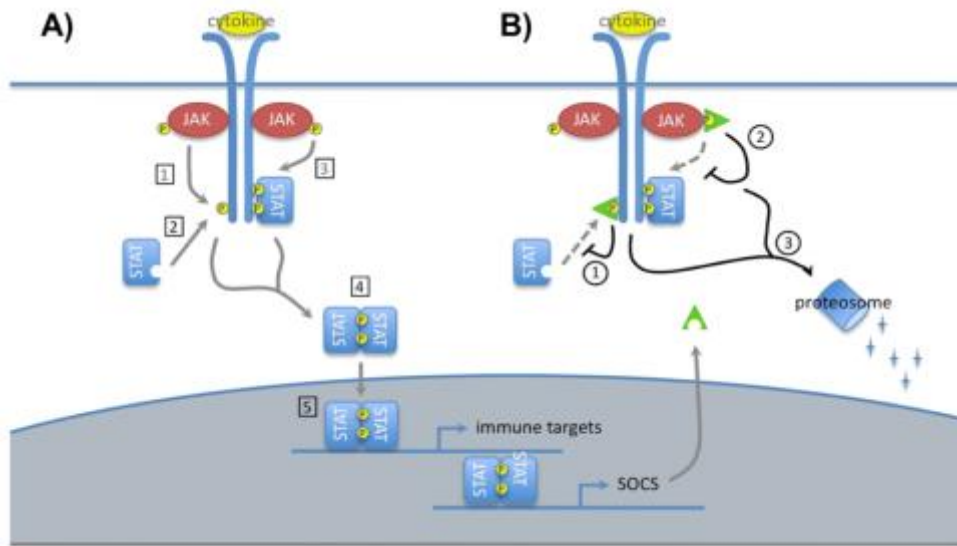


Fig.5. Esquema de la función biológica de las proteínas SOCS. A) Esquema general de funcionamiento de la vía JAK/STAT. La estimulación por citocinas del receptor de superficie celular activa al receptor asociado a la proteína JAK por fosforilación; la proteína JAK activada fosforila al dominio citoplasmático del receptor y genera el reclutamiento de la proteína activadora STAT y su activación por fosforilación permitiendo la dimerización y la entrada al núcleo celular como factor de transcripción tanto de genes de la respuesta inmune como de las proteínas SOCS. B) Regulación negativa de la vía JAK/STAT por las proteínas SOCS. La regulación por SOCS ocurre mediante la unión a diferentes sustratos del complejo JAK/STAT que incluyen la competencia por residuos fosforilados con los activadores STAT (1), inhibición de la actividad de la proteína JAK mediada por la región KIR (2) y ubiquitinación y degradación de los componentes de unión a receptor mediado por la caja SOCS. Modificado de Nowoslawski y Benveniste (2011).

Como reguladores de múltiples vías de transducción de señales, la expresión de proteínas SOCS se encuentra altamente regulada de manera estímulo específica en los diferentes tipos celulares. Sin embargo, recientemente, los miembros de la familia han sido identificados como un grupo de proteínas que pueden ser utilizadas a favor de la replicación y patogénesis durante una infección viral. Se ha reportado que los miembros de la familia SOCS pueden ser inducidos durante la infección por virus como el VIH-1, hepatitis C (HCV), hepatitis B (HBV), herpes simple tipo I (HSV-1), influenza A, entre otros. El incremento en la expresión de SOCS durante una infección viral puede inhibir el funcionamiento normal de las vías JAK STAT, principalmente aquellas relacionadas con el inicio de la respuesta antiviral innata y adaptativa (Nowolaslawski y Benveniste, 2011).

I.8 Proteínas SOCS y la diferenciación de linfocitos Th1/Th2

A medida que el conocimiento de cómo los miembros de la familia SOCS regulan la señalización de citocinas ha aumentado, en los últimos años se ha puesto de manifiesto que desempeñan un papel crítico en la diferenciación, maduración y la función del linaje de linfocitos T mediante el control de diversos eventos de señalización (Palmer y Restifo, 2009).

Está bien establecido que las señales IL2/STAT4 e IL4/STAT6 son necesarias para la diferenciación Th1 y Th2 respectivamente (Kinjyo *et al.*, 2006); se reconoce que los factores positivos de regulación inducidos por estas durante el desarrollo de las células T contribuyen a polarizar los patrones de expresión de citocinas manifestados por células T diferenciadas; estas dos señales antagónicas se encuentran bajo regulación negativa de diversas proteínas SOCS (Egwuagu *et al.*; 2002).

Las células CD4+ expresan de manera constitutiva niveles bajos de mensajeros de las proteínas SOCS1, SOCS2 y SOCS3; estos mensajeros y sus proteínas incrementan de manera significativa en células T activadas mediante la señalización del TCR. Durante la diferenciación en fenotipos Th1 y Th2 es posible observar una expresión preferencial de mensajeros y proteínas SOCS; Durante la polarización, las células Th1 expresan predominantemente mensajeros para las proteínas SOCS1 y SOCS2, y sintetizan niveles mínimos del mensajero de la proteína SOCS3. De manera inversa, en las células Th2 se expresan niveles muy altos del mensajero de la proteína SOCS3 y niveles muy bajos del mensajero de SOCS1 (Egwuagu *et al.*; 2002; Kinjyo *et al.*, 2006).

Por lo tanto, la expresión constitutiva de SOCS1 en células Th1 es consistente con el modelo de diferenciación en el cual SOCS1 promueve la polarización del linaje Th1 mediante la inhibición estable de la señalización por IL4/STAT6 reprimiendo así la polarización de las células al linaje Th2. Cabe mencionar que también se ha

descrito la auto regulación del linaje Th1 mediante la participación de IL12 e IFN γ ; la señalización de IL12 e IFN γ a través de los factores de transcripción STAT4 y STAT1 respectivamente tienen implicaciones en el mantenimiento del linaje Th1 dado que IL12 induce la transcripción de STAT4 y este a su vez induce la producción de IFN γ y la expresión de STAT1 el cual sobre regula al factor de transcripción nuclear Tbet crítico para la polarización del linaje Th1; ya que SOCS1 es un regulador negativo de la señalización IFN γ /STAT1, tiene una implicación directa en la regulación de la población de linfocitos Th1. Por otra parte, SOCS3 inhibe la señalización de STAT4 mediante su unión a la Tyr 800 de la cadena β 2 del receptor de IL12, además, SOCS3 es el regulador clave de la activación de STAT3 dependiente de IL6 e IL23 sugiriendo así que de manera indirecta podría promover la diferenciación Th2 mediante la inhibición de la polarización del linaje de linfocitos Th17 (Egwuagu *et al.*; 2002; Palmer y Restifo, 2009; Knosp y Johnston, 2012).

II Antecedentes

II. 1 Proteínas SOCS y su relación con la respuesta antiviral

En cuanto a la evasión de la respuesta innata, se ha reportado que la sobreexpresión de la proteína de la cápside del virus HCV induce la expresión de la proteína SOCS3 en células HepG2, lo cual está correlacionado con la inhibición de IFN α inducido mediante la activación de STAT1 (Bode *et al.*, 2003). Así mismo, se ha demostrado que el virus VIH-1 es capaz de inducir la expresión de SOCS3 mediante la proteína VIH-1Tat; dicha proteína interrumpe la señalización por IFN β en macrófagos y permite un incremento en la patogénesis y replicación viral (Akhtar *et al.*, 2010). En el caso del virus de Coxsackie, la expresión de SOCS1 y SOCS3 tiene implicaciones en la evasión de la respuesta inmune innata y el establecimiento de una infección productiva (Nowolaslawski y Benveniste, 2011). En cuanto a la relación de SOCS con la inmunidad adaptativa, en infecciones por VIH-1 se ha reportado que la proteína accesoria Nef, secretada por células infectadas, induce la expresión de SOCS1 y SOCS3 y su acumulación en células B inhibe las vías de

activación de linfocitos NF-kB y STAT6 inducida por IL-4. La caja SOCS también puede ser utilizada para la ubiquitinación de proteínas virales y facilitar su circulación intracelular (Nowolaslawski y Benveniste, 2011).

Para el caso específico de Dengue, Chen y colaboradores (2014) evaluaron la correlación entre la expresión de la proteína SOCS1 y el desarrollo de cuadros de fiebre hemorrágica durante un brote ocurrido en Taiwan; los autores determinaron que el nivel de expresión relativa de los transcritos de *socs1* era mayor en células mononucleares de pacientes con cuadros de Fiebre por Dengue en relación a los niveles observados en pacientes con cuadros de Fiebre Hemorrágica, además, determinaron que existía una correlación entre la producción de IFN γ e IL10 y la severidad del cuadro clínico, donde pacientes con cuadros de FD presentaban mayores niveles de IFN γ que los pacientes con FHD, y estos últimos presentaban mayores niveles de IL10 en relación a los niveles observados en pacientes con FD. De manera más reciente, Jiménez y colaboradores (año) evaluaron la expresión de los transcritos de *socs1* y *socs3* en pacientes con cuadros de FD y FHD así como la correlación entre la producción de citocinas y los niveles de transcritos de ambas proteínas. Los autores determinaron que los niveles IL-4, TNF- α , IFN γ e IL-2 entre los pacientes con FD y los pacientes con FDH no eran estadísticamente significativos; sin embargo, para los niveles de las citocinas IL-6 e IL-10, la diferencia estadística entre grupos fue significativa y el aumento en el nivel de ambas citocinas se correlacionó directamente con la severidad del cuadro clínico. De igual modo, el estudio demostró que la correlación entre los niveles de IL10 y la expresión del mensajero de *socs3*, así como los niveles de IL6 y la expresión del mismo mensajero es positiva y estadísticamente significativa; en el caso de la proteína SOCS1, la expresión de transcritos mostro una disminución respecto a la severidad de las manifestaciones de dengue destacando la utilidad de las proteínas SOCS como biomarcadores de severidad para la enfermedad así como su potencial aplicación para el pronóstico del desarrollo de cuadros clínicos graves .

III Justificación

El dengue es la infección por arbovirus más frecuente a nivel mundial y, por su alta incidencia supone un grave problema de salud pública. La infección presenta una elevada tasa de morbilidad y mortalidad en una proporción relevante de los infectados por el virus lo que representa un importante consumo de recursos económicos y asistenciales. Estudios recientes han puesto de manifiesto el papel de los miembros de la familia de Supresores de Señales de Citocinas, SOCS, en la patogénesis de infecciones virales, particularmente, las proteínas SOCS1 y SOCS3 se han relacionado con el desbalance de la respuesta de citocinas durante infecciones virales agudas, sin embargo, su papel en la infección por DENV no ha sido del todo estudiada. En el presente estudio se evalúa el efecto del silenciamiento de las proteínas Supresoras de Señales de Citocinas SOCS1 y SOCS3 en linfocitos T sobre la producción de IL10 con la finalidad de determinar si el cambio en el patrón de expresión de esta citocina podría favorecer la resolución de la enfermedad.

IV Hipótesis

Se ha observado que durante diferentes infecciones virales miembros de la familia de Supresores de Señales de Citocinas SOCS son sobreexpresados como estrategia viral para la desregulación de la respuesta de citocinas por parte del huésped y, por ende, el aumento de la severidad de la enfermedad. Para el caso particular de la infección por DENV, se espera que:

El silenciamiento de los genes *socs1* y *socs3* en linfocitos T genere una disminución en la producción de interleucina 10.

V. Objetivos

V.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del silenciamiento de los genes *socs1* y *socs3* sobre la respuesta de linfocitos T a la infección por el virus dengue

V.2 Objetivos Particulares

- Estandarizar la diferenciación de células dendríticas a partir de células mononucleares (CMN) de sangre periférica.
- Estandarizar las condiciones del silenciamiento de los genes *socs1* y *socs3* en linfocitos T.
- Cuantificar la concentración de IL10 en co-cultivos de células dendríticas infectadas con DENV y co-cultivadas con linfocitos T silenciados (*socs1*⁻/*socs3*⁻).
- Determinar el porcentaje de activación y proliferación de células T en co-cultivos de células dendríticas infectadas con DENV co-cultivadas con linfocitos T silenciados (*socs1*⁻/*socs3*⁻).

VI Materiales y Métodos

El esquema general de trabajo se explica a continuación de manera resumida: a partir de sangre periférica de donadores sanos, se obtuvieron dos tipos celulares distintos: monocitos y linfocitos. Los monocitos fueron utilizados para obtener células dendríticas al diferenciarse con las citocinas IL4 y GM-CSF, posteriormente estas células fueron infectadas utilizando un Índice de Multiplicidad de Infección de 1 con el virus dengue serotipo 2. De manera paralela y por separado, los linfocitos obtenidos fueron tratados con RNA de silenciamiento específico para los genes *socs1* y *socs3*, así como controles (que no inducen ningún silenciamiento). Ambas poblaciones, células dendríticas y linfocitos T silenciados fueron puestos en

contacto para determinar en linfocitos, el efecto del silenciamiento de las proteínas SOCS1 y SOCS3 en la producción de IL10 bajo el estímulo de células dendríticas infectadas con el virus dengue serotipo 2. Para lo anterior, se describe la metodología empleada en cada apartado.

VI.1 Material Biológico

Para el presente estudio se utilizaron muestras de sangre periférica total las cuales fueron obtenidas del Banco de Sangre del Hospital Universitario de Puebla BUAP a partir de donadores clínicamente sanos, previamente evaluados bajo estrictos controles de calidad.

