

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

**Inducción de la expresión de la θ defensina y su
efecto sobre virus Dengue**

T E S I S

Que presenta

JOSÉ HUMBERTO PÉREZ OLAIS

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad en

INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Directora de Tesis: Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres

México, D.F

Agosto de 2013

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE VIROLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL, UNIDAD ZACATENCO BAJO, LA TUTORIA DE LA DRA. ROSA MARÍA DEL ÁNGEL NÚÑEZ DE CÁCERES.

DURANTE EL DESARROLLO DEL PRESENTE TRABAJO EL ESTUDIANTE CONTÓ CON BECA DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT).

NO. DE REGISTRO: 417968

AGRADECIMIENTOS

Las almas surcan las eras como las nubes los cielos, y aunque las nubes cambien de forma, color y tamaño, una nube siempre es una nube, y un alma siempre es un alma. ¿Quién sabe de dónde vienen las nubes y donde estará el alma mañana?... el este o el oeste, la brújula y el atlas...el atlas de las nubes.

El Atlas de las Nubes – David Mitchell

Las palabras siempre serán pequeñas y cortas en dimensiones pero grandes en acción y profundidad. En este trabajo tengo que agradecer a las personas que son para mí como las palabras, mi madre y mis hermanos. Las únicas personas sin las cuales todo lo que hago no existiría ni sería posible.

A la Dra. Rosa María del Ángel por escuchar y apoyar este proyecto, permitirme trabajar y aprender de ella.

A mis amigos: Sarai Medrano, Azucena Morales, Daniel Talamás, Rodrigo Estrada, Rebeca Basave, Cinthia Dionicio, Liliana Ramírez, Jael Miranda y a todas las personas que me han ayudado de una u otra forma y de manera especial a Roberto Maldonado.

A la Dra. Carmen Giovana Granados Ramírez del Depto. de Química del CINVESTAV por la generosa donación del péptido sin el cual gran parte de este trabajo no hubiese podido llevarse a cabo.

De forma general a los integrantes del laboratorio 8 y de manera particular a Rubén Soto y a Patricia Bautista por su ayuda crítica y técnica en el desarrollo del proyecto.

Finalmente a mis asesores, la Dra. Patricia Talamás y el Dr. José Luis Rosales por las aportaciones críticas y constructivas a este trabajo y por tomarse el tiempo de leerlo y escucharme.

DEDICATORIA

La fe, como el miedo y el amor, es una fuerza que hay que comprender como hacemos con los fenómenos de la teoría de la relatividad y el principio de incertidumbre. Fenómenos que determinan el curso de nuestras vidas. Ayer mi vida iba en una dirección, hoy va en otra. Ayer estaba seguro de que nunca haría lo que he hecho hoy. Estas fuerzas que a menudo rehacen el tiempo y el espacio, capaces de dar forma o de alterar a las personas que imaginamos ser, aparecen mucho antes de que nazcamos y siguen tras la muerte. Nuestras vidas y nuestras decisiones, como las trayectorias cuánticas, se entienden momento a momento. Cada punto de intersección, cada encuentro, sugiere una nueva dirección potencial.

El Atlas de las nubes – David Mitchell

De manera particular a mi Madre, mis hermanos y amigos. De manera General a todas personas que hicieron posible la realización de este trabajo en mayor o menor medida, con buenas o malas acciones e intenciones.

ÍNDICE

Índice de figuras	1
Resumen	2
Abstract	3
1. Introducción	4
1.1 Dengue Generalidades	4
1.2 Genoma del virus Dengue	4
1.3 Proteómica de virus Dengue	6
1.3.1 Proteínas Estructurales	6
1.3.2 Proteínas no estructurales	7
1.4 Ciclo de Replicación	9
1.5 Epidemiología	15
2. Patogénesis de la enfermedad	16
3. Respuesta Inmune	19
4. Defensinas	23
4.1 Defensinas y la respuesta inmune	23
4.2 Theta Defensinas	24
4.3 Estructura de los pseudogenes de la θ Defensina	25
4.4 Características estructurales	26
4.5 Actividad antiviral	27
4.6 Citotoxicidad de las retrociclinas / Theta Defensinas	29
5. Justificación	31
6. Hipótesis	31
7. Objetivos	31
7.1 Objetivo general	31
7.2 Objetivo específico	31
8. Material y métodos	32
8.1 Cultivo celular y cepa viral	32
8.2 Ensayos de plaqueo en células BHK-21 (Baby Hamster Kidney)	32

8.3	Ensayos de viabilidad celular a diferentes concentraciones de aminoglucósidos	33
8.4	Determinación del antígeno viral NS1	33
8.5	Electroforesis de sobrenadantes en geles SDS-PAGE	34
8.6	Ensayos de Western Blot	35
8.7	Ensayos de inhibición de la infección por DENV 4 por aminoglucosidos	35
8.8	Ensayos de inhibición de la infección con el péptido sintético RC-100 (Bachem) en células Huh-7	35
8.9	Ensayos de Inmunofluorescencia	36
8.10	Inmunización de ratones con péptidos sintéticos	36
9.	Resultados	38
9.1	Tratamiento de células Huh-7 con Aminoglucósidos.	38
9.2	Ensayos de viabilidad de células Huh-7 con Aminoglucósidos.	38
9.3	Ensayos de actividad antimicrobiana.	39
9.4	Producción de anticuerpos anti- θ defensina.	42
9.5	Detección de la producción de la θ defensina en células Huh-7 por inmunofluorescencia.	43
9.6	Efecto sobre la infección por Dengue del tratamiento con Gentamicina de las células Huh-7.	43
9.7	Ensayos de plaqueo de sobrenadantes de células infectadas y tratadas	46
9.8	Inmunofluorescencia de células tratadas con Gentamicina e Infectadas con DENV4	47
10.	Discusión	49
11.	Conclusiones	55
12.	Perspectivas	56
13.	Referencias	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Genoma del virus dengue con secuencia traduccional de las proteínas que codifica	5
Figura 2. Esquema general del genoma del Virus Dengue.	6
Figura 3. Distribución topológica de la poliproteína del virus sobre la membrana del lumen del retículo endoplasmático.	11
Figura 4. Ciclo de replicación de virus dengue.	12
Figura 5. Procesos celulares alterados en la infección por virus dengue	13
Figura 6. Vesículas continuas	14
Figura 7. Principales zonas de riesgo para contraer la infección por virus dengue según reportes de la OMS y CDC	16
Figura 8. Inmunopatogénesis del dengue severo.	18
Figura 9. Potenciación dependiente de anticuerpo.	22
Fig 10. Electroforesis en SDS-PAGE de sobrenadantes de células Huh-7 tratadas con distintas concentraciones de Gentamicina, Amikacina y Tobramicina durante 24 horas.	39
Figura 11. Ensayos de viabilidad celular a distintas concentraciones de los Aminoglucósidos: Amikacina, Tobramicina y Gentamicina.	40
Figura 12. Ensayos de viabilidad de células Huh-7 con Gentamicina.	41
Figura 13. Ensayos de actividad antimicrobiana de la banda menor a 10 kDda	41
Figura 14. Reconocimiento del péptido lineal de la θ defensina por el anticuerpo policlonal anti-defensina lineal generado en ratón.	42
Figura 15. Inmunofluorescencia de células Huh-7 tratadas con 200 μ g/ml de Gentamicina por 24 Hrs.	44
Figura 16. Efecto del tratamiento con Gentamicina en la secreción de NS1 en células Huh-7 infectadas con dengue.	45
Figura 17. Efecto del tratamiento con Amikacina y Tobramicina en la secreción de NS1 en células Huh-7 infectadas con dengue.	46
Figura 18. Efecto del tratamiento con Gentamicina en la producción viral en células Huh-7 infectadas con dengue.	47
Figura 19. Efecto del tratamiento con Gentamicina, Amikacina y Tobramicina en la infección por dengue de células Huh-7.	48

RESUMEN

Se estima que cada año 600 millones de personas son infectadas por el virus Dengue. La infección por cualquiera de los 4 serotipos del virus, transmitido por mosquitos del género *Aedes*, puede ser asintomática o presentar cualquiera de las manifestaciones clínicas de la enfermedad conocidas como fiebre dengue (FD) y dengue severo (DS). Hasta el día de hoy no existen esquemas farmacológicos que permitan tratar la enfermedad, ni se ha desarrollado una vacuna efectiva que proteja frente a los cuatro serotipos del virus e induzca protección a largo plazo. Debido a esto, el desarrollo de alternativas distintas a una vacuna que permitan evitar el progreso de la enfermedad a cualquiera de sus cuadros clínicos es importante. La Gentamicina, un antibiótico ampliamente conocido a nivel clínico y farmacológico, es miembro de la familia de los aminoglucósidos cuya aplicación más importante es el tratamiento de infecciones bacterianas. En el presente trabajo se investigó la posible actividad antiviral de la Gentamicina contra virus Dengue, nuestros resultados muestran que el tratamiento de la línea hepática Huh-7 con este aminoglucósido es capaz de reducir la producción viral e inhibir la secreción de NS1 además de disminuir la síntesis de proteínas virales. Estos resultados sugieren que Gentamicina puede presentar una potente actividad antiviral evitando así el progreso de la enfermedad a sus formas severas ya sea por una acción directa sobre el virus y la célula o por permitir la correcta traducción de la θ Defensina.