Las muestras fueron transportadas al laboratorio de Inmunología del CIBIOR para su posterior procesamiento para los ensayos de diferenciación (monocitos) y silenciamiento (linfocitos T).

VI.2 Separación de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMN)

La separación de células mononucleares (CMN) se llevó a cabo utilizando el método de separación por gradiente de densidad utilizando Ficoll-Histopaque. Para cada experimento, las muestras de sangre fueron centrifugadas inicialmente a 1700 rpm durante 10 min con la finalidad de retirar el excedente de plasma; posteriormente, la muestra de sangre fue adicionada en relación 1:3 (Ficoll:Sangre) a tubos Falcon previamente preparados con Ficoll-Histopaque a temperatura de 4°C y fueron centrifugados a 600g a 4°C. Una vez concluido el tiempo de centrifugación, el anillo de CMN fue recuperado de la interfase resultante utilizando una pipeta estéril y los restos de glóbulos rojos fueron eliminados realizando lavados con solución de lisis al 1%. Finalmente, las células obtenidas fueron resuspendidas en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) al 10% de Suero Fetal Bovino (SFB). La viabilidad de las CMN obtenidas fue determinada en cámara de Neubauer utilizando Azul de Tripiano como agente de tinción. ·

VI.3 Estandarización de la diferenciación de células dendríticas a partir de CMN de sangre periférica

Para llevar a cabo la estandarización de la diferenciación de células dendríticas, se evaluó 1) la concentración óptima de CMN, y 2) la concentración óptima de las citocinas Interleucina 4 (IL4) y Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF). Para todos los experimentos de diferenciación de células dendríticas, se consideraron muestras cuya viabilidad correspondiera al 90% y los experimentos se realizaron por triplicado. Las células se mantuvieron en medio RPMI suplementado con 100 UI de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina al 10% de SFB y se incubaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂.

VI.3.1 Concentración óptima de CMN y determinación del tiempo óptimo para adherencia

Para determinar el número óptimo de células dendríticas diferenciadas a partir de CMN, se cultivaron CMN en cuatro diferentes concentraciones: 50 x 10⁶, 60 x 10⁶, 75 x 10⁶ y 100 x 10⁶ de CMN en botella de cultivo de 25cm² durante un periodo de 4 horas para permitir que el mayor número de monocitos posible se adhiriera al plástico y para eliminar a las células no adherentes (Linfocitos T) al finalizar el tiempo de incubación se realizaron dos lavados utilizando medio RPMI al 1% de SFB.

Para inducir la diferenciación de CMN a células dendríticas, en todas las concentraciones celulares, se utilizó una concentración de 200ng/mL GM-CSF y 100ng/mL de IL4. Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ durante 5 días y se realizó un recambio de medio durante el día 3 de incubación; cabe mencionar que se realizó un registro fotográfico del proceso de diferenciación. Finalmente, el número de células obtenidas al final del día 5 fue determinado en cámara de Neubauer utilizando Azul de Tripiano como agente de tinción.

VI.3.2 Concentración óptima de las citocinas Interleucina 4 (IL4) y Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GMCSF) para inducir la diferenciación de células dendríticas

Con la finalidad de determinar la concentración óptima de citocinas para inducir diferenciación en el menor tiempo posible, se utilizaron las concentraciones de 200ng/mL-100 ng/mL, 100 ng/mL-50ng/mL y 50 ng/mL-25ng/mL de GMCSF e IL4 respectivamente. Las CMN se diferenciaron durante 5 días, con un recambio de medio con citocinas al día 3. El número de células diferenciadas fue determinado en cámara de Neubauer utilizando Azul de Tripano y su fenotipo fue evaluado por citometría de flujo. En todos los experimentos se utilizó una concentración celular de 50×10^6 CMN·cm² obtenida del experimento anterior.

Para determinar que se obtuvieron células dendríticas en el proceso de diferenciación, además de la evaluación morfológica y fenotípica de las células, se realizó una evaluación funcional. Para lo anterior, las células dendríticas diferenciadas se estimularon con LPS (Lipopolisacarido, estímulo antigénico capaz de inducir maduración de células dendríticas) durante 24 horas, para evaluar su capacidad de maduración mediante el cambio de expresión de marcadores por citometría de flujo.

VI.4 Fenotipificación de células dendríticas

Para conocer el fenotipo de las células diferenciadas, se utilizaron anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromo específicos para los principales marcadores de superficie característicos de células dendríticas: CD83 acoplado a FITC, CD86 acoplado a Pacific Blue, HLA-DR acoplado a FITC, CD14 acoplado a APC, CD80 acoplado a PECy5, CD205 acoplado a AlexaFlour 647, CD206 acoplado a eFlour450 y CD1a acoplado a PE. Para cada ensayo, las células recuperadas fueron colocadas en tubos de citometría a una concentración de 50,000 células por tubo y los diferentes anticuerpos fueron incubados durante 30 minutos en condiciones de temperatura ambiente y oscuridad; posteriormente con la finalidad de retirar el exceso de anticuerpo, se realizaron dos lavados con PBS. La lectura de

muestras fue realizada utilizando el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Bioscience) y el análisis de datos fue realizado con el software FACSDiva (BD Bioscience). Adicionalmente, para el análisis de fenotipo se incluyeron como control positivo de diferenciación células diferencias inducidas a un estado de maduración mediante el uso de LPS.

VI.5 Infección de Células Dendríticas

Para la evaluación de la respuesta celular mediada por linfocitos T, una vez establecido el fenotipo el protocolo de infección en células dendríticas diferenciadas fue establecido. Las células fueron recuperadas en tubos Falcon y el número de células obtenidas fue determinado en cámara de Neubauer utilizando Azul de Tripiano como agente de tinción. Posteriormente, con la finalidad de eliminar el SFB se realizaron dos lavados utilizando medio RPMI y las células diferenciadas fueron incubadas por 1 hr con el virus dengue serotipo 2, cepa Nueva Guinea 16681 perteneciente a la colección de cepas virales del CIBIOR. Cabe mencionar que, para la infección se contempló un Índice de Multiplicidad de Infección (MOI por sus siglas en inglés) de 1, con esto, se pretendió asegurar que hubiera una partícula viral infectiva por cada célula dendrítica diferenciada. Con la finalidad de eliminar el virus, una vez finalizado el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados con y las células fueron incubadas en medio RPMI al 10% de SFB durante 24 hrs en placas de 6 pozos.

VI.6 Estandarización de las condiciones de silenciamiento y silenciamiento de los genes *socs1* y *socs3* en linfocitos T

Para el silenciamiento de los genes *socs1* y *socs3* en linfocitos T se realizó la estandarización de las condiciones de cultivo de linfocitos, así como la construcción de un rango dinámico para la evaluación de la expresión relativa de ambos genes por método de SYBR Green y la evaluación de la eficiencia de silenciamiento utilizando diferentes concentraciones (nM/mL) de siRNA. Para todos los

experimentos, se consideraron muestras cuya viabilidad correspondiera al 90% y los experimentos se realizaron por triplicado.

VI.6.1 Condiciones de cultivo

Con la finalidad de determinar las condiciones óptimas de cultivo para el análisis de expresión relativa de los genes *socs*, posterior a la separación, las células fueron colocados en una proporción de 1.5×10^6 CMN en placas de 12 pozos a volumen 2mL de medio RPMI suplementado con 100 UI de penicilina, 100 ug/ml de estreptomicina al 10% de SFB; posteriormente las células fueron inoculadas con 1mg/mL de fitohemaglutinina (PHA) e incubadas a 37°C en una atmosfera al 5% de CO₂ por 24 horas. Al final del periodo de estimulación, las células fueron recuperadas y colocadas en TRizol (Invitrogen, Carsbad, CA).

VI.6.2 Validación de PCR en tiempo real

VI.6.2.1 Extracción de ARN y Transcripción reversa

Se realizó la extracción de ARN total mediante el método de Trizol - cloroformo siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración de ARN fue cuantificada por espectrofotometría a 260/280 nm y la integridad del mismo fue corroborada en geles de agarosa. El ADN complementario (ADNc) fue obtenido por transcripción reversa utilizando el sistema comercial RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Fermentas Thermo Scientific) y el programa para reacción fu 65 durante 5 min, 25 durante 5 min, 42 durante 60 min y 72 durante 10 min.

VI. 6.2.2 Construcción del rango dinámico para los genes *socs1* y *socs3*

Para realizar la validación de la PCR en tiempo real por método de SYBR Green y posterior análisis de la expresión relativa de los genes *socs1* y *socs3*, se realizó la construcción de un rango dinámico a partir del ADNc obtenido utilizando el método

ΔC_T ($\Delta C_T = C_{T \text{ problema}} - C_{T \text{ endógeno}}$), utilizando al gen HPRT como comparación constitutiva.

Para la construcción del rango dinámico se utilizaron concentraciones de ARN total de 90, 60, 45, 30, 25 y 15 nanogramos para cada gen, así como iniciadores específicos para los genes de estudio (Tabla 1). El análisis de expresión relativa fue realizado utilizando el sistema comercial Maxima SYBR Green Rox qPCR (Fermentas); la concentración y eficiencia de amplificación de los iniciadores de reacción para los genes fueron obtenidas del trabajo de Jiménez –Estrada (2016).

Tabla 1 Iniciadores de PCR en tiempo real utilizados para los genes blanco

Gen	No. de acceso	Secuencia	Producto (pb)
socs1	NM 3745.1	S 5'-CACGCACTTCCGACATTCC-3' A 5'-TCCAGCAGCTCGAAGAGGCA-3'	300
socs3	NM 3955.3	S 5'-ACAATCTGCCTCAATCACTCTG-3' A 5'-TTGACTTGGATTGGGATTTTG-3'	129
HPRT	M26434.1	S 5'- CCTGGCGTCGTGATTAGTGATGATG-3' R 5'-CGAGCAAGACGTTTCAGTCCTGTC-3'	193

VI.6.3 Concentración óptima (nM/mL) de siRNA

Para el silenciamiento del ARNm de los genes *socs1* y *socs3* en linfocitos T se utilizaron los FlexiTube ARNsi premix para SOCS1 (Hs_SOCS1_2) (Fig. 7A) y SOCS3 (Hs_SOCS3_4) (Fig. 7B), así como el siRNA Allstar premix como control negativo de silenciamiento (Qiagen, Valencia, Ca, EE.UU). La evaluación de la eficiencia del silenciamiento se llevó a cabo utilizando las concentraciones 2.5 nM/mL, 5 nM/mL y 10 nM/mL de los diferentes siRNA siguiendo las recomendaciones del fabricante.

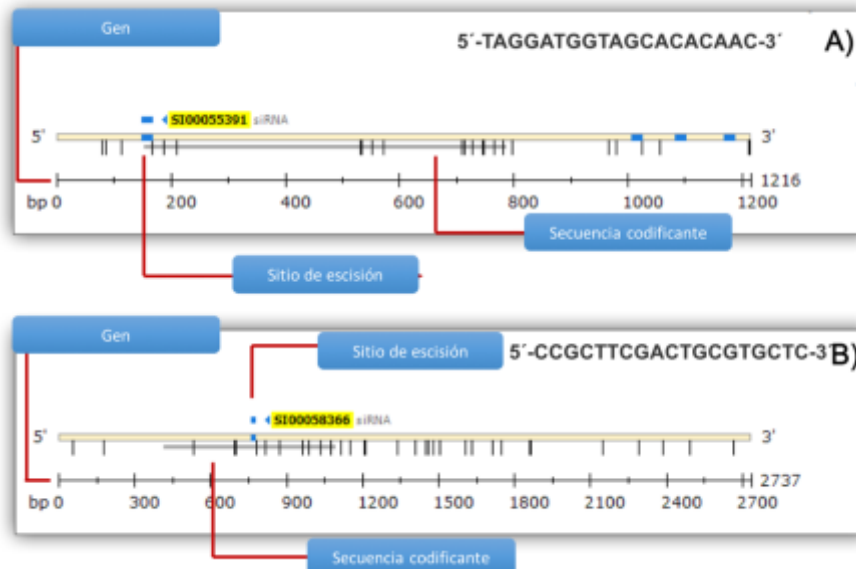


Fig. 6. Mapa de los ARN de interferencia utilizados para los genes A) *socs1* y B) *socs3*. Se muestra el tamaño del gen, la secuencia del ARNi, el tamaño de la secuencia codificante del ARNm y el sitio de escisión del ARNi.

Después de la separación por gradiente de Ficoll, las células fueron colocadas en placas de 12 pozos a una concentración de 1.5×10^6 en un volumen final de 2mL de medio RPMI suplementado con 100 UI de penicilina, 100 ug/ml de estreptomicina al 10% de SFB para realizar la transfección directa de los diferentes siRNA; una vez realizada la transfección, las células fueron incubadas durante 48 hrs en una atmosfera al 5% de CO₂. Después del periodo de incubación, las células fueron inoculadas con 10^4 U/mL de IFN α 2b (PROBIOMED) e incubadas por 1 hr de acuerdo al protocolo establecido por Zimemmer y colaboradores (2007). Finalmente, las células fueron recuperadas para la obtención de ARN total, transcripción reversa y análisis de expresión relativa por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando el gen HPRT como control constitutivo y el programa de reacción 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de amplificación de 95°C por 45 segundos, 62°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos.