ABSTRACT

Each year 600 million person around the world are infected with dengue virus. The infection with any of the 4 dengue virus serotypes, transmitted by a mosquito of *Aedes* genera, can either be asymptomatic or manifest in two clinical forms of increasing severity, known as dengue fever (DF) and severe dengue (SD). In this moment the ultimate therapeutic options for the disease treatment are still the use of non-specific drugs. In addition, the development of an effective dengue vaccine has been challenging, because of the need to induce a long-lasting protection simultaneously against all four dengue virus serotypes. For these reasons, the study of non-vaccine alternatives to prevent dengue disease or to avoid the severe forms of the infection is relevant. Gentamicin is a widely known antibiotic, member of the aminoglycosides family, which main application is the control of bacterial infections. In our laboratory, the possible antiviral activity of this aminoglycoside against Dengue virus was analyzed. Our results show that treatment of the human hepatic cell line Huh-7 with gentamicin is able to reduce significantly DENV infection, detected by a reduction in viral yield, an inhibition in NS1 secretion and a decrease in viral protein synthesis. These results suggest that gentamicin may represent a potentially useful antiviral compound to avoid or reduce the severe clinical forms of the infection.

1. Introducción.

1.1 Dengue: generalidades.

El virus Dengue es miembro de la familia *Flaviviridae* y del género *flavivirus*, es el agente etiológico de la fiebre dengue (DF) y del dengue severo (SD). El dengue es la infección por arbovirus más importante en humanos en el mundo, cuya principal incidencia se encuentra en zonas tropicales y subtropicales del planeta, en las cuales habita más de la mitad de la población mundial [1, 2]. En los últimos 50 años la frecuencia de la infección por Dengue ha aumentado por lo cual se considera una enfermedad emergente. El vector del virus Dengue son los mosquitos del género *Aedes*, principalmente, *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, siendo el primero, el principal vector y el más diseminado en el planeta [1, 3, 4].

El término “Dengue” actualmente reconoce la existencia de 4 serotipos del virus íntimamente relacionados a nivel genético pero antigénicamente distintos: DENV 1, 2, 3 y 4, cada uno de los cuales agrupa entre 3 y 5 genotipos distintos [5, 6]. Dentro de los cuatro serotipos existe una homología a nivel de secuencia de aminoácidos del 62%- 67% [3] aunque todos conservan el tropismo preferencial por monocitos, macrófagos y células dendríticas [5]. Debido a la heterogeneidad entre los serotipos el diagnóstico de la infección es complicado y adicionalmente surgen reacciones secundarias ante una reinfección por diferentes serotipos en un mismo individuo. Cada serotipo es capaz de causar todo el espectro de manifestaciones clínicas que corresponden a la fiebre por Dengue y al Dengue severo [1].

1.2 Genoma de virus Dengue

El genoma del virus dengue está constituido por RNA de una sola cadena de polaridad positiva con un tamaño aproximado de 11 kb [7] y con un solo marco de lectura abierta que codifica para una poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos [8]. El procesamiento de este precursor

da lugar a diez proteínas, tres estructurales (E, prM/M y C) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) involucradas en la replicación viral (**Figura 1**) [9]. Tanto en el extremo 5' como en el 3' del genoma viral existen regiones no traducidas (UTR) cuya principal función descrita hasta ahora es regular la replicación viral y la traducción de proteínas vírales.

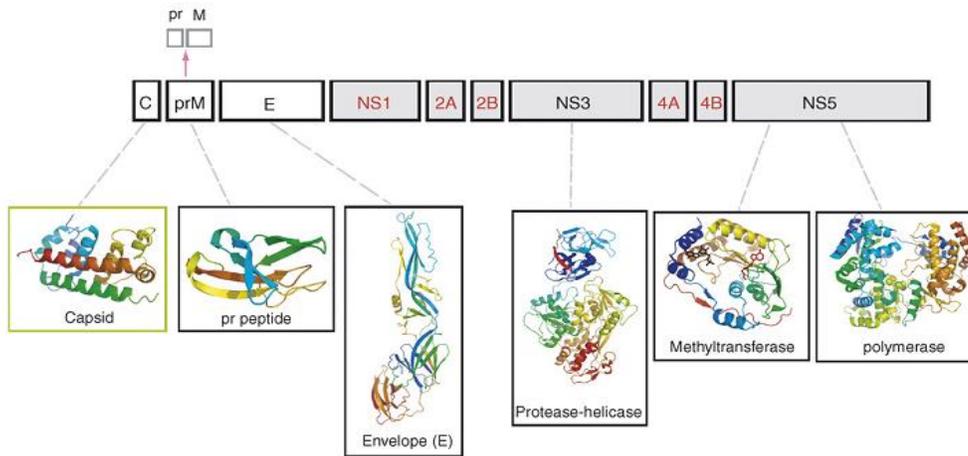


Figura 1. Genoma del virus dengue con secuencia traduccional de las proteínas que codifica. En el extremo amino terminal de la poliproteína están codificadas las tres proteínas estructurales y en seguida se encuentran las 7 proteínas no estructurales (NS). (Tomado de Perera R *et al.* 2008.)

La UTR 5' comprende alrededor de 100 nt y contiene una estructura tipo Cap I en el extremo 5', mientras que la UTR 3' contiene estructuras terciarias de RNA altamente conservadas y carece de cola poli A (tracto de poliadeninas) (**Figura 2**) [2, 10].

En cuanto a estructura, se sabe que el virión maduro tiene forma icosaédrica, mide alrededor de 50 nm y contiene tres proteínas en su superficie, la proteína de la cápside (C) que cubre al RNA viral, la proteína de membrana (M) y la proteína de la envoltura (E) ancladas a la membrana lipídica que envuelve al virión [10].

1.3 Proteómica de virus dengue

1.3.1 Proteínas estructurales.

El mecanismo de entrada de virus dengue a la mayoría de las células blanco ocurre a través de endocitosis mediada por receptor y fusión de su envoltura con la membrana endosomal en medio ácido [10, 11]. Existen tres proteínas estructurales que en conjunto permiten llevar a cabo todo este proceso. La proteína C encapsida el RNA viral y forma la nucleocapside, la cual está rodeada por una bicapa lipídica proveniente de la célula huésped en donde se anclan al menos 180 copias de las proteínas M y E [12]. Estas dos últimas proteínas son las más importantes desde el punto de vista estructural e inmunológico ya que la mayoría de anticuerpos generados durante la infección están dirigidos contra los diferentes dominios de estas proteínas lo cual provoca que sean las responsables de procesos que culminan en la progresión a un cuadro más severo de la infección.

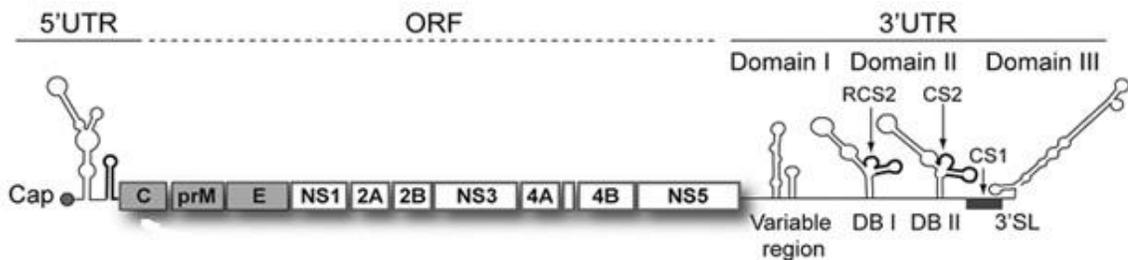


Figura 2. Esquema general del genoma del Virus Dengue. DENV tiene un genoma de aproximadamente 11 kb en cuyos extremos 5' y 3' se encuentran las regiones no traducidas (UTR) que tienen estructuras terciarias conservadas que controlan el proceso de replicación y traducción del genoma. (tomado de Iglesias & Gamarnik 2011.)