VI.7 Co-cultivo de células dendríticas diferenciadas y linfocitos T silenciados

Para llevar a cabo el co-cultivo de células dendríticas diferenciadas y linfocitos T silenciados se realizó la separación de CMN de acuerdo al protocolo previamente mencionado. Posterior a la separación, las células adherentes (monocitos) fueron

cultivadas en botellas T75 en proporción 150×10^6 CMN en medio RPMI al 10% de SFB adicionado con una concentración de 200 ng/mL GMCSF y 100 ng/mL de IL4, y las células fueron incubadas a 37°C en una atmosfera al 5% de CO₂ durante 48 horas para inducir su diferenciación; una vez finalizado este periodo, las células fueron infectadas con el virus DENV serotipo 2 (DENV2) cepa Nueva Guinea 16682 a MOI=1 durante 24 horas.

Por otra parte, los linfocitos T separados se mantuvieron en cultivo en ausencia de estímulo en medio RPMI al 10% SFB a 37°C en una atmosfera al 5% de CO₂ durante 24 horas. Posteriormente fueron transfectados con los ARN de silenciamiento siRNASOCS1 y siRNASOCS3 utilizando las concentraciones 2.5 nM y 5 nM de cada uno de los ARN de silenciamiento, así como su respectivo control de silenciamiento. Las células transfectadas fueron incubadas durante 48 horas de acuerdo al protocolo de silenciamiento previamente establecido.

Antes de realizar el co cultivo de células, se realizó un recambio de medio y, adicionalmente, para llevar a cabo el análisis de proliferación celular, una proporción de linfocitos T fue inoculada e incubada con CFSE (carboxyfluorescein N-succinimidyl ester) a una concentración de 3 μ M en medio RPMI sin SFB por 5 min (Fig. 8).

Finalmente, las células dendríticas infectadas y linfocitos T silenciados fueron colocados en co cultivo en proporción 1:20 durante 96 horas colectando sobrenadantes de dicho cultivo cada 12 horas para realizar la cuantificación de IL10. Al finalizar el periodo de incubación (96 horas) los linfocitos T fueron colectados del sobrenadante para realizar un análisis de proliferación y activación mediante Citometría de Flujo. Cabe mencionar que las células utilizadas en co-cultivo de células dendríticas y linfocitos T silenciados provienen de una misma muestra.

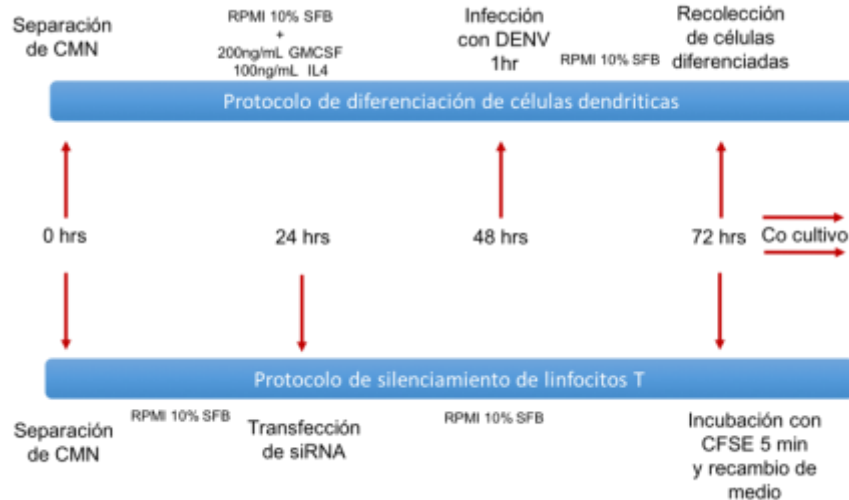


Fig. 7 Protocolo de silenciamiento y diferenciación de células para el ensayo de co-cultivo.

VI.8 Cuantificación de IL10 por método de ELISA

La concentración de IL10 fue determinada a partir de los sobrenadantes obtenidos del co cultivo de células dendríticas infectadas y linfocitos T silenciados utilizando el kit ELISA MAX Deluxe Set Protocol (Biolegend) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El ensayo se describe brevemente, en cada placa se añadieron 100 μ l del anticuerpo de captura y se incubaron durante 18 horas a 4°C; al finalizar el tiempo de incubación, se realizaron cuatro lavados utilizando Buffer de lavado (PBS al 0.05% de Tween 20). Posteriormente, la placa fue bloqueada durante 1 hr a temperatura ambiente utilizando el diluyente de la muestra y se realizaron cuatro lavados utilizando Buffer de lavado. Una vez realizados los lavados, se procedió a realizar la curva estándar para IL10, así como las muestras correspondientes a cada condición experimental; la placa fue incubada durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se realizaron cuatro lavados utilizando Buffer de lavado, se agregó el anticuerpo de detección y la placa fue incubada durante 1 a temperatura ambiente y agitación. A continuación, se realizaron cuatro lavados con Buffer de lavado, a cada pozo se agregó 100 μ l de Avidin HRP y se incubó a temperatura ambiente y en agitación durante 30 min. Finalmente, se realizaron cinco lavados utilizando Buffer de lavado, se añadió 100 μ l de la solución de sustrato TMB y se incubó a

temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos en oscuridad. Al finalizar el periodo de incubación, se agregaron 100 μ l de la solución de paro de reacción. La lectura de las muestras fue realizada utilizando el lector de placas Sinergy 4 (Biotek) a 450nm – 570nm de absorbancia.

VI.9 Análisis de Proliferación e Índice de Activación de células T proliferantes

Para el análisis de proliferación e índice de activación, se utilizaron las muestras correspondientes a las 96 hrs post co-cultivo; las células correspondientes a cada condición experimental fueron colectadas en tubos de citometría para realizar el análisis de proliferación y determinación de fenotipo.

Para conocer el índice de proliferación de células T se utilizó el método de captación de un compuesto fluorescente, y adicionalmente, para conocer el índice de activación se utilizó el anticuerpo monoclonal dirigido al marcador CD25 (acoplado a PE) y el anticuerpo monoclonal para el factor de transcripción Foxp3 (acoplado a APC). Para realizar la determinación, los linfocitos recuperados fueron colocados en tubos de citometría a una concentración de 50,000 células por tubo; para cada condición se realizó la tinción para el marcador CD25 incubando el anticuerpo específico durante 30 min en oscuridad y temperatura ambiente; posteriormente, se realizó la fijación del anticuerpo incubando las células durante 15 minutos con Buffer de fijación; para eliminar el exceso de Buffer, se realizaron dos lavados con PBS 1x. Posteriormente para la tinción del factor de transcripción nuclear Foxp3, las células fueron permeabilizadas por 30 min en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente utilizando Buffer de permeabilización; el exceso de Buffer fue eliminado realizando dos lavados con PBS 1x. Finalmente, las células fueron inoculadas con 3 μ l del anticuerpo específico para Foxp3 e incubadas en condiciones de oscuridad por 30 min. La lectura de muestras fue realizada utilizando el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Bioscience) y el análisis de datos fue realizado con el software FACSDiva (BD Bioscience).

VI.10 Análisis Estadístico

La diferencia entre grupos fue analizada mediante Analisis de Varianza (ANDEVA) de 1 vía utilizando el software Statistica 8.0

VII. Resultados

VII.1 Estandarización de la diferenciación de células dendríticas a partir de CMN de sangre periférica

VII.1.1 Concentración óptima de Células Mononucleares CMN

Para determinar el número de células dendríticas obtenidas a partir de una concentración de CMN se evaluaron

Para determinar la concentración óptima de CMN se evaluaron las concentraciones 100×10^6 , 75×10^6 , 60×10^6 y 50×10^6 de CMN. Para el caso de las células que fueron inoculadas con la concentración 100×10^6 se obtuvo un promedio final de 308,333 células diferenciadas mientras que para las concentraciones 75×10^6 y 60×10^6 el promedio final fue de 300,000 y 333,333 células respectivamente. La concentración donde se detectó un mayor número de células adheridas y diferenciadas al final del periodo de incubación fue la concentración correspondiente a 50×10^6 con un promedio final de 441,666. La diferencia estadística entre el número de células obtenidas al final del periodo de incubación fue significativa ($p < 0.05$) (Fig. 8).

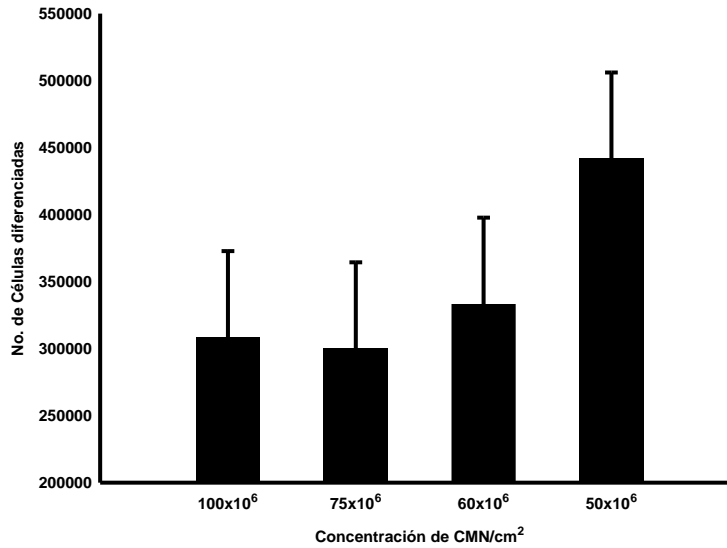


Fig.8 Células diferenciadas obtenidas utilizando diferentes concentraciones de CMN y las concentraciones 200 ng/mL de GMCSF y 100ng/mL de IL4. Datos: Media ± desviación estándar, n=3, p<0.05.

En cuanto a la morfología de las células, para el caso de las células inoculadas con 50×10^6 , 60×10^6 y 75×10^6 de CMN (Fig. 9 A, B y C respectivamente) fue posible observar cambios morfológicos desde el primer día de incubación; entre los principales cambios destacaron el aumento de tamaño y la aparición de procesos o prolongaciones en las células. Además, en el registro fotográfico correspondiente a las concentraciones mencionadas anteriormente, fue posible observar un mayor número de células adheridas durante el día uno de incubación y una disminución subsecuente durante los días tres y cinco. Finalmente, para las células inoculadas con la concentración 100×10^6 de CMN (Fig.10 D) se observó un mínimo de adherencia y diferenciación desde el primer día de incubación. Con base en el número de células diferenciadas y lo observado en el registro fotográfico a lo largo de los cinco días de diferenciación, se consideró la concentración 50×10^6 como óptima para realizar los ensayos de concentración óptima de citocinas.

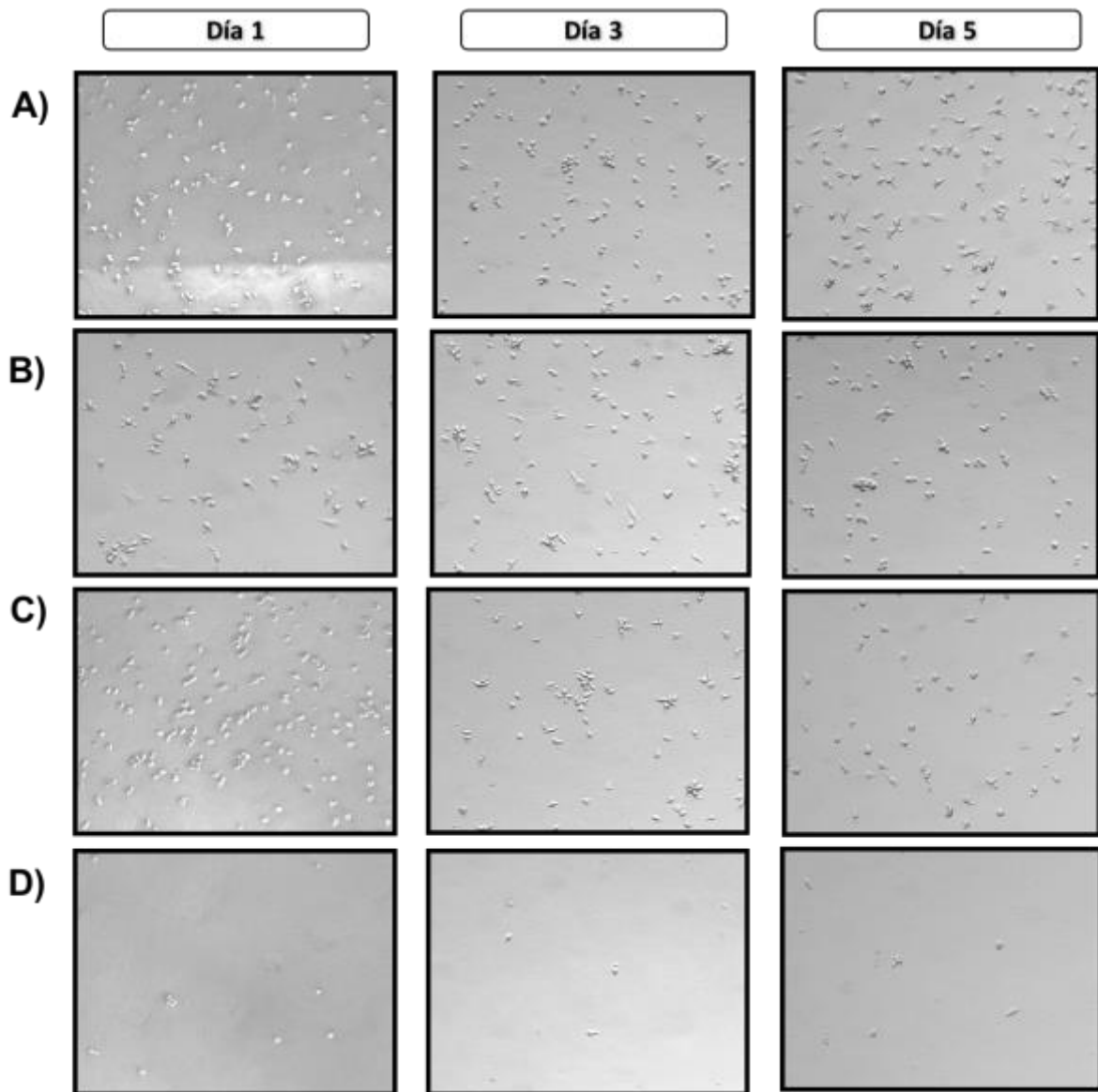


Fig. 9 Evaluación de la concentración óptima de células mononucleares. Se muestra el registro fotográfico de los días 1, 3 y 5. A) $50 \times 10^6 \cdot \text{cm}^2$, B) $60 \times 10^6 \cdot \text{cm}^2$, C) $75 \times 10^6 \cdot \text{cm}^2$ y D) $100 \times 10^6 \cdot \text{cm}^2$. (20x).

VII.1.2 Concentración óptima de las citocinas Interleucina 4 (IL4) y Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GMCSF) para inducir la diferenciación de células dendríticas

Para establecer la concentración óptima de citocinas para inducir la diferenciación de monocitos a células dendríticas, se evaluaron las concentraciones 200/100 ng/mL, 100/50 ng/mL y 50/25 ng/mL de las citocinas GMCSF e IL4 respectivamente, tomando como concentración inicial 50×10^6 CMN. El promedio de células obtenidas con las concentraciones 200/100 ng/mL fue de 475,000 células diferenciadas; para el caso de las células inoculadas con las concentraciones 100/50 ng/mL y 50/25 ng/mL el promedio fue de 213,333 y 316,666 células diferenciadas respectivamente, mientras que para el caso de las células que fueron incubadas con medio de cultivo sin citocinas (células control) se obtuvo un promedio final de 291,666 células; cabe mencionar que en el caso de las células control no se observaron cambios morfológicos atribuibles a la diferenciación. La diferencia estadística entre el número de células diferenciadas obtenidas con las diferentes concentraciones evaluadas no fue significativa (Fig. 11) ($p > 0.05$).

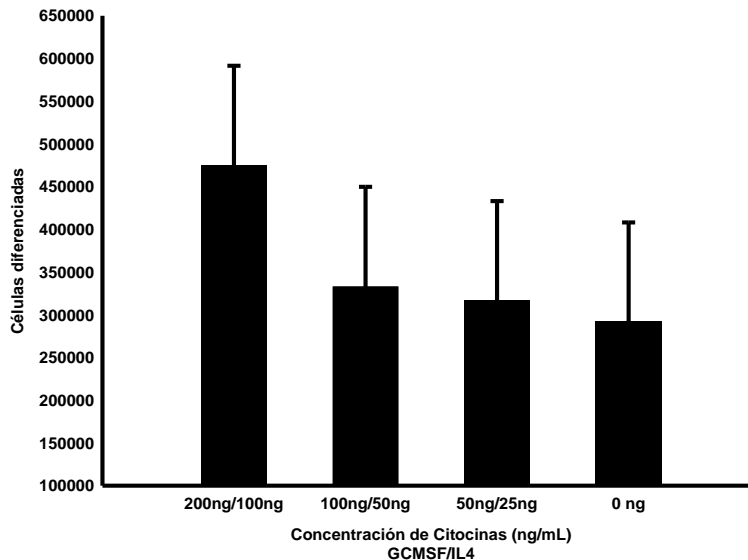


Fig.10 Células diferenciadas obtenidas utilizando diferentes concentraciones de las citocinas GMCSF e IL4. Datos: Media \pm desviación estándar, $n=3$, $p > 0.05$.

En cuanto al proceso de diferenciación, se observaron cambios en la morfología de las células inoculadas con las concentraciones 200/100 ng/mL, 100/50 ng/mL y 50/25 ng/mL (Fig. 12 B, C y D) desde el día 1 de incubación; durante el tercer día del proceso fue posible observar la aparición de proyecciones en las células mientras que para el día 5 de diferenciación se hizo evidente el aumento de tamaño y la morfología característica de células dendríticas. Por otra parte, las células utilizadas como control negativo de diferenciación (Fig. 12 A) mantuvieron la forma y tamaño característico de CMN durante los cinco días de incubación y no se observaron cambios morfológicos atribuibles a diferenciación.

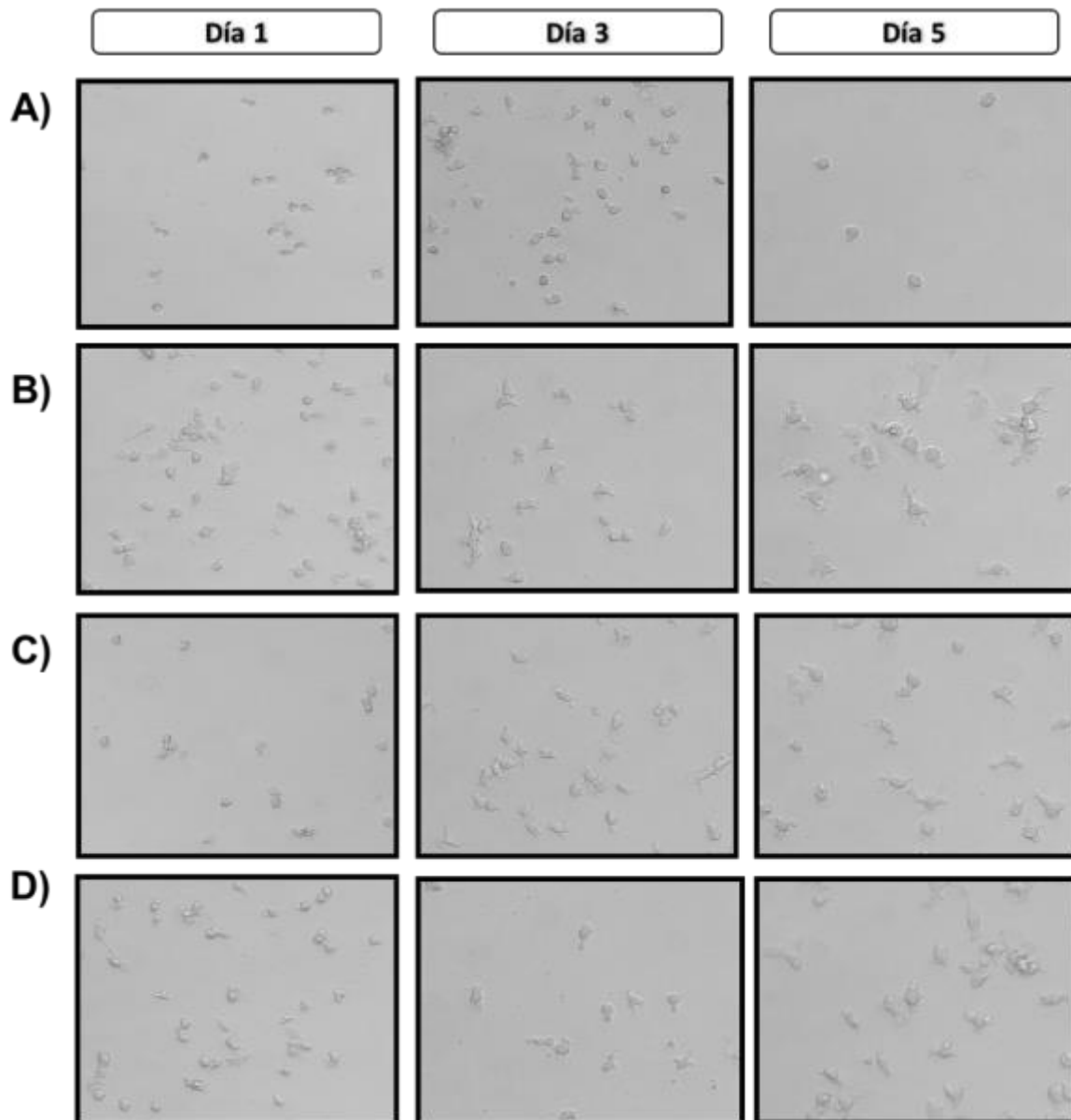


Fig.11. Evaluación de la concentración óptima de las citocinas GMCSF e IL4. Se muestra el registro fotográfico de los días 1, 3 y 5. A) Células control, B) 200ng/mL-100ng/mL, C) 100ng/mL-50ng/mL y D) 50 ng/mL-25ng/mL de GMCSF e IL4 respectivamente. (20x),

VII.2 Fenotipificación de células dendríticas

Para confirmar la diferenciación de CMN a células dendríticas se realizó la determinación de fenotipo por citometría de flujo utilizando células diferenciadas (iDC's) y células diferenciadas inducidas a un estado de maduración utilizando un estímulo de LPS (mDC's). Los resultados obtenidos muestran que el marcador CD14 (Fig.13 A) fue positivo en un 5.6% para las células inmaduras y 1.4% para las células inducidas al estímulo de LPS (mDC's). Para el marcador HLA-DR (Fig.13 B) el 98.9% de células inmaduras y el 98.3% de células maduras fueron positivas para el marcaje; para la molécula de superficie CD80 (Fig.13 C), las células inmaduras fueron positivas en un 81.3% y las células maduras fueron positivas en un 80.6%. En cuanto al marcador CD86 (Fig.13 D), el porcentaje de iDC's y mDC's positivas al marcaje fue de 35.8% y 42.1% respectivamente mientras que para la molécula CD83 (Fig.13 E) el marcaje fue positivo en un 64.4% para iDC's y 34.8% para mDC's. Para la molécula CD1a (Fig.13 F), las iDC's fueron positivas en un 75.1% al marcaje mientras que las mDC's fueron positivas en un 77.7%. Finalmente, para los marcadores CD205 y CD206, las células inmaduras fueron positivas en un 92.7% y 92.4% respectivamente mientras que las células maduras fueron positivas en un 75.8% y 94.7% respectivamente. La diferencia estadística entre el porcentaje de células positivas solo fue significativa para el caso de los marcadores CD14 y CD83 $p < 0.05$.

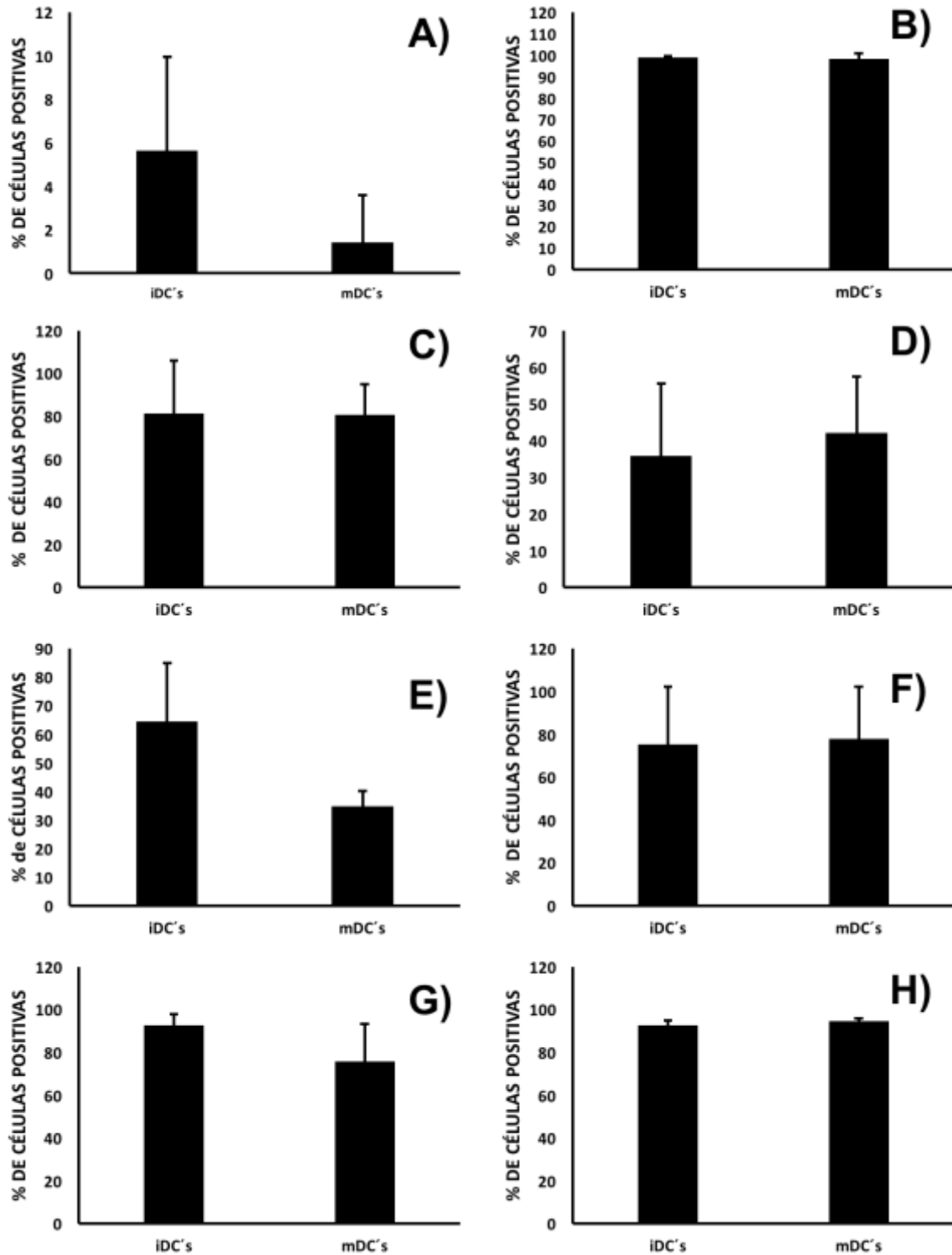


Fig. 12. Fenotipificación de células dendríticas. Se muestra el comparativo de la expresión de marcadores de superficies para CMN, células dendríticas inmaduras (iDC's) y células dendríticas maduras (mDC's). A) CD14, B) HLA-DR, C) CD80, D) CD86, E) CD83, F) CD1a, G) CD205 y H) CD206.