La proteína E es una glicoproteína de 53 kDa y la más importante en la superficie del virus, dentro de sus funciones están la unión al receptor celular y mediar la fusión de la membrana viral con la membrana celular. Su ectodominio contiene 3 dominios en donde el dominio I (DI) está posicionado estructuralmente entre el dominio II (DII- Dominio de homodimerización que contiene un péptido de fusión) y el dominio III de tipo inmunoglobulina que es responsable de la unión del virus a la membrana de la célula huésped [13].

Los cambios conformacionales de la proteína E están relacionados con el pH del medio, a un pH alcalino, la proteína es dimérica y a un pH ácido adquiere estructura trimérica. La proteína E es altamente antigénica y es capaz de despertar una respuesta a base de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes contra diferentes epítomos de la proteína debido a que se encuentra expuesta en la superficie viral [7, 9, 12].

La proteína M consta de 75 aminoácidos y pesa aproximadamente 9 kDa, es producto del procesamiento de la proteína prM por la proteasa furina en las cisternas del Golgi. A diferencia de la proteína E, el pH no afecta su conformación tridimensional. La proteína M está anclada a membrana a través de hélices transmembranales y tiene un papel estructural en el virus maduro al formar estructuras homodiméricas con la proteína E. Recientemente se ha reportado que M podría tener también funciones no estructurales, como la de inducir apoptosis dependiente de su localización y secuencia [14]. La proteína interactúa con proteínas celulares durante la entrada y el ensamblaje del virus, estas funciones no estructurales pueden ser a nivel del precursor (prM) o de la proteína madura (M). En 2012 Wong S.S. y cols. reportaron la localización de la proteína M en el retículo endoplasmático, en la superficie celular y de manera extracelular, por lo cual se deduce que la proteína pueda entrar en la vía secretoria celular.

1.3.2 Proteínas no estructurales.

Después del procesamiento proteolítico, cada una de las siete proteínas no estructurales son liberadas para cumplir diversas funciones dentro del ciclo replicativo del virus. NS3 es una proteína con diversas funciones, consta de 618 aminoácidos, pesa 37.5 kDa y tiene tres actividades enzimáticas: a) serín proteasa (tipo tripsina), b) RNA Helicasa y c) RTPasa/ NTPasa. Estructuralmente, está formada por 6 hélices- β que forman dos barriles β formando una triada catalítica constituida por His-51, Asp-75 y Ser-135. La proteína requiere para su correcto funcionamiento de NS2B, una proteína pequeña de 14 kDa que funciona como un cofactor. NS3

es estructuralmente dinámica y pareciera requerir una conformación extendida para su función [9].

El extremo N-terminal de NS3 rompe proteolíticamente a la poliproteína precursora en varios sitios, participando en el procesamiento co y postraducciona l de la misma. Se cree que NS3 controla de manera temporal la traducción de proteínas regulando negativamente la replicación ya que la disponibilidad de las proteínas depende de ella y su actividad proteolítica, también ha sido relacionada con la inducción de apoptosis en células infectadas.

NS5 es la proteína más conservada entre los diferentes serotipos del virus (67% de identidad entre ellos), pesa aproximadamente 104 kDa y está compuesta por 900 aminoácidos, lleva a cabo dos actividades importantes: RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y metiltransferasa [9].

El dominio RdRp de NS5 tiene una conformación canónica de mano derecha con dedos y dominios de pulgar. Para su función catalítica requiere de dos iones, coordinados por residuos de ácido aspártico, altamente conservados en su estructura. NS5 contiene además una secuencia de importación nuclear (entre los residuos 320 y 405), dominios de unión a β importina y de interacción con NS3 [7].

El dominio de metiltransferasa permite la formación de la estructura Cap tipo I presente en el extremo 5' del RNA viral y recientemente se ha descrito una nueva actividad catalítica, la 2'-O-Metilación específica de poli A, lo cual se ha observado que regula la traducción y la replicación viral, así como la evasión de la respuesta inmune a través del escape de los mecanismos de supresión mediado por IFIT (*genes relacionados con la estimulación de las vía de los INF-I*) [7, 15].

La estructura tridimensional de otras proteínas no estructurales no se encuentra disponible, pero hay cierta información sobre su función. NS1 es una glicoproteína de aproximadamente 45 kDa capaz de formar dímeros y

hexámeros que se encuentran dentro del lumen del retículo endoplasmático y que también son secretados. Se ha descrito que NS1 forma parte del complejo de replicación viral y participa en la evasión de la respuesta inmune inhibiendo la activación del complemento.

NS4A y NS4B pesan 16 kDa y 27 kDa respectivamente y se cree que inducen cambios en las membranas celulares para favorecer la replicación viral. Se sabe que NS4B está implicada en la replicación cuando interacciona con NS3. Otras proteínas como NS2 y NS4A/B están involucradas en los complejos de replicación aunque no se conoce de manera clara la función que tienen en estos sitios.

1.4 Ciclo de replicación

In vivo se ha descrito que después de la picadura del mosquito, el virus inicia su replicación en las células dendríticas residentes de la epidermis para después infectar de manera tardía a sus células huésped preferenciales, macrófagos y monocitos. Sin embargo, recientemente se ha descrito que fibroblastos residentes de la epidermis también son susceptibles a la infección [16]. Después de entrar al torrente sanguíneo y diseminarse sistémicamente, el hígado se convierte en un órgano blanco infectando el virus a los hepatocitos lo cual resulta en un aumento en la viremia sanguínea.

El primer paso en el ciclo replicativo del virus es la unión de éste a la superficie celular a través de la glicoproteína E [17]. Debido al amplio número de células permisivas a la infección por virus dengue se podría pensar que el receptor es una molécula ubicua. Hasta ahora, se han identificado diversas proteínas y moléculas que tienen interacción con el virus y están involucradas en la fusión y anclaje a la célula como la HSP70, HSP90, R80, R67, CD14, DC-SIGN, GRP78, Heparán sulfato, neolactotetraosilceramida, receptores de tipo lectina y el receptor de alta afinidad para laminina [11, 18].

El virus entra a la célula a través de endocitosis mediada por clatrina usando en algunos casos complejos de clatrina preformados lo cual implica un rodamiento del virus a través de varios receptores/correceptores hasta llegar a estos complejos, que bajo la influencia de dinamina permiten la formación de la vesícula cubierta por clatrina.

Una vez libre de clatrina, la vesícula libera al virus dentro de endosomas tempranos, los cuales maduran hasta endosomas tardíos en donde el pH se acidifica provocando cambios conformacionales en la proteína E, principalmente debidos a la protonación de histidinas que actúan como sensores de pH en los residuos en las posiciones 146 y 323 de la proteína. El cambio conformacional provoca la disociación de los homodímeros de E en monómeros lo que expone a la región hidrofóbica del péptido de fusión del dominio DII a la membrana blanco. Después se lleva a cabo la inserción de la región de fusión de DII en la membrana endosomal. Tres proteínas E con el dominio de fusión insertado en la membrana interaccionan entre si y forman un complejo trimérico a través de DII y DI, en donde esta última, estabiliza el trímero [11, 19].

En seguida DII cambia y se dobla hacia sí misma, lo que fuerza a las membranas blanco y viral a acercarse, iniciando así la formación de un “poro de fusión” en donde las membranas se fusionarán y por donde más tarde la nucleocápside será liberada al citosol. Recientemente se ha observado que existen serotipos y cepas virales capaces de utilizar vías alternativas independientes de clatrina, caveolina y balsas lipídicas[11, 12].

Una vez liberada la cápside en el citoplasma celular, el siguiente paso es la liberación del RNA viral. El RNA en el citoplasma tendrá al menos tres funciones: a) Como mRNA para la síntesis de proteínas, b) molde para la síntesis de RNA y c) como sustrato para la encapsidación. Todos estos procesos deben de ser estricta y temporalmente regulados para asegurar la replicación viral y la eficiencia de los mismos.

para la polimerización la lleva a cabo NS5 en asociación con NS3 que tiene actividad de Helicasa/proteasa (**Figura 4**).

La formación de complejos de replicación por parte de las proteínas virales involucra la modulación y explotación de vías celulares para favorecer la replicación y liberación del virus en las células infectadas. Se han identificado más de cien factores celulares involucrados en la replicación, traducción, ensamble y liberación del virus.

Una de las vías que alteradas por el virus Dengue es el sistema ubiquitin-proteosoma (SUP), lo cual le permite, de primera instancia, evadir la respuesta inmune al degradar factores antivirales como INF-I (INF- α/β) y STAT-2. Una función cuyo mecanismo aun es desconocido involucra a la vía SUP en la entrada, traducción y/o replicación del virus (**Figura 5**) [21].

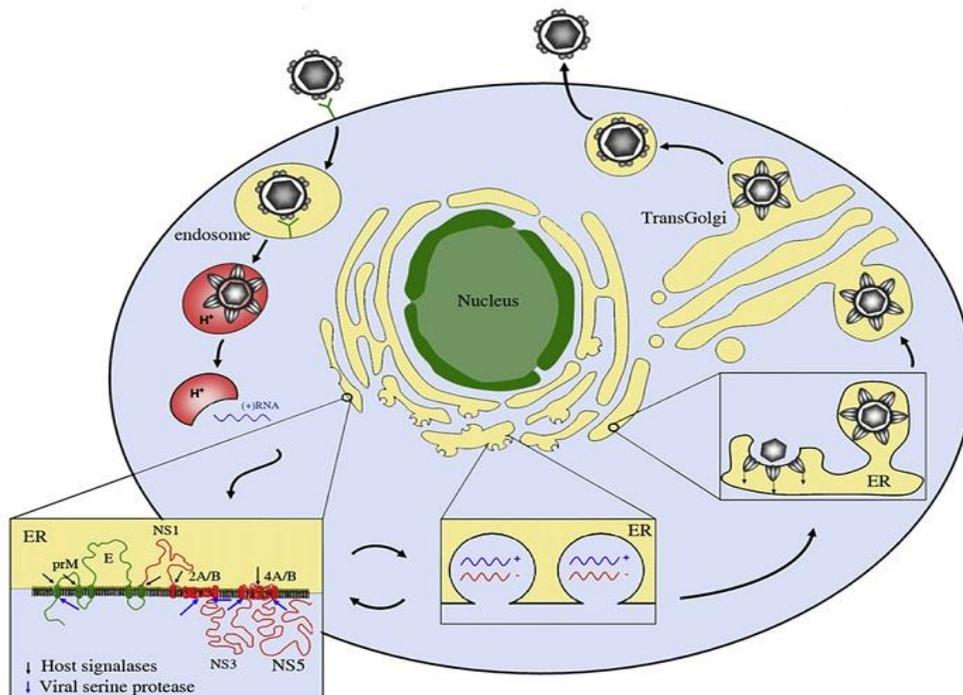


Figura 4. Ciclo de replicación de virus dengue. (Fernández-García *et al* 2009.) El virus inicia su ciclo al unirse al receptor presente en la superficie celular. A continuación el virus entra por endocitosis, liberando el RNA después de la fusión de la membrana viral y endosomal. La traducción y replicación viral ocurren en el retículo endoplásmico, mientras que la morfogénesis requiere también del tránsito a través del aparato de Golgi. El virus sale a través de vesículas exocíticas.

Por otra parte, las células infectadas por el virus inician la acumulación de “gotas lipídicas” (LD, *Lipid droplets*) que no son más que almacenes de lípidos del retículo endoplasmático. En las LD se almacena la proteína de la cápside y de esta manera participan de manera activa en el proceso de ensamblaje viral, sin embargo no se ha demostrado la asociación real de las LD con RNA viral. La proteína NS4A induce la autofagia de estas LD a través del sistema autofagosomal provocando así la movilización de triglicéridos y la obtención de energía extra en forma de ATP vía β oxidación [22]. De la misma forma, la infección viral induce un incremento en la cantidad de colesterol total a través de dos mecanismos diferentes; incrementando la captación de colesterol mediado por un aumento del receptor LDL en la superficie celular y un aumento en la síntesis mediado por la desfosforilación de la HMG CoA reductasa, enzima limitante en la síntesis de colesterol [23].

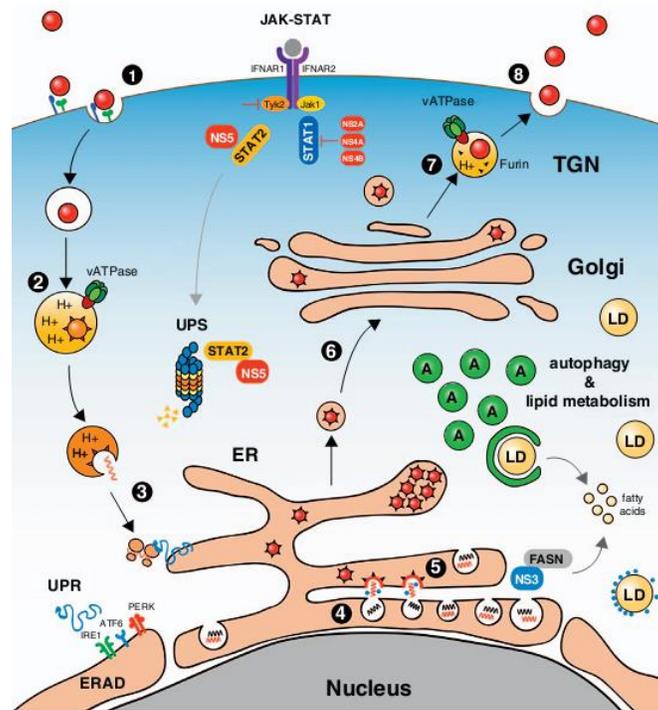


Figura 5. Procesos celulares alterados en la infección por virus dengue. Vías metabólicas y de señalización celulares alteradas por virus Dengue para beneficiar su replicación y evadir la respuesta inmune. (Tomado de Fischl W. & Bartenschlager 2011.)

Como contraparte el dominio de proteasa de la NS3 interacciona con la sintasa de ácido grasos (FASN) e inicia su reclutamiento a sitios de replicación viral en donde se observa un aumento en la biosíntesis lipídica lo cual puede favorecer la expansión de las membranas de los complejos de replicación [21]. Así el virus por una parte promueve la autofagia de almacenes lipídicos y la formación de nuevas membranas evitando de esta manera un estrés excesivo en el retículo endoplasmático, lo cual podría provocar la muerte celular.

El rearrreglo de la membrana del retículo con la subsecuente formación de vesículas se induce a través del efecto de NS4A y demás factores virales y/o celulares. Estas vesículas se conectan con el citosol mediante un poro que presumiblemente sirve como sitio de salida para el RNA de la progenie viral (**Figura 6**).

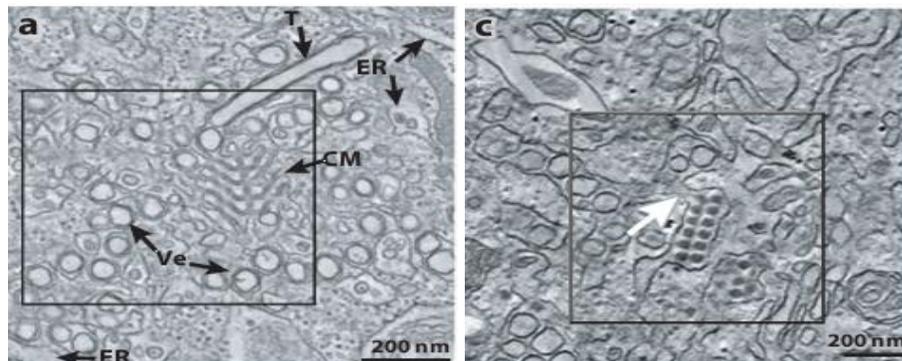


Figura 6. Vesículas continuas. La formación de vesículas continuas en el retículo endoplasmático es inducida a través del efecto de NS4A y demás factores virales y celulares. Este mecanismo probablemente sirva como un método de evasión de la respuesta inmune al evitar la detección de RNA y proteínas virales. En las microfotografías a y c se observan partículas virales dentro de vesículas en células Huh-7. (Tomado de Welsh S. et al. 2009)

Los viriones inmaduros que salen del RE son transportados a través de la vía secretora con el sucesivo paso por las cisternas del Golgi, en donde bajo la acción proteolítica de la furina y el cambio de pH el virus adquiere capacidad infectiva debido al rearrreglo de las proteínas M y E, dándole a

esta última la capacidad de unión a receptores celulares. La furina ejerce su actividad proteolítica sobre prM, dando lugar a la formación de dos fragmentos: el péptido pr y la proteína M [13]. De esta manera las partículas virales siguen su curso a través de la vía secretora y salen de la célula. Ahora bien, el procesamiento llevado a cabo por la furina no siempre es exitoso, por lo cual son liberados virus maduros e inmaduros [19]. El péptido pr se cree que funciona como un péptido que protege el dominio II de la proteína E, evitando así la unión prematura del virus con alguna membrana celular [21].