VII.3 Rango dinámico para los genes *socs1* y *socs3*

El rango dinámico para los genes *socs1* y *socs3* fue determinado en 15 a 90 ng de ARN total. Las pendientes obtenidas a partir del análisis de expresión relativa por PCR en tiempo real fueron -0.058 para el gen *socs1* (Fig.14 A) y -0.0238 para el gen *socs3* (Fig. 14 B); se seleccionó la concentración de 60 ng de ARN total para todas las posteriores evaluaciones de expresión relativa.

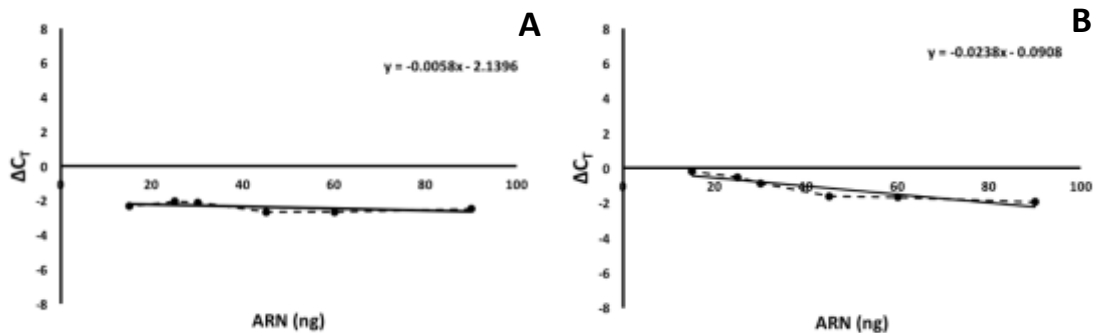


Fig. 13 Curvas de validación de RT-PCR en tiempo real para los genes *socs1* y *socs3* utilizando HPRT como gen endógeno. A) Rango dinámico para el gen *socs1*, $m=-0.0058$; B) Rango dinámico para el gen *socs3*, $m=-0.0238$.

VII.4 Silenciamiento de los genes *socs1* y *socs3* en linfocitos T

La eficiencia del silenciamiento de los genes *socs1* y *socs3* en células T se evaluó mediante el análisis de expresión relativa por RT-PCR en tiempo real. Para el caso de las células silenciadas en el gen *socs1* (Fig.15), utilizando la concentración 2.5nM del ARN de interferencia se observó una reducción del 29.96% de la expresión del gen respecto al control mientras que con la concentración 5 nM se observó una reducción del 12.48%. Por otra parte, utilizando la concentración 10 nM del ARN de interferencia se observó un aumento del 50.99% de la expresión del gen respecto al control y para el caso de las tres concentraciones no se observó disminución en la expresión relativa del gen por efecto del siRNA utilizado como control negativo de silenciamiento.

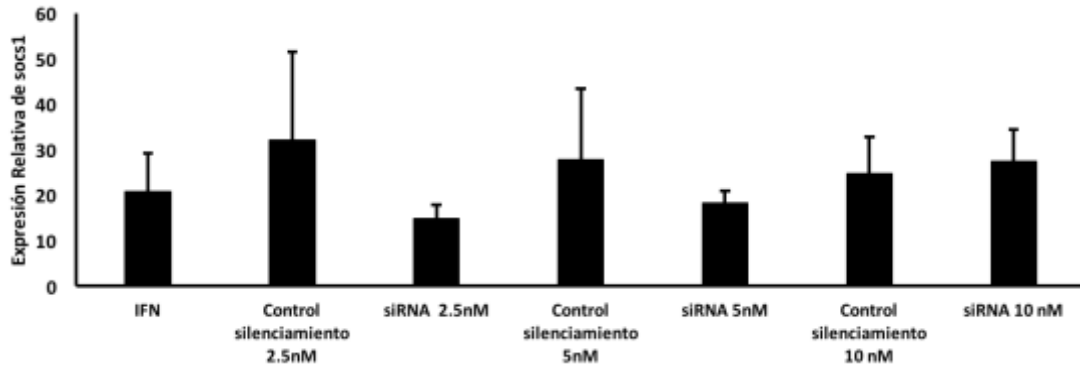


Fig.14. Expresión relativa del gen *socs1* en Linfocitos T transfectados con las diferentes concentraciones del siRNA-*socs1* ($2^{-\Delta\Delta CT}$, n=3).

En cuanto a las células silenciadas en el gen *socs3* (Fig.16), se observó una reducción del 39.13% de la expresión del gen respecto al control utilizando la concentración 2.5 nM del ARN de interferencia; para el caso de las células silenciadas con la concentración 5 nM se observó una reducción del 82.16% respecto al control y en el caso de las células silenciadas con la concentración 10 nM se observó una reducción del 27.38%. No se observó disminución en la expresión relativa del gen por efecto del siRNA utilizado como control negativo de silenciamiento.

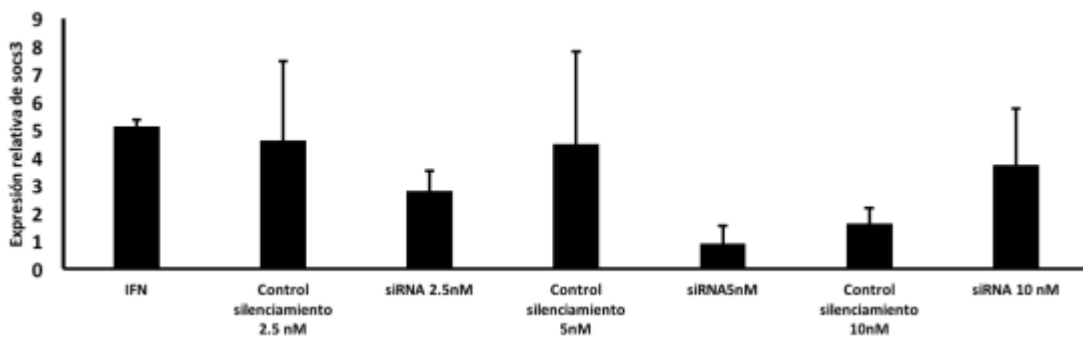


Fig.15 Expresión relativa del gen *socs3* en Linfocitos T transfectados con las diferentes concentraciones del siRNA-*socs3* ($2^{-\Delta\Delta CT}$, n=3n=3).

VII. 5 Efecto del silenciamiento de los genes *socs1* y *socs3* en la producción de IL10

Para la evaluación del efecto del silenciamiento de los genes *socs1* y *socs3* en la producción de IL10, previo al análisis en células silenciadas, se avaluó la producción basal de IL10 proveniente de la infección por DENV2 (MOI 1) en células dendríticas (Fig.17). Durante las primeras 12 horas post co-cultivo (hpc) no fue posible detectar IL10 en muestras de sobrenadante del co-cultivo, sin embargo, entre las 24 hpc y 36 hpc se observó un aumento de 2.2 pg/mL a 228 pg/mL y dicho nivel disminuyó hasta un promedio de 8 pg/mL durante las 48 hpc. El segundo pico en el aumento de producción de IL10 se registró durante las 60 hpc con un promedio de 170 pg/mL y para el caso de las 72 hpc el nivel de IL10 correspondió a 109 pg/mL.



Fig.16 Cinética de la producción de IL10 en cultivos de células dendríticas infectadas con DENV2.

Por otra parte, los niveles de IL10 en células silenciadas con las concentraciones 2.5 nM de los diferentes ARNi (Fig.17) mostraron una tendencia a aumentar durante las primeras 12 hpc. Durante las 24 hpc, el nivel de IL10 en las células silenciadas en *socs1* disminuyó de 205 pg/mL a 172 pg/mL y esta concentración se mantuvo sin un incremento significativo durante las 36 hpc; posteriormente, el nivel de IL10 disminuyó a 138 pg/mL durante las 48 hpc y a 12 pg/mL y 8 pg/mL para el caso de las 60 hpc y 72 hpc respectivamente. Por otra parte, en las células silenciadas en el gen *socs3*, se observó una disminución continua del nivel de IL10; la concentración de IL10 en sobrenadantes del co-cultivo disminuyó de 208 pg/mL a 161 pg/mL durante las primeras 36 hpc y posteriormente para las 40 hpc y 60 hpc los niveles

registrados correspondieron a 136 pg/mL y 11 pg/mL respectivamente. Para las 72 hpc, el nivel de IL10 registrado correspondió a 7 pg/mL.

Durante todo el ensayo los niveles de IL10 registrados en el caso de las células control fueron mayores respecto a los niveles observados para las células silenciadas en ambos genes; los niveles de IL10 en las células transfectadas con el control negativo de silenciamiento presentaron una tendencia similar a la observada para las células silenciadas en el gen *socs1*.

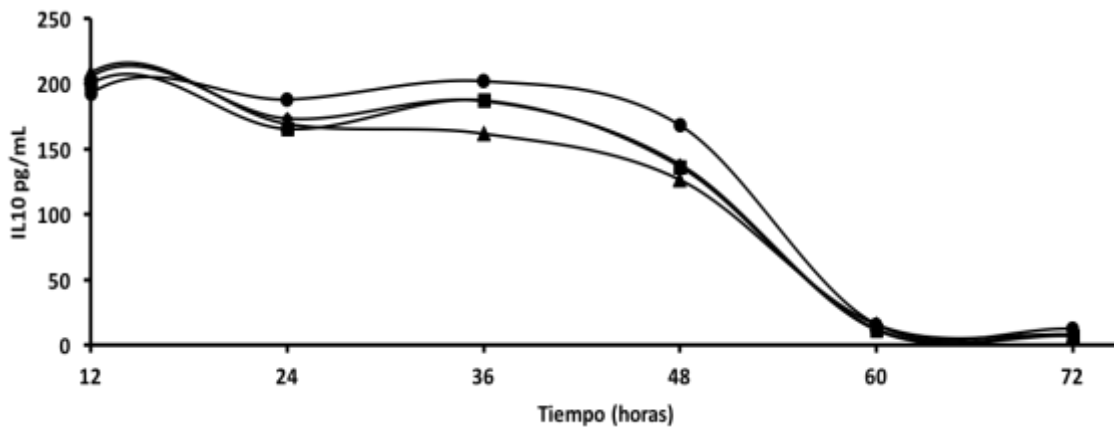


Fig.17 Cinética de la producción de IL10 en co cultivos de células dendríticas y linfocitos T silenciados. Control (●), células silenciadas en *socs1* 2.5nM (◆), células silenciadas en *socs3* 2.5nM (▲), Control negativo de silenciamiento 2.5 nM(■).

Respecto a la cinética de IL10 observada para las células silenciadas con la concentración 5nM de los diferentes ARNi (Fig.18) se observó un aumento en los niveles de dicha citocina durante las primeras 12 hrs del ensayo. Para el caso de las células silenciadas en el gen *socs1*, el nivel de IL10 disminuyó de 205 pg/mL durante las 12 hpc a 180 pg/mL durante las 36 hpc y posteriormente, la concentración de IL10 disminuyó progresivamente registrándose concentraciones de 136 pg/mL, 15 pg/mL y 5 pg/mL durante las 48, 60 y 72 horas post co cultivo; cabe mencionar que durante todo el ensayo los niveles de IL10 registrados para células silenciadas en *socs1* fueron menores respecto al control. En el caso de las células silenciadas en el gen *socs3*, el nivel de IL10 disminuyó de 197 pg/mL a 162

pg/mL durante las primeras 24 hpc; sin embargo, durante las 36 hpc se registró un aumento evidente de IL10 correspondiente a 252 ng/mL y posteriormente se registró una disminución de 142 pg/mL y 18 pg/mL durante las 48 y 60 hpc respectivamente. El promedio de IL10 en sobrenadantes correspondientes a 72 horas fue 9 pg/mL. En el caso de las células transfectadas con el control negativo de silenciamiento, se observó una cinética de producción de IL10 similar a la observada para el caso de las células silenciadas en el gen *socs3*.