1.5 Epidemiología

La infección por dengue se considera la enfermedad viral transmitida por mosquitos más importante en el mundo. Se calcula que hay entre 38 y 50 millones de infecciones nuevas por año con hasta 21 000 muertes en el mismo lapso de tiempo [10]. Además al menos 3.5 mil millones de personas (50% de la población mundial) están en riesgo de adquirir la enfermedad [3, 5, 12, 24]. En los últimos 50 años la infección por Dengue se ha extendido a regiones no endémicas y en este mismo periodo la OMS estima que la frecuencia de la infección ha amentado 30 veces [20], lo cual se cree se debe a la explosión demográfica que han sufrido algunas zonas así como el aumento en el número de viajeros a zonas endémicas (**Figura 7**). Recientemente se llevó a cabo un estudio en donde se dio a conocer una cifra de infecciones por año tres veces más grande a la reportada por la OMS, esto es 600 millones de personas [25].

En los últimos 50 años la movilización poblacional así como la destrucción e invasión de zonas selváticas y endémicas de los vectores *Aedes aegypti* y *A. albopictus* aunado a la adaptación de los mismos a nuevos ambientes, ha producido un aumento explosivo en la incidencia de la enfermedad en países endémicos y no endémicos por lo que se ha calificado como un enfermedad/infección emergente. La infección es considerada endémica en más de 100 países de África, América, Asia y el Mediterráneo.

Los cálculos hechos por Kuno G. en 1997 estiman que la población mínima requerida para sostener la transmisión del virus es de 10 000 a 100 000 personas, observándose que poblaciones donde han surgido brotes son mayores a 10 000 individuos [3, 12].

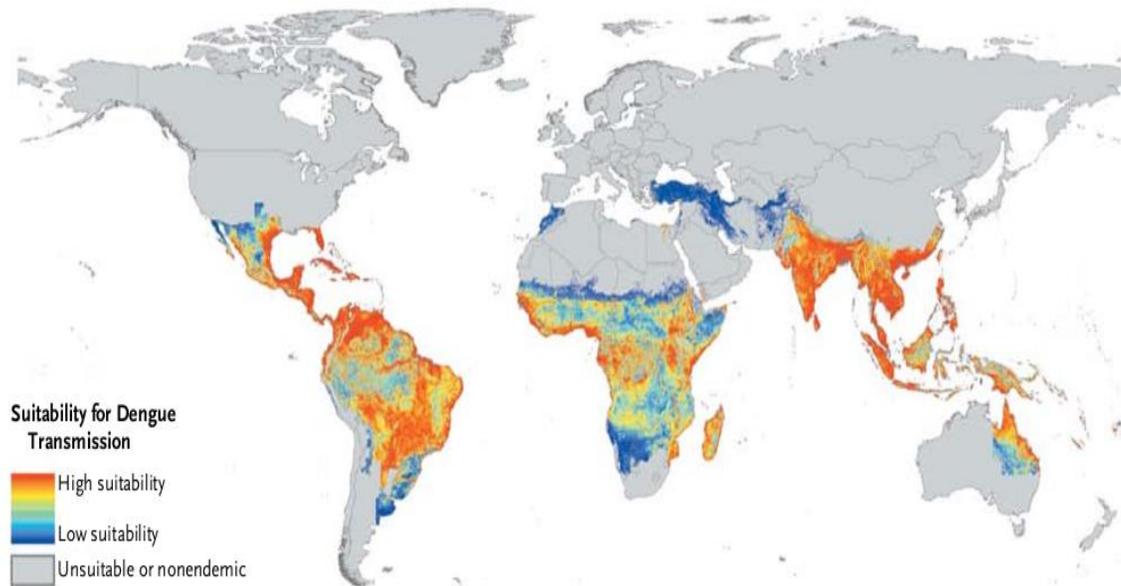


Figura 7. Principales zonas de riesgo para contraer la infección por virus dengue según reportes de la OMS y CDC. (Tomado de Simmons C., 2012.)

2.- Patogénesis de la enfermedad.

La enfermedad causada por el virus dengue puede ser dividida en dos clases, fiebre Dengue (FD) y dengue severo (SD). Entre el 50% a 90% de los pacientes son asintomáticos, sin embargo, otros presentan FD la cual es un proceso patológico febril autolimitado. El dengue severo, en contraste, tiene como principal característica el aumento en la permeabilidad vascular sin daño en la morfología del endotelio capilar, lo cual puede conducir a un Shock hipovolémico y a la muerte [16]. Después de un periodo de incubación de entre tres y siete días aparecen repentinamente los síntomas y lo siguen un periodo de tres fases: 1) fase febril, 2) fase crítica y una 3) fase de recuperación espontánea.

La fase febril se caracteriza por una fiebre igual o mayor a 38.5 °C la cual está acompañada de dolor de cabeza y abdominal, vómito, mialgia y en algunas ocasiones “rash” macular. Se observan pequeñas manifestaciones hemorrágicas reflejadas en petequias y los análisis de laboratorio arrojan trombocitopenia y leucopenia de media a moderada y aumento en los niveles de aminotransferasas hepáticas. La fase dura de 3 a 7 días después de lo cual, dependiendo de diversos factores, el paciente puede recuperarse sin mayores complicaciones. Si el paciente se recupera en esta fase de forma exitosa, entonces el caso corresponde a una fiebre clásica por dengue [4, 9].

Después de 4 a 7 días en que ha cesado la fase febril inicia la fase crítica la cual sufren una pequeña proporción de pacientes siendo más frecuente en niños y adultos jóvenes. La fase se caracteriza por el inicio de un síndrome de fuga vascular sistémica, los resultados de laboratorio evidencian un proceso de hemoconcentración, hipoproteinemia, efusión pleural y ascitis.

Es en esta fase donde el organismo inicia un proceso compensatorio para equilibrar la homeostasis del flujo sanguíneo a órganos críticos, hay pérdida de volumen plasmático con la subsecuente disminución de la presión cardiaca, esto debido a que la permeabilidad vascular ha aumentado. Si la presión disminuye más allá de los 20 mmHg hay signos de colapso vascular y es entonces cuando es evidente que el paciente ha desarrollado el síndrome de choque por dengue, el cual de no ser tratado adecuadamente puede ocasionar la muerte.

Los síntomas previos al inicio de la fase crítica incluyen vómito persistente, incremento en el dolor abdominal, tendencia a desarrollar hepatomegalia, hemoconcentración, rápida disminución en el conteo plaquetario ($20 \times 10^9/L$) y un comportamiento de letargo o agitación. Las manifestaciones hemorrágicas son comunes en esta fase pudiendo presentarse en piel y mucosas (ya sea vaginal, gastrointestinal o ambos). También existe una fuerte evidencia de aumento en la permeabilidad vas-

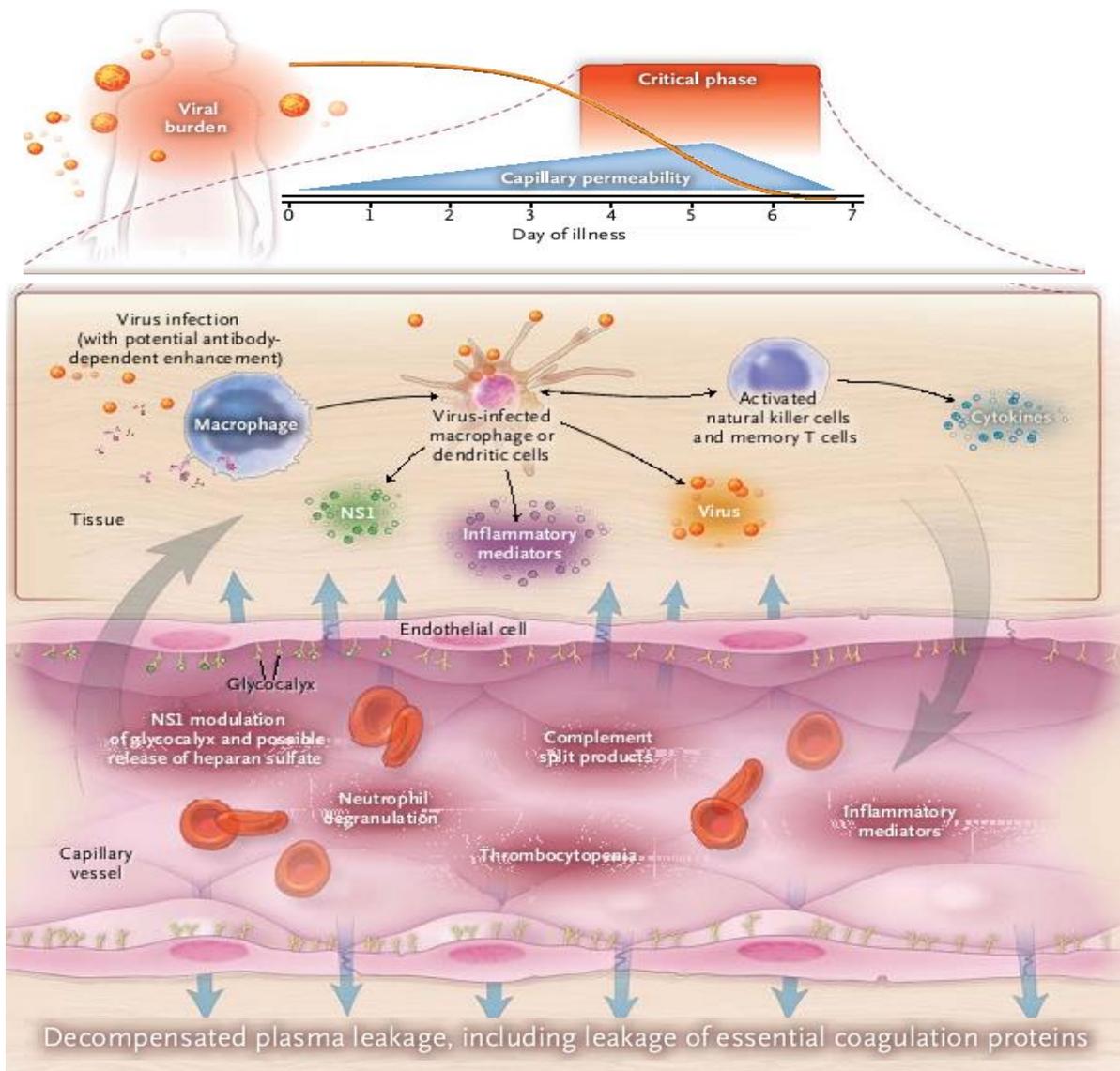


Figura 8. Inmunopatogénesis del dengue severo. En una infección secundaria la sobreactivación de células, secreción de citocinas y mediadores inflamatorios así como un aumento en la viremia y la permeabilidad vascular son características de un cuadro de dengue severo y pueden provocar la muerte. (Simmons P. *et al* 2012)

cular con escape de fluidos intravasculares a espacios intersticiales, además de que en casos más graves y complicados de la enfermedad pueden existir coagulopatías derivadas de la trombocitopenia (**Figura 8**) [5].

Si existe una respuesta favorable por parte del paciente, inicia una fase de recuperación. Existen otras manifestaciones más graves pero infrecuentes, como la falla hepática, miocarditis y encefalopatía y tienen poca o nula asociación con fuga plasmática. El principal factor de riesgo para las

formas más severas de la enfermedad es que se trate de una infección secundaria. Se ha sugerido que la viremia en las formas severas es mayor que en la fiebre por dengue.

Las alteraciones en la permeabilidad vascular y en la coagulación se cree que surgen por una combinación de: a) un incremento en la replicación viral, b) incremento en la muerte de las células infectadas o por la acción de células citotóxicas del sistema inmune, c) activación del complemento; y si ha existido una infección previa por cualquier serotipo de dengue d) la activación de linfocitos T de memoria y finalmente e) aumento en la producción y liberación de citocinas proinflamatorias e interferones I y II por los linfocitos T y células infectadas [5].

Todos estos procesos son reflejo de lo que en inmunología se conoce como el “pecado original antigénico”, ya que la respuesta inmune potencia la infección del virus así como la severidad de los síntomas y el progreso a cuadros más severos de la infección.

La fase de recuperación inicia cuando el paciente revierte el aumento de la permeabilidad vascular a un nivel normal después de 48 a 72 horas. Se puede manifestar fatiga profunda en el paciente durante varias semanas después de la fase de recuperación.

3.- Respuesta inmune

Cuando un mosquito infectado pica y se alimenta de un individuo sano, libera en la dermis al virus el cual activa e infecta a células dendríticas inmaduras (iDC) cuyo trabajo es censar el microambiente antigénico y capturar antígenos para su procesamiento y presentación a linfocitos T. Los macrófagos y/o monocitos también se consideran blancos primarios para el virus y uno de los principales sitios de replicación viral, ya que inician la producción de interferones de tipo I y citocinas quimioattractantes que en su momento provocan la migración de neutrófilos, basófilos y células asesinas naturales (NK, *Natural Killer*) al sitio de infección.

La infección en un inicio se caracteriza por una respuesta de tipo Th1 la cual es propia de un cuadro de FD, y durante el transcurso de la infección y bajo el efecto de interleucinas como la 10, 12 y TGF- β 1 la respuesta cambia a una de tipo Th2 lo cual se relaciona con un progreso a una forma más severa de la enfermedad producida por el virus [5, 16].

Las células NK pueden eliminar a células infectadas mediante dos mecanismos, la citólisis y la citotoxicidad dependiente de anticuerpo. Independiente de su función para controlar la infección, las células NK y CD juegan un papel importante siendo el puente entre la inmunidad innata y el inicio de la adaptativa. La desregulación en la actividad de las CD y NK debido a la infección por dengue puede exacerbar la progresión de la enfermedad durante la infección.

La activación de las células de la respuesta inmune innata se da vía receptores tipo toll (TLR), aunque la participación de éstos en el proceso no es aun clara y se ha relacionado a TLR 3 en la activación de células no inmunitarias como las HepG2. Tanto los receptores tipo NOD como los RIG-I tienen la capacidad de reconocer al virus y desencadenar la activación de NF- κ B y la subsecuente producción de interferones de tipo I (α/β), los cuales juegan un papel fundamental para controlar la infección [26].

Por su parte los neutrófilos producen grandes cantidades de TNF- α y de defensinas, péptidos pequeños ricos en cisteína y que pueden controlar la infección viral a través de su interacción con la membrana viral o con receptores celulares.

Cuando las células dendríticas y macrófagos han sido activados, el siguiente paso es la activación de células de la respuesta inmune adaptativa (RIA), como son los linfocitos T y B, los cuales en su momento producirán anticuerpos específicos contra epítopos de las proteínas del virus.

E es la proteína viral contra la cual se produce la mayoría de los anticuerpos ya que ésta se encuentra en mayor cantidad en la cubierta del

virus maduro. Por otra parte la proteína prM que se encuentra en virus inmaduros juega un papel importante en la producción de anticuerpos y resulta ser a su vez un mecanismo de evasión de la respuesta inmune, ya que se producen anticuerpos contra una proteína inexistente en los virus maduros y por consecuencia los anticuerpos producidos resultan ser no neutralizantes. Los epítomos reconocidos por los anticuerpos neutralizantes reconocen a los tres dominios de la proteína E y pueden tener reacción cruzada entre los distintos serotipos [19].

Para que los anticuerpos producidos logren ser neutralizantes necesitan estar presentes a una concentración adecuada y suficiente para unirse a la mayoría de epítomos posibles y así evitar la interacción del virus con sus receptores y/o correceptores.

Después de una infección primaria por cualquier serotipo, la persona queda protegida contra una reinfección por éste, sin embargo, esta protección no es efectiva contra otros serotipos del virus si no al contrario, se ha demostrado que puede causar un aumento de la infección e inducir la progresión a un cuadro más severo de la enfermedad. Este efecto se conoce como “el pecado original antigénico” el cual se basa en que, después de una primera infección los títulos de anticuerpos contra el virus tienden a caer, pero si existe una reinfección por otro serotipo del virus, el título aumenta y se mantiene así, despertando una reacción inmunológica dañina para el huésped [9, 19].

Por otra parte, existe otro efecto denominado “potenciación dependiente de anticuerpo” (ADE por sus siglas en ingles), en donde estos mismos anticuerpos tiene reacción cruzada con otro serotipo del virus, pero en lugar de neutralizarlo inducen la infección de un rango mucho mayor de células, disparando el aumento de la viremia. Este hecho se debe a que células permisivas (y por las cuales el virus tiene tropismo preferencial, como son los macrófagos) tienen receptores FcγR, los cuales reconocen a los anticuerpos que están opsonizando al virus, facilitando así la entrada de

éstos al macrófago y aumentando el número de células infectadas por el virus. Todo este proceso es dependiente de la concentración de anticuerpos, ya que si no alcanzan la concentración necesaria para neutralizar al virus inducen el ADE (**Figura 9**) [9].