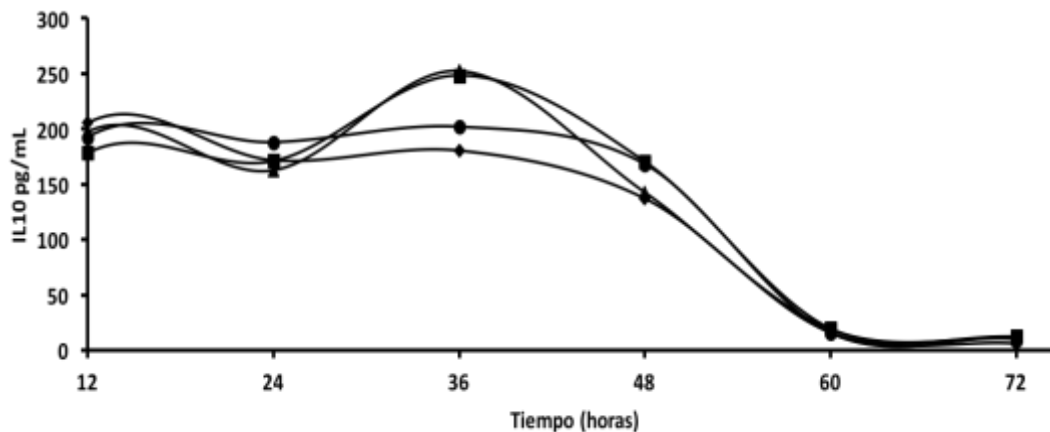


Fig. 18 Cinética de la producción de IL10 en co cultivos de células dendríticas y linfocitos T silenciados en *socs1* y *socs3*. Control (●), células silenciadas en *socs1* 5nM (◆), células silenciadas en *socs3* 5nM (▲), Control negativo de silenciamiento 5nM (■).

VII.6 Proliferación y activación de células T

Para determinar los índices de proliferación y activación de las células T, teniendo en cuenta el tamaño y altura de las células se ubicó la región donde se encuentra la población de linfocitos y se construyó el gráfico FSC-A vs FSC-H (Fig.20 A); a partir de esta región, se seleccionó la población a analizar, P2, mediante la construcción del gráfico FSC-A (tamaño) vs SSC-A (granularidad) (Fig.20 B). Posteriormente, para obtener el porcentaje de células proliferantes se estableció la región de proliferación de células T utilizando un gráfico *dot plot* de contorno (Fig.20 C) y se analizó el porcentaje de linfocitos T positivos para CD25⁺ y dobles positivos CD25⁺Foxp3⁺ (Fig.20 D).

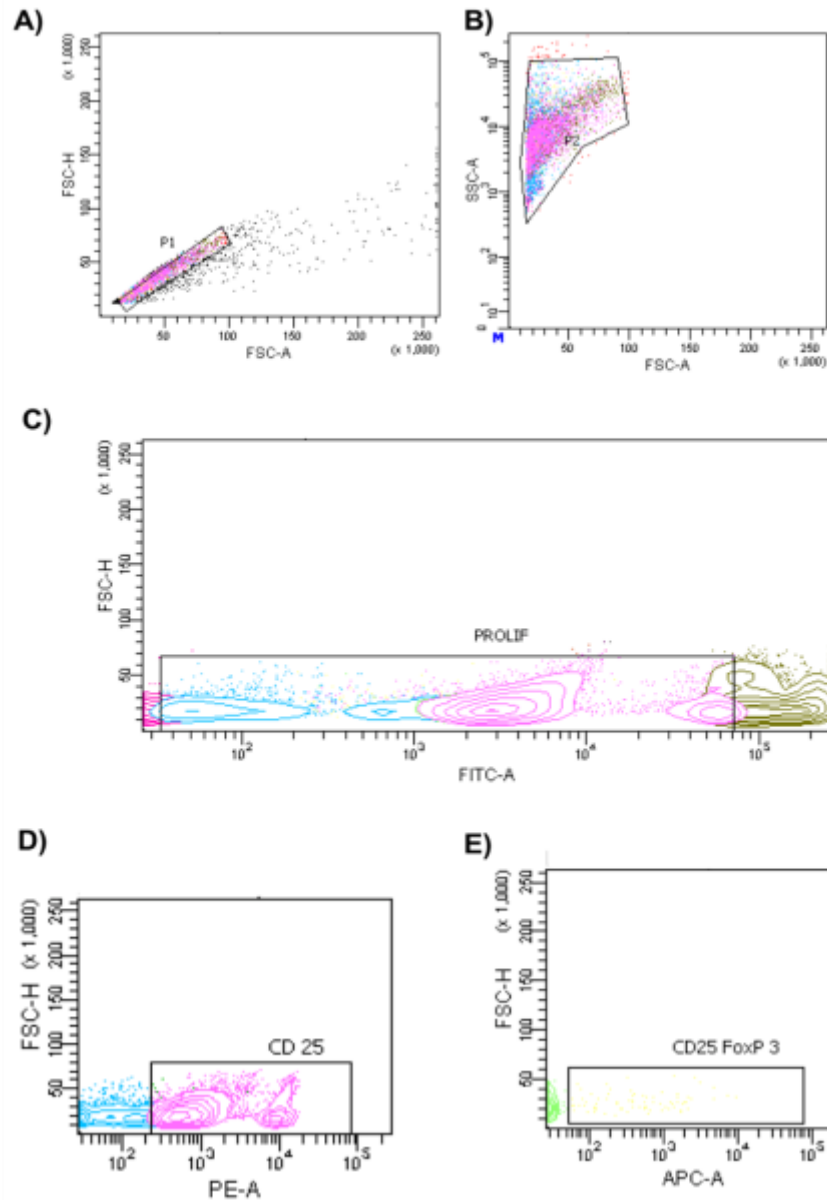
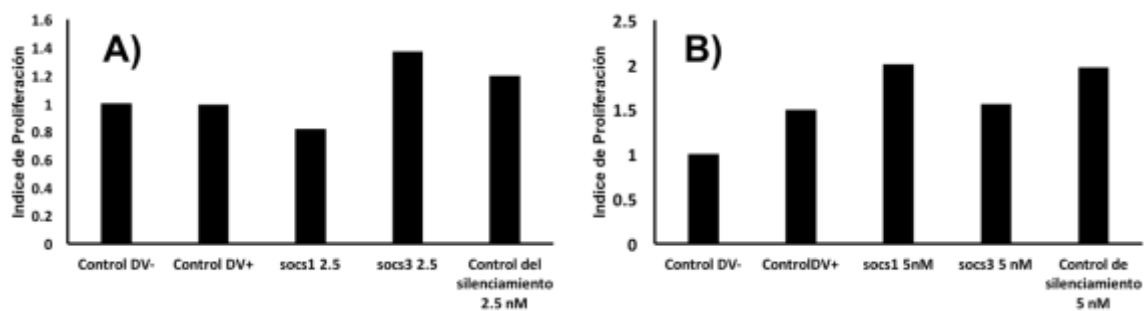


Fig.19 Secuencia de análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo. A) Grafico FSC-A vs FSC-H para la selección de la población de linfocitos T; B) Grafico FSC-A vs SSC-A para la delimitación de la población de estudio; C) Grafico *dot plot* de contorno para determinar proliferación; D) Grafico *dot plot* de contorno para las células CD25+ y E) Grafico *dot plot* de contorno para células CD25⁺Foxp3⁺.

Para realizar los análisis de índice de proliferación y activación, se consideró como control negativo linfocitos T obtenidos de co-cultivos con células dendríticas sin infectar (Control DV-) y como control positivo linfocitos T obtenidos de co cultivos con células dendríticas infectadas con DENV. En el caso de las células silenciadas con la concentración 2.5 nM de los diferentes ARN de silenciamiento (Fig.21 A), en el caso de las células silenciadas en *socs1*, se observó un menor índice de

proliferación (0.81) con respecto al control negativo DV-; para el caso de las células silenciadas en *socs3*, el índice de proliferación observado fue 1.3 veces mayor con respecto al control DV- y la diferencia estadística entre ambos fue significativa ($p < 0.05$). La diferencia estadística entre índice de proliferación observado tanto para el control negativo DV- como para el control positivo DV+ no fue significativa ($p > 0.05$). Cabe mencionar que para el caso del control de silenciamiento se observó un índice de proliferación 1.1 veces mayor con respecto al control negativo DV- y la diferencia estadística entre ambos fue significativa ($p < 0.05$).

Por otra parte, al comparar la proliferación de células T con la concentración 5 nM de cada uno de los ARN de silenciamiento (Fig.21 B) en todas las condiciones se observó un incremento en el índice de proliferación con respecto al control DV-; para el caso de las células silenciadas en *socs1* se observó un incremento de 2.0 mientras que para las células silenciadas en *socs3* el incremento observado fue de 1.5 y la diferencia estadística entre ambos respecto al control negativo DV- fue significativa ($p < 0.05$). El índice de proliferación de las células transfectadas con el control de silenciamiento fue 1.9 veces mayor que el observado para el control negativo DV- y la diferencia estadística entre ambos fue significativa ($p < 0.05$).



En cuanto al índice de activación de las células T, para las células silenciadas con las condiciones 2.5 nM (Fig.22 A) se observó un incremento en el índice de activación de todas las condiciones evaluadas respecto al control; las células

utilizadas para evaluar el silenciamiento en *socs1* y *socs3* presentaron un índice de activación mayor en 1.5 y 2 veces respectivamente, mientras que el índice de activación en las células utilizadas como control de silenciamiento fue 2 veces mayor. Cabe destacar que el índice de activación observado para el control positivo DV+ fue 1.9 veces mayor con respecto a las células DV-. La diferencia estadística entre los grupos evaluados y el control negativo DV- fue significativa ($p < 0.05$).

Finalmente, la activación de células T con la condición 5 nM de los diferentes ARN de silenciamiento (Fig.22 B) siguió una tendencia similar a la observada para las células evaluadas con la condición 2.5 nM. El índice de activación observado para las células utilizadas como control positivo fue de 1.9. Las células utilizadas para evaluar el silenciamiento en *socs1* y *socs3* presentaron índices de activación de 2.5 y 2.1 respectivamente y en el caso del control de silenciamiento el índice de activación observado fue de 2.07. La diferencia estadística entre los grupos evaluados y el control negativo DV- fue significativa ($p < 0.05$).

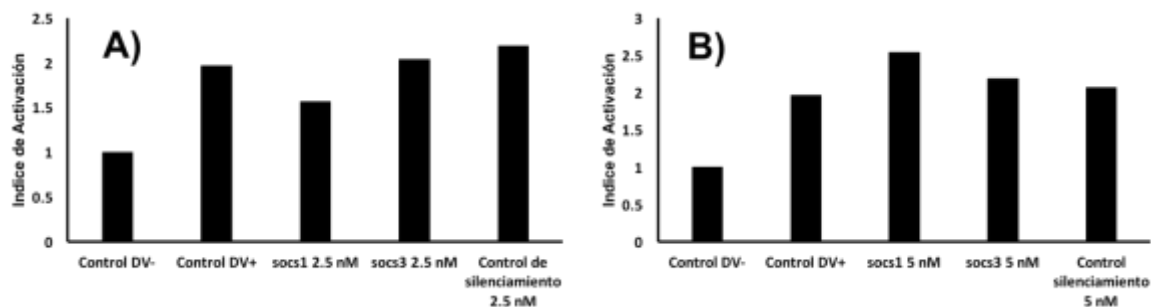


Fig.21 Índice de activación de células T. A) Índice de activación en células con las condiciones 2.5 nM de los diferentes siRNA, B) Índice de activación en células con las condiciones 5 nM de los diferentes siRNA.

VIII. Discusión

VIII. 1 Diferenciación de células dendríticas

Las células dendríticas son consideradas potentes células presentadoras de antígenos, fundamentales para el inicio y desarrollo de una respuesta inmunitaria efectiva frente a diversos agentes infecciosos. En la práctica, dada la abundancia

relativa y facilidad de obtención, la gran mayoría de investigaciones se ha centrado en el uso de las propiedades y función de las células dendríticas del linaje mielóide ya que pueden derivarse con relativa facilidad en el laboratorio a partir de monocitos de sangre periférica para ser utilizadas en modelos de respuesta inmune frente a diversos agentes infecciosos (Granados y Delgado, 2008; Carrillo *et al.*, 2009).

En el presente trabajo se diferenciaron células dendríticas *in vitro* a partir de sus precursores monocíticos en sangre periférica para ser utilizadas en el estudio de la respuesta celular mediada por linfocitos T. Para el caso particular de la infección por DENV, debido a la ausencia de modelos animales para el estudio adecuado de la enfermedad, el desarrollo de modelos *in vitro* que contribuyan a comprenderla cobra relevancia (Costa *et al.*, 2013). El principal objetivo de la diferenciación de células dendríticas fue generar células maduras funcionales capaces de realizar la presentación de antígenos y activación de los linfocitos T para lo cual se desarrolló un protocolo de diferenciación en el que se utilizaron las citocinas GM-CSF e IL4 ampliamente reportadas como inductores de la diferenciación por autores como Granados y Delgado (2008), Palucka y colaboradores (1998) y Estrada y colaboradores (1998), entre otros.