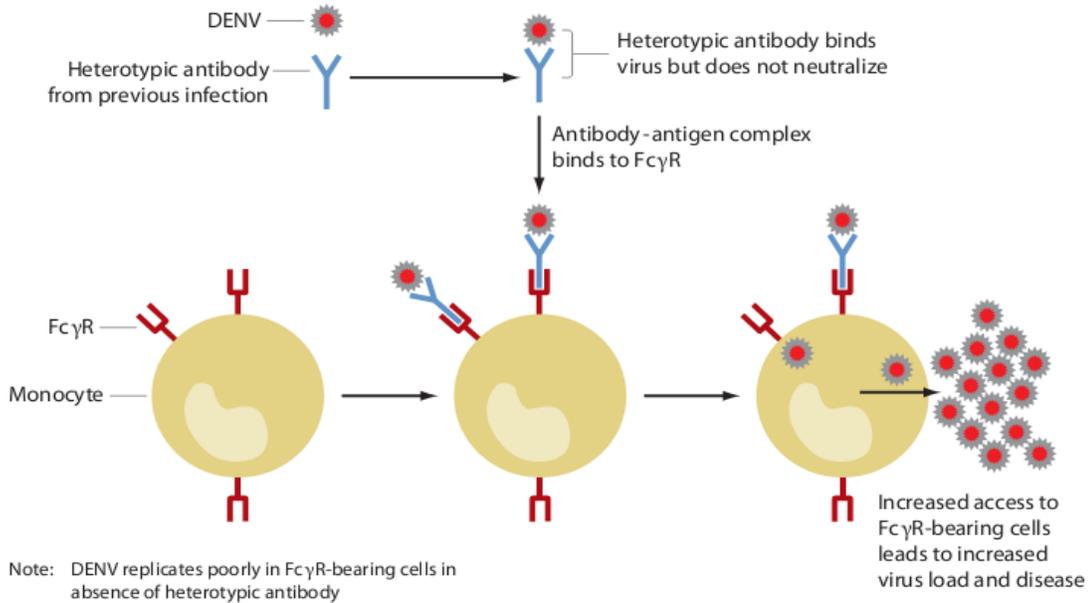


Figura 9. Potenciación dependiente de anticuerpo. El reconocimiento de virus por anticuerpos producidos contra un serotipo distinto sin alcanzar una concentración neutralizante, provoca la infección de células que normalmente no se infectan y una mayor infección de células permisivas, esto a través del reconocimiento de FcγR, lo cual está asociado a un incremento en la severidad de la enfermedad. (Tomado de Murphy *et al.* 2011.)

Existe por lo tanto un efecto directo de estos dos procesos, la progresión hacia un cuadro más severo de la enfermedad (DHF/DSS), involucrando sistemas y procesos como el complemento, que se sabe está activado en la superficie de células endoteliales lo que contribuye al proceso de fuga vascular característica del dengue severo.

Por otra parte, se produce una tormenta de citocinas inducida por células de la respuesta inmune innata y linfocitos T con reactividad cruzada, todas las cuales proliferan y contribuyen en el proceso de fuga vascular.

Dentro de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune que tiene Dengue, se encuentran la inhibición de la fosforilación de IRF3, que forma parte de la vía necesaria para la producción de INF-I, esto a través de la proteína no estructural NS2B. Por otra parte se bloquea la dimerización de las proteínas STAT 1 y 2, promoviendo la degradación de STAT 2 vía el sistema Ubiquitina proteosoma. Ambos eventos llevan al bloqueo de la producción de INF- γ [24].

4.- Defensinas

4.1 Defensinas y la respuesta inmune.

La respuesta inmune innata es la primera barrera física, química y mecánica a la que se enfrentan todos los microorganismos patógenos al intentar establecerse y colonizar un organismo. Si bien carece de una especificidad tan refinada como la RIA tiene componentes moleculares que ejercen mecanismos microbicidas efectivos y rápidos cuya diferencia y principal ventaja frente a la RIA es su expresión constitutiva y distribución en prácticamente todos los tejidos.

Podemos distribuir estos componentes en dos grupos, aquéllos que son sensores y los que tienen actividad efectora. Dentro del grupo sensor se encuentran receptores transmembranales como algunos de los TLR's y citosólicos como los receptores tipo NOD. El grupo efector cuenta con factores del complemento, enzimas proteolíticas y péptidos antimicrobianos por mencionar algunos.

Los péptidos antimicrobianos son un grupo de moléculas pequeñas conservadas durante la evolución y que podemos encontrar en organismos vertebrados, invertebrados y plantas. En el ser humano se han identificado distintas clases de éstos, entre los más importantes y estudiados están las catelicidinas y las defensinas, ambas con un amplio espectro de actividades bactericidas, antifúngicas y antivirales.

Las defensinas abarcan 3 clases de péptidos pequeños de 2 a 4 kDa cuya principal función es la defensa del organismo por lo cual han sido llamados antibióticos endógenos. La familia de las defensinas humanas está compuesta por tres miembros: α , β y θ defensinas.

El primer miembro de las β defensinas fue identificado en 1995 en un paciente con enfermedad renal y hasta el momento se han identificado al menos 33 genes que corresponden a este miembro de la familia. Las β defensinas se expresan preferencialmente en tejidos epiteliales como testículos, tracto gastrointestinal, respiratorio y urinario. Además de llevar a cabo actividad antimicrobiana juegan un papel importante en otros procesos relacionados con la respuesta inmune por ejemplo la actividad quimioattractante, participan en procesos de diferenciación celular lo cual fue observado en procesos de maduración de queratinocitos y en la producción de citocinas pro-inflamatorias auxiliares en la remodelación de tejido en cartílagos con cuadros de osteoartritis.

En cuanto a las α defensinas se han identificado 5 genes en el humano que dan lugar a 6 proteínas las cuales son las principales proteínas de los gránulos azurófilos de neutrófilos, su expresión es constitutiva y tienen actividad antimicrobiana frente a bacterias tanto intracelulares como extracelulares así como frente a virus envueltos como el virus del síndrome de la inmunodeficiencia humana (HIV) y el virus herpes simplex (HSV).

4.2 Theta Defensinas

En 1999 Sestled y cols., buscando péptidos antimicrobianos en leucocitos del macaco rhesus (*Macaca mulata*) descubrieron un péptido pequeño que se expresaba de manera preferencial en macrófagos y neutrófilos, las principales células fagocíticas del sistema inmune innato. Este péptido fue retado experimentalmente frente a bacterias Gram + (*S. aureus*), Gram – (*E. coli*), hongos y levaduras (*C. neoformans* y *C. albicans*) dando como resultado una disminución del 99% en la viabilidad microbiana. Ya que

estructuralmente la defensina tiene semejanza con la letra Zeta del alfabeto griego se le asignó el nombre de Theta (θ) defensina y debido a que pertenece al macaco Rhesus se le designó como Rhesus Theta Defensina 1 o RTD-1 [27].

A partir de ese momento se inició el estudio del péptido en busca de actividad antiviral y los posibles mecanismos de acción. Actualmente se ha descrito la conformación estructural de la defensina la cual está formada por 18 aminoácidos que adquieren una estructura cíclica en forma β plegada y entrecruzada por tres puentes disulfuro. El péptido está formado por dos segmentos independientes de 9 aminoácidos que aparentemente están ligados en un mecanismo cabeza-cola (*head-to-tail*) por una ruta biosintética desconocida pero que probablemente (en el caso de los humanos) involucre la interacción con SDF2L1, componente de los complejos de chaperonas del retículo endoplasmático [28].

4.3 Estructura de los pseudogenes de la θ Defensina.

Un estudio filogenético posterior, realizado por Nguyen y col. en 2003 basándose en la secuencia de la θ -defensina del macaco Rhesus (RTD-1) analizó y encontró seis pseudogenes en el genoma humano (DEFT1, 2, 3, 4, 5, 6), cinco de ellos en la región subtelomérica del cromosoma 8 (8p23) en un "cluster" en donde se encuentran genes para las alfa y beta defensinas y un gen en el cromosoma uno (1q41). Los pseudogenes humanos contienen una mutación puntual en la región correspondiente a la secuencia señal que da lugar al codón de paro TAG (UAG en el mensajero), este cambio se insertó hace aproximadamente 7.5 - 10 millones de años al separarse el linaje de los orangutanes y los homínidos [29, 30]. La mutación permite en células humanas la transcripción del psudogen más no su traducción, a pesar de esto, la secuencia nucleotídica del mRNA de la θ defensina (pseudogen DEFT1) guarda una homología del 88.9% con la del macaco rhesus [31].

Los pseudogenes de la θ defensina humana están compuestos por 3 exones y dos intrones que en total miden alrededor de 2544 pb y su transcripción genera un transcrito de aproximadamente 496 nt y al traducirse un producto protéico de aproximadamente 94 aminoácidos (FIG 1). El transcripto conforma un pre-propéptido que bajo procesamiento postraduccional da origen a un nonapéptido con la secuencia RCICGRGIC (excepto DEFT4 cuya secuencia es RCICGRRIC). El nonapéptido, a través de una ruta biosintética aún no reportada, se une a otro y da lugar a un dímero octadecapeptídico cíclico (que puede ser homo y heterodímero) siendo éste el único conocido de naturaleza cíclica en humanos. La expresión transcripcional de los pseudogenes se ha comprobado en músculo esquelético, testículos, bazo, timo y más prominentemente en médula ósea [29].