Para corroborar la correcta diferenciación de las células se evaluaron las moléculas de superficie HLA-DR, CD80, CD86, CD83, CD1a, CD205 y CD206 en células diferenciadas consideradas como células inmaduras (iDC's) y células diferenciadas inducidas a un estímulo de maduración mediante el uso de LPS (mDC's). Las moléculas CD205, CD206, CD1a y CD83 presentaron altos niveles de expresión, siendo los niveles observados para esta última junto con la ausencia del marcador CD14 (datos no mostrados) la confirmación de la correcta diferenciación de monocitos a células dendríticas. Ya que uno de los principales factores relacionados con la activación de linfocitos es la expresión de HLA-DR, se prestó especial atención en esta molécula. Tanto en las células maduras e inmaduras, el porcentaje de expresión de HLA-DR estuvo cercano al 100% (Fig. 13B) con lo que es posible afirmar que ambos estados de maduración son funcionales y podrían presentar

antígenos a los linfocitos T, además, algunos autores sostienen que la correcta expresión de la molécula HLA-DR confiere protección contra el desarrollo de las manifestaciones clínicas graves de dengue (Alarcón *et al*, 2000), por lo que porcentajes de expresión como los observados en este estudio podrían estar relacionados con la correcta resolución de la enfermedad. Otras de las principales moléculas tomadas en cuenta fueron CD80 y CD86 las cuales, se ha demostrado que son las responsables de proveer las señales de co estimulación que regulan y potencian la activación de células T tanto *in vitro* como *in vivo* (Dominguez-Soto y Corbi, 2007). Steinman y colaboradores (2013) sostienen que las células dendríticas inmaduras expresan moléculas de adhesión y co estimulación en niveles relativamente bajos, sin embargo, en este estudio los niveles de ambas moléculas, CD80 (Fig. 13C) y CD86 (Fig. 13D), presentaron porcentajes altos de expresión y al igual la molécula HLA-DR, ambos se expresaron en porcentajes similares tanto en células inmaduras como maduras lo que indica que ambos estados de maduración podrían inducir la correcta activación de células T.

Finalmente, cabe recalcar que en conjunto el fenotipo observado en las células diferenciadas, HLA-DR+, CD80+, CD86+, CD83+, CD1a+, CD205+ y CD206+, indica la funcionalidad fisiológica de las células por lo que el protocolo de diferenciación presentado en este trabajo podría ser utilizado en otros modelos de estudio.

VIII.2 Silenciamiento de los genes *socs1* y *socs3*

El silenciamiento mediado por RNA (RNAi) es un mecanismo altamente conservado en el que moléculas de ARN de doble cadena (dsRNA) regulan la expresión de genes. Desde hace varios años, el ARNi es utilizado para la búsqueda de las funciones asociadas a varios genes mediante genómica reversa y como herramienta terapéutica en terapia génica para reducir o bloquear la expresión de genes alterados o sobre expresados (Lopez *et al.*, 2007; Correa de Adjounian *et al.*, 2008). En el presente estudio, el objetivo de utilizar ARNi, particularmente siRNA,

fue establecer concentraciones eficientes para el silenciamiento de los genes *socs1* y *socs3* en el modelo de linfocitos T que permitieran evaluar cambios en el patrón de IL10 producida por estas células durante la infección por dengue. La estandarización realizada en cultivos primarios de linfocitos T obtenidos a partir de sangre periférica mostro que el silenciamiento de ambos genes es más eficiente cuando concentraciones bajas de siRNA son utilizadas (Fig. 15 y Fig. 16); por el contrario, la eficiencia de silenciamiento observada con la concentración más alta de siRNA (10 nM) fue menor. Nakamura-Lopez y colaboradores (2009) mencionan que la concentración optima de siRNA puede variar desde 2nM hasta 2uM dependiendo de múltiples factores entre los que destacan el subtipo celular y el tiempo de vida media del mensajero o la proteína del gen en estudio, además, observaciones realizadas por autores como Rana (2007) sugieren que la eficiencia del silenciamiento está relacionada directamente con la actividad catalítica del complejo RISC encargado de la degradación de los mensajeros ya que cuando se utilizan siRNAs dirigidos a sitios accesibles en la secuencia blanco, el uso de dosis menores de dichos siRNA potencian la supresión del gen, de ahí que tanto las concentraciones 2.5 nM como 5 nM de ambos siRNA fueran seleccionadas.

Por otra parte, los transcritos de ambos genes *socs* en estudio presentaron diferencias importantes en cuanto a su expresión diferencial, donde los transcritos de la proteína SOCS1 fueron mayores que los transcritos de la proteína *socs3* (Fig. 15 y Fig. 16). Este patrón de expresión diferencial es consistente el trabajo realizado por Egwuagu y colaboradores (2002) en el que reportaron que la expresión del gen *socs1* en células que no han sido polarizadas hacia el patrón Th2 es hasta cinco veces mayor que la expresión de *socs3*. Otra de las observaciones relacionadas a la expresión relativa de *socs1* y *socs3* fue la variabilidad observada para ambos genes; dada la naturaleza de la muestra se esperaba cierta variabilidad, misma que se intentó reducir al evaluar el silenciamiento de *socs1* y *socs3* en la línea celular Jurkat; sin embargo, la expresión de transcritos de ambas proteínas se vio aumentado considerablemente en las células transfectadas con el control del silenciamiento (datos no mostrados) por lo que se optó por continuar con el

silenciamiento de células de cultivo primario. Para reducir la variabilidad en la expresión de transcritos de *socs*, en futuros estudios, el aumento en el número de muestra debe ser considerado.

En cuanto a la secuencias de siRNA para *socs1* y *socs3* utilizadas durante el presente estudio cabe mencionar que, ambas tienen una longitud 19 nucleótidos y su eficiencia fue corroborada utilizando la base de datos GenomeARNi[1]; ambos parámetros son de importancia en la efectividad (potencia), estabilidad y especificidad del siRNA además de que la estabilidad y longitud de la estructura son importantes para evitar la activación de la respuesta inmune innata mediada por receptores de tipo Toll (TLRs), la activación de la respuesta mediada por interferones y la afectación de mRNAs de genes no relacionados (Ortiz-Quintero, 2009).

Cabe destacar que, en el presente trabajo, no se observó efecto de silenciamiento en los transcritos de los genes *socs1* y *socs3* como resultado del uso del siRNA utilizado como control negativo de silenciamiento, por el contrario, una de las principales observaciones realizadas es que dicho control negativo de silenciamiento indujo una mayor producción de transcritos que la observada en las células estimuladas con IFN α en células con las condiciones 2.5 nM y 5 nM de cada uno de los genes en estudio, por lo que se sugiere que el uso del siRNA All Star de Qiagen como control negativo podría no ser el más adecuado al menos en este modelo de estudio; a pesar de cumplir con parámetros como lo es el tamaño de la secuencia mencionado con anterioridad y la no homología con genes mamíferos, valdría la pena explorar otras opciones. Simone y Provenzano (2004) sugieren que, debido a la alta especificidad de la interferencia mediada por ARN, un siRNA con una secuencia en la cual un nucleótido sea diferente a la secuencia utilizada para inducir el silenciamiento puede ser utilizada como control negativo; de ser utilizado este enfoque para futuros experimentos con las proteínas SOCS, factores como la ausencia de homología con otros blancos debe ser confirmada.

VIII.3 Efecto del silenciamiento de los genes *socs1* y *socs3* en la producción de IL10 y la activación y proliferación de células T

Desde la década siguiente a su descubrimiento, los miembros de la familia de supresores de señales de citocinas han sido estudiados por su potencial uso como inmunomoduladores de diversas enfermedades (Baker *et al.*, 2009); en el presente estudio exploramos el efecto del silenciamiento de los genes *socs1* y *socs3* en la producción de IL10 como aporte al conocimiento del potencial de las proteínas *socs* como blanco de inmunomodulación para el control de patogénesis virales, particularmente la generada por el virus DENV.

Para generar una mejor comprensión de los niveles de IL10 evaluados en sobrenadantes del co-cultivo de linfocitos T silenciados y células dendríticas infectadas por DENV2, previo al co-cultivo se evaluó la cinética de producción de IL10 en células dendríticas infectadas (Fig.17); entre las principales observaciones de esta cinética destaca la ausencia de IL10 durante las primeras 24 hpc y la presencia de dos picos de IL10 durante las 36 y 60 hpc. La principal observación de este estudio en cuanto a la producción de IL10 en co-cultivos de células silenciadas es que, aparentemente, la respuesta generada por células T es dependiente de la concentración de ARNi; en los resultados obtenidos utilizando la concentración 2.5 nM de los diferentes ARNi destaca que, durante todo el experimento, los niveles de IL10 en sobrenadantes de co-cultivo tanto para las células silenciadas en *socs1* como para las células silenciadas en *socs3* fueron menores que los observados en el sobrenadante de las células control, mientras que en las células silenciadas con la concentración 5 nM de los siRNA, se registró un aumento en los niveles de la concentración de IL10 en células silenciadas en *socs3* con respecto a las células control desde las 24 hpc mismo que disminuyó durante las 48 hpc. En conjunto estos resultados podrían indicar que el silenciamiento en *socs* es más eficiente y estable a menores concentraciones de siRNA; las implicaciones biológicas del uso de concentraciones elevadas de ARNi y el aumento de IL10 podrían derivar en la polarización de linfocitos hacia un fenotipo Th2 el cual ha sido propuesto por varios

autores como determinante en el desarrollo de cuadros clínicos de Fiebre Hemorrágica (Guzman y Kouri, 1996; Chaturvedi *et al.*, 2000).

Al igual que en la producción de IL10, los índices de proliferación y activación en células silenciadas presentaron un comportamiento dependiente de la concentración de siRNA utilizada para el silenciamiento de los genes *socs*. De manera general, en células silenciadas con la concentración 2.5 nM, los linfocitos *socs3*⁻ presentaron mayores índices de proliferación y activación que los linfocitos *socs1*⁻ y este comportamiento se invirtió en el caso de los índices de proliferación y activación de los linfocitos transfectados con la concentración 5 nM de los diferentes siRNA. Cabe mencionar que el aumento observado en la proliferación y activación de células T así como el incremento en la producción de IL10 en células transfectadas con el control negativo de silenciamiento sugiere que el uso del siRNA All Star de Qiagen como control negativo podría no ser el más adecuado en este modelo de estudio.

Por otra parte, a pesar de que en el presente trabajo se demostró la interacción entre célula dendrítica y linfocitos T (Anexo I), considerando que uno de los mecanismos utilizados como estrategia por DENV para la desregulación del sistema inmune es la inhibición de la respuesta de IFN en células presentadoras de antígeno como lo son las células dendríticas (Rodríguez-Madoz, 2010), valdría la pena evaluar la producción de IFN α por células dendríticas previo al co-cultivo con Linfocitos T para descartar que los niveles de IL10 observados en el presente estudio son el resultado de una presentación antigénica ineficiente por parte de la célula dendrítica.

Adicionalmente en este trabajo, se evaluó la proporción de células con fenotipo Foxp3 (Anexo II); bla bla bla y colaboradores evaluaron en el efecto del silenciamiento de *socs3* en linfocitos T y encontraron que el fenotipo de las células era foxp3⁺ lo que indica la presencia de células reguladoras había mayor producción de IL10 por acción de TGFB. En el presente estudio se evaluó la proporción de células Foxp3 a las 96 hpc, sin embargo, en futuras evaluaciones la

determinación del factor de transcripción nuclear a lo largo del experimento así como la determinación de la expresión de transcritos o cantidad de proteína de TGFB podría complementar el conocimiento de por que hay mas il10.... Por lo que los altos niveles de IL10 observados en este estudio podrían estar relacionados con la polarizaciónn foxp3+ debido a la perdida de socs3.

Los resultados del presente estudio representan un aporte al conocimiento de la respuesta inmune a la infección generada por el virus DENV, particularmente, la respuesta celular mediada por linfocitos T así como el papel de las proteínas SOCS en dicha respuesta. Aunado a los antecedentes generales del grupo de trabajo, la información generada en este estudio pone de manifiesto el potencial uso terapéutico de las proteínas SOCS en el control de patogénesis virales.

IX. Conclusiones

- Las concentraciones 50 ng/mL y 25 ng/mL de las citocinas GMCSF e IL4 respectivamente, inducen la correcta diferenciación de células mononucleares a células dendríticas.
- El fenotipo de las células diferenciadas es HLA-DR+, CD80+, CD86+, CD83+, CD1a+, CD205+ y CD206+.
- Las concentraciones 2.5nM y 5nM de los siRNA específicos para *socs1* y *socs3* son eficientes para el silenciamiento de ambos genes.
- El patrón diferencial de expresión de transcritos de *socs* coincide con el reportado en la bibliografía.
- Las concentraciones 2.5 nM de los siRNA para *socs1* y *socs3* induce la producción de menores concentraciones de IL10 respecto a las células control infectadas con DENV.
- La concentración 5 nM del siRNA específico para *socs3* induce una mayor producción de IL10 en relación a las células control infectadas con DENV.

- La proliferación y activación de células T es dependiente de la concentración de ARNi.

X. Perspectivas

- 1) Determinar los niveles de $IFN\alpha$ en cultivos de células dendríticas infectadas con DENV2 para descartar que los niveles de IL10 observados en este estudio están relacionados con el mecanismo de evasión de respuesta inmune generado por el virus en la célula dendrítica.
- 2) Evaluar el silenciamiento de los genes *socs1* y *socs3* en linfocitos T utilizando otro control negativo de silenciamiento.
- 3) Evaluar la expresión de otras citocinas implicadas en la respuesta inmune tales como IL6, $IFN\gamma$, IL8 y $TNF\alpha$.

XI. Anexos

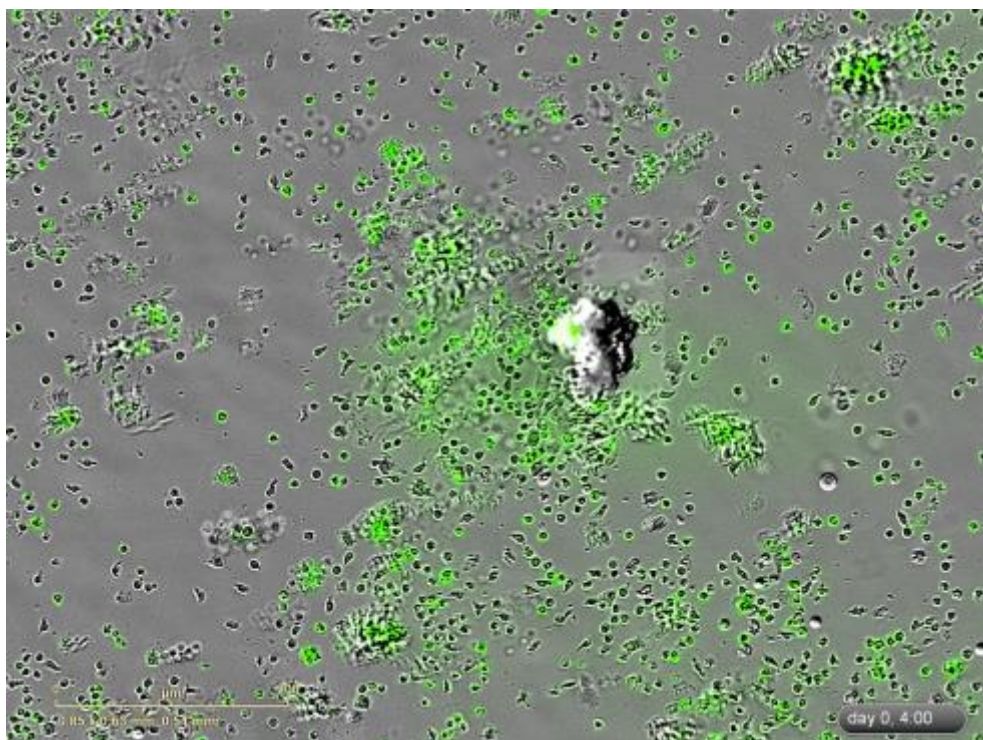


Fig.22 Interacción entre células dendríticas y linfocitos T. Al centro se muestra un agregado de células dendríticas; la presencia de linfocitos T se evidencia por la señal verde fluorescente.

XII. Referencias

Avirutnan P.; Malasit P.; Seliger B.; Bhakdi S. y M. Husmann. 1998. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation and apoptosis. *J Immunol.* 161(11). 6338-6346 pp.

Basu A. y U. C. Chaturvedi. 2008. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS. Immunol Microbiol.* 53. 287-299 pp.

Baker J. B.; Nowoslawski A. L. y E. N. Benveniste. 2009. SOCS1 and SOCS3 in the control of CNS immunity. *Trends Immunol.* 30(8). 392-400 pp.

Carrillo E. F.; Delgado G.; Ojeda P.; Rodríguez C. A.; Buitrago M. R. y F. A. Aristizábal. 2009. Modulación de la diferenciación de células dendríticas por antígenos tumorales pulmonares. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.* 38(2). 172-192 pp.

Cedillo-Barrón L.; García-Cordero J.; Bustos-Arriaga J.; León-Juárez M. y B. Gutierrez-Castañeda. 2014. Antibody response to dengue virus. *Microbes and Infection.* 16. 711-720 pp.

Chaturvedi U. C.; Agarwal R.; Elbishbishi E. A. y A. S. Mustafa. 2000. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implication for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbol.* 28(3). 183-188 pp.

Chen R-F.; Yang K. D.; Lee I-K.; Liu J-W.; Huang C-H.; Lin C-Y.; Chen Y-H.; Chen C-L. y L. Wang. 2014. Augmented miR-150 expression associated with depressed SOCS1 expression involved in dengue haemorrhagic fever. *Journal of Infection.* 69. 166-174 pp.

Correa de Adjounian M. F.; Adjounian H. Y S. H. Adjounian. 2008. Silenciamiento de genes mediante RNA interferencia, Consideraciones sobre el mecanismo y diseño de los sistemas efectoros. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica.* 27. 22-25 pp.

Chuansumrit A.; Puripokai C.; Butthep P.; Wongtiraporn W.; Sasanakul W.; Tangnaratchakit K.; Chanhakan S. y S. Yoksan. 2010. Laboratory predictors of dengue shock syndrome during the febrile stage. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 41(2). 326-332 pp.

Chulbul M. I. A.; Dabelic R.M; Martin P. J.; Jager D. L.; Mohammad H. S. y H. M. Johnson. 2014. Enhancement of Antiviral Immunity by Small Molecule Antagonist of Suppressor of Cytokine Signaling. *J Immunol.* 185. 1103 – 1113pp.

Dimitriou D. I.; Clemenza L.; Scotter J. A.; Chen G.; Guerra M. F. y R. Rottaped. 2008. Putting out the fire: coordinated suppression of the innate and adaptive immune systems by SOCS1 y SOCS3 proteins. *Immunological Reviews*. 224. 265-283 pp.

Dominguez-Soto A. y A. L. Corbi. 2007. Myeloid dendritic cells lectins and their role in immune responses. *Curr Opin Investig Drugs*. 8(11). 910-920 pp.

Estrada B. R.; Jimenez S. O. Y C. G. Barona. 1998. Las células dendríticas como punto clave en la inmunoterapia antitumoral. *Actas Dermosifiliogr*. 89. 221-231 pp.

Egwuagu C. E.; Yu C-R.; Zhang M.; Mahdi R. M.; Kim S. J. y I. Gery. 2002. Suppressors of Cytokine Signaling Proteins Are Differentially Expressed in Th1 and Th2 Cells: Implications for Th Cell Lineage Commitment and Maintenance. *J Immunol*. 168: 3181-3187 pp.

Faheem M.; Ummar R.; Nasir Riaz M.; Kanwal N.; Javed F.; us Sahar S. Z. N. y I. Qadri. 2011. A molecular evaluation of dengue virus pathogenesis and its latest vaccine strategies. *Mol. Biol. Rep*. 38. 3731-3740 pp.

Fajardo-Dolci G.; Meljem-Moctezuma J.; Vicente-González E.; Venegas-Paez V. V.; Mazón-Gonzales B. y Aguirre-Gas H. G. 2012. El dengue en México. Conocer para mejorar la calidad de la atención. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 50(6). 631-639 pp.

Fang S.; Wu Y.; Wu N.; Zhang J. y J. An. 2013. Recent advances in DENV receptors. *The Scientific World Journal*. 6 pp.

Flipse J.; Wilschut J. y J. M. S. 2013. Molecular Mechanisms Involved in Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection in Humans. *Traffic*. 14: 25-35 pp.

Giordanetto F. Y R. T. Kroemer. 2003. A three dimensional model of Suppressor Of Cytokine Signaling 1 (SOCS-1). Protein Engineering. Vol. 16 no. 2. 115-124 pp.

Granados D. y G. Delgado. 2008. Células Dendríticas (CDs) diferenciadas a partir de Monocitos humanos como herramienta para el estudio de agentes antileishmaniales. Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 101-236 pp.

Green M. A.; Beatty R. P.; Hadjilaou A. y E. Harris. 2014. Innate Immunity to Dengue Virus Infection And Subversion of Antiviral Responses. J. Mol. Biol. 426. 1148-1160 pp.

Guglani L. Y S. K. Kabra. 2005. T Cell Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. Dengue Bulletin. 29. 58-69 pp.

Guzman G. M. y G. Kouri. 1996. Advances in dengue diagnosis. Clin Diagn Lab Immunol. 3: 621-627 pp.

Guzman G. M.; Halstead B. S.; Artsob H.; Buchy P.; Farrar J.; Gubler J. D.; Hunsperger E.; Kroeger A.; Margolis S. H.; Martínez E.; Nathan B. M.; Pelegrino J.L.; Simmons C.; Yoksan S. Y R. W. Peeling. Nature Reviews Microbiology. 57 – 66 pp.

Jimenez-Estrada T.; Millán-Pérez P. L.; Reyes-Leyva J. Y L. Flores-Mendoza. Año. Overexpression of the Suppressor of Cytokine Signaling 3 Correlated with IL-6 and IL-10 increased Levels in Dengue Hemorrhagic Fever Patients.

Kinjyo I.; Hiromasa I.; Hamano S.; Fukuyuma S.; Yoshimura T.; Koga K.; Takaki H.; Himeno K.; Takaesu G.; Kobayashi T. y A. Yoshimura. 2006. Loss of SOCS3 in T helper cells resulted in reduced immune responses and hyperproduction of interleukin 10 and transforming growth factor- β 1. The Rockefeller University Press. Vol. 203:4. 1021-1031 pp.

Knipe D. M. Y P. M. Howley. 2007. Fields Virology. Vol 1. 5ta edición. Lippincott Williams & Wilkins. 1550 pp.

Knosp C. A. y J. A. Johnston. 2012. Regulation of CD4⁺ T-cell polarization by suppressor of cytokine signalling proteins. Immunology. 135(2). 101-111 pp.

López T.; Silva D.; López S. y C. Arias. 2007. RNA de interferencia: el silencio de los genes. Biotecnología. 109 - 118 pp.

Martina B. E. E.; Koraka P. y A. D. M. E. Osterhaus. 2009. Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. Clinical Microbiology Reviews. 564-581 pp.

Mongkolsapaya J.; Duangchinda T.; Dejnirattisai W.; Vasanawathana S.; Avirutnan P.; Jaurungsri A.; Khemnu N.; Tangthawornchaikul N.; Chotiyarnwong P.; Sae-Jang K.; Koch M.; Jones Y.; McMichael A.; Xu X.; Malasit P.; y G. Screaton. 2006. T Cell Responses in Dengue Hemorrhagic Fever: Are Cross-Reactive T Cells Suboptimal. J Immunol. 176. 3821-2829 pp.

Rodriguez-Madoz J.R.; Bernal-Rubio D.; Kaminski D.; Boyd K. y A. Fernandez-Sesma. 2010. Dengue Virus Inhibits the Production of Type I Interferon in Primary Human Dendritic Cells. Journal of Virology. 4845-4850 pp.

Murray N. E. A.; Quam M. B. Y A. Wilder-Smith. 2013. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. Clin Epidemiol. 5: 299-309 pp.

Nakamura-López Y.; Esparza-Aguilar M. de L.; Garrido-Olvera L.; Palomar-Olguín V. M. y J. C. Gallardo-Pérez. 2009. Aplicaciones terapeticas del ARN de interferencia. Bioquímica. 26- 36 pp.

Nowoslawski Akhtar L. y E. N. Benveniste. 2011. Viral exploitation of host SOCS protein function. Journal of Virology. Vol. 85:5. 1912-1921 pp.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2009. Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. 152 pp.

Ortiz-Quintero B. 2009. RNA de interferencia: Origen y aplicación en el silenciamiento de genes. *Revista de Investigación Clínica*. 61. 412-427 pp.

Palmer D. C. y N. P. Restifo. 2009 Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation and function. *Trends Immunol*. 30(12). 592-602 pp.

Palucka K. A., Taquet N.; Sanchez-Chapuis F. Y J. C. Gluckman. 1998. Dendritic Cells as the Terminal Stage of Monocyte Differentiation. *J Immunol*. 160. 4587-4595 pp.

Pérez B. Y. 2010. Papel del Sistema inmune en la patogenia de la infección por el virus del dengue. *Pediátricas*. 19:1. 23-29 pp.

Rana M. Tariq. 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Molecular Cell Biology Nature Reviews*. 8. 23-36pp.

Rothman A. L. 2011. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and a tropical cytokine storm. *Nature Reviews Immunology*. Vol. 11, 532 – pp.

Mocellin S. y M. Provenzano. 2004. RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. *Journal of Translational Medicine*. 2. 39 pp.

Steinamn M. R.; Inaba K.; Turley S.; Pierre P. e I. Mellman. 1999. Antigen Capture, Processing, and Presentation by Dendritic Cells: Recent Biological Studies. *Human Immunology*. 60. 562-567 pp.

Stephenson J. R. 2005. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bulletin of the World Health Organization*. 4. 83 pp.

Umareddy I.; Pluquet O.; Wang Q. Y.; Vasudevan S. G.; Chevet E. y F. Gu. 2007. Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Virology journal*. 4: 91 pp.

Vargas-Alarcón G.; Hernández-Pacheco G.; Gamboa R.; Zuñiga J.; Flores C.; Gomez-Casado E.; Martinez-Laso J.; Granados J. y A. Arnaiz-Villena. 2000. Polymorphism and distribution of HLA-DR2 alleles in Mexican population. *Hum Immunol*. 62. 286-291 pp.

Vasconcelos C. V.; Tavares F. C.; Souza D. G. y M. M. Teixeira. 2013. Inflammatory and Innate Immune Responses in Dengue Infection. *The American Journal of Pathology*. 182:6. 1950-1959 pp.

Valle M. A. y I. C. Soto. 2005. Via Jak – STAT: Una visión general. *Vertientes*. 8(1-2). 14-25 pp.

Velandia M. L y J. E. Castellanos. 2011. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*. 15(1). 33-43 pp.

Whitehorn J. y C. P. Simmons. 2011. The pathogenesis of dengue. *Vaccine*. 29(42). 7221 – 7228 pp.

Zimmerer J. M.; Lesinski G. B.; Kondadasula S. V.; Karpa V. I.; Lehman A.; RayChaudhury A.; Becknell B. y W. E. Carson III. 2007. IFN- α -Induced Signal Transduction, Gene Expression, and Antitumor Activity of Immune Effector Cells Are Negatively Regulated by Suppressor of Cytokine Signaling Proteins. *The Journal of Immunology*. 178: 4832 – 4845 pp.