4.4 Características estructurales.

La característica estructural más llamativa de las θ defensinas es su naturaleza cíclica, el anillo octadecapeptídico está entrelazado y estabilizado por tres puentes disulfuro formados entre los residuos de cisteína que forman parte del péptido (residuos cis 3-16, cis 5-14 y Cis 7-12 que corresponden al pseudogen DEFT1). La carga neta de RC-1 es catiónica (4+), lo cual se cree puede participar en la unión y disrupción de la membrana plasmática de bacterias. Si bien este hecho se ha descrito en α y β defensinas aún no se ha comprobado *in vivo* con las θ defensinas ni con las retrociclina.

La retrociclina 2 (RC-2) es el único análogo de la θ defensina humana que se ha caracterizado estructuralmente. En 2007 se demostró que RC-2 podía oligomerizarse en una forma dependiente de la concentración del medio en que se encontrara y que además se “inserta” en bicapas lipídicas para formar una especie de barril transmembranal. Tang en 2006, a través de NMR observó que esta misma retrociclina podía adquirir distintas conformaciones espaciales dependiendo del grosor de la membrana en la que se inserta/encuentra, pasando de ser transmembranal en membranas

gruesas de DLPC (*1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) a una orientación plana en membranas delgadas de POPC (*1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine*) [32].

Otra característica sobresaliente de las retrociclinas son los puentes disulfuro formados dentro de la estructura β plegada. Hasta ahora existen datos contradictorios sobre el impacto de estos puentes sobre la función y estructura del péptido, algunos ensayos indican que únicamente son importante para la formación y estabilidad de la estructura cíclica y que no tienen impacto en la actividad antimicrobiana [33], mientras otros demuestran que la reducción de estos puentes disminuye la capacidad de unión del péptido a glicoproteínas y su capacidad antimicrobiana [34-36].

Las cisteínas que conforman los puentes disulfuro están a su vez involucradas en el proceso de autoasociación del péptido para formar oligómeros lo cual aumenta la capacidad de la retrociclina de unirse a glicoproteínas [37]. Esta actividad de tipo lectina fue descrita en un inicio por Cole y cols., en 2002 en ensayos de infección con cepas de HIV con tropismo T y M [5.] En 2003 se describió que las retrociclinas RC-100 y RC-101 se unían con alta afinidad a gp120 (Kd, 35.4 nM) , CD4 (Kd, 31 nM), galatosilceramida (Kd, 24.1 nM) y a la fetuina (Kd, 41.6 nM) y que este mecanismo mediaba la protección de las células a la infección por HIV [34].

4.5 Actividad antiviral

Los ensayos con bacterias demostraron que las retrociclinas tenían una importante actividad antitoxigénica, antibacterial y bacteriostática. La siguiente cuestión fue analizar la actividad antiviral. Actualmente, se sabe que las α defensinas tienen actividad antiviral contra HIV y HSV por lo cual se pensó que la θ defensina sintética (RC-100) y sus análogos pudiesen tener esta misma capacidad antiviral.

La primera descripción de actividad antiviral se realizó con los péptidos RC-100 y RC-101 los cuales inhibieron la formación del DNA

proviral de HIV impidiendo así la infección de células por cepas del virus con tropismo M y T [31]. Independientemente de este mecanismo de inhibición contra HIV se sabe que RC-1 y RC-2 (secuencias correspondientes a los genes DEFT-1, homodímero y DEFT-4 heterodímero) están involucradas en impedir pasos tempranos de la entrada viral habiendo una relación entre la afinidad y la capacidad de unión de RC-1/RC-2 a gp120 u otras glicoproteínas virales y la actividad antiviral frente a cepas R5 y X4 de HIV [38, 39]. El grado de glicosilación de gp120 impacta directamente en la afinidad de RC-1 por ella[40]. Tiempo más tarde Gallo y cols., 2006 publicaron un estudio en donde se describió la unión de alta afinidad de RC-1 al ectodominio de gp41 y de manera específica al heptarepetido C terminal de gp41 impidiendo la formación de 6-helix bundle describiendo así un mecanismo efector nuevo para una molécula de la respuesta inmune innata. Se cree que esta unión esta mediada por fuerzas electrostáticas que involucran los residuos de isoleucina y cisteína de RC-100 [41]. Finalmente, en 2009 salió a la luz un estudio en donde se analizó la capacidad de las células humanas para producir la θ defensina y llevar a cabo las modificaciones postraduccionales necesarias para la síntesis y ciclado del péptido activo. En ese estudio se observó que había una disminución en la infección de células TZM-bl tratadas con aminoglucósidos en comparación con células no tratadas, lo cual llevó a concluir que probablemente en esta línea celular, derivada de células HeLa, se podría producir de manera endógena el mensajero de la θ defensina y que suprimiendo el codón de paro con el uso de tobramicina podía obtenerse la traducción completa del mensajero y finalmente el péptido maduro [42].

HSV-2 es otro virus envuelto en el cual se ha observado inhibición por RC-2 en distintos pasos dentro de la infección viral. El primero es la unión de la retrociclina a la proteína viral gB2 que participa en procesos de unión y penetración del virus en células de epitelio cervical. El segundo es la disminución del tráfico intracelular citosol-núcleo de la proteína VP16 y por consiguiente una reducción en la expresión de ICP4 (relacionada con

estadios latentes del virus). De esta manera RC-2 puede inhibir hasta 99% de la infección por HSV-2 [43]. Un efecto similar fue observado en un modelo de queratitis ocular en ratón provocado por HSV-1 en donde se determinó que la misma retrociclina (RC-2) inhibe la entrada viral; cabe resaltar que los experimentos se realizaron en condiciones de pre y post infección, resultando efectiva RC-2 solo en procesos pre-infecciosos lo cual llevó a concluir a los autores que RC-2 podría ser utilizada como un agente profiláctico más que un agente terapéutico [44].

La actividad antiviral de RC-2 pareciera recaer en su alta capacidad de unión a glicoproteínas, lo anterior al igual que en HIV-1 y HSV-2 fue demostrado frente a influenza A en donde la retrociclina además de bloquear la fusión de membranas mediada por hemaglutinina impide que ésta adquiera una conformación fusogénica y crea una red de glicoproteínas de superficie celular ligadas e inmovilizadas lo cual inhibe la infección viral[35]. De este estudio se deduce que las retrociclinas no solo tienen un comportamiento tipo lectina sino que además son polivalentes. La RC-2 también es efectiva frente al virus de influenza H5N1, un serotipo altamente patógeno, ya que disminuyó en un 90% la infección de células Vero que contienen un plásmido con la secuencia de la RC-2 [45].

Dengue es el principal arbovirus transmitido por vector y aproximadamente el 50% de la población mundial está en riesgo de contraer la enfermedad. Recientemente se describió que RC-1 tiene la capacidad de inhibir la serin proteasa NS2B-NS3B del virus y que la presencia de RC-1 disminuía significativamente la replicación viral en células Vero infectadas con el serotipo 2 del virus [46].

4.6 Citotoxicidad de las retrociclinas/ theta Defensinas

Existen evidencias de la inocuidad de las retrociclinas tanto *in vitro*, al ser aplicadas de manera tópica en construcciones de tejido cérvico-vaginales humano, como *in vivo*, en vaginas de macacos Rhesus. La inocuidad de

éstas se basa principalmente en que no inducen la producción significativa de marcadores inflamatorios como IL-6 e IL-8, TNF- α , IL-1 β e INF-1, además de que ambos tratamientos no alteraron la viabilidad del tejido o línea celular [47]. Se cree que esta notable carencia de citotoxicidad se debe a que las retrociclinas usadas en los ensayos son análogos de un péptido “nativo” propio del ser humano. Otra ventaja que presentan los péptidos es su fácil permanencia en tejido, recuperando en el caso de RC-101, hasta el 60% de la cantidad aplicada [48, 49]. La homeostasis vaginal está regida en parte por la presencia de bacterias comensales y células de la respuesta inmune que ayudan a mantener condiciones libres de patógenos. RC-101 además de ser bien tolerada por tejidos y líneas celulares cérvico-vaginales es tolerada por la flora comensal e inhibe aparentemente de manera específica a bacterias patógenas [50] sin tener efectos adversos sobre la actividad de células NK o la proliferación de T CD4 o T CD8 y sin verse afectada por fluidos vaginales o seminales [48]. De esta manera RC-101 posee varias de las cualidades ideales de un microbicida.

5. JUSTIFICACION

La búsqueda de nuevos antivirales que permitan disminuir la incidencia y/o mortalidad de la infección por DENV con el mínimo de efectos adversos, de fácil acceso y bajo costo se plantea como un reto farmacológico y de investigación. Hasta el momento, se han descrito diversas moléculas con potencial antiviral de origen sintético, que no cumplen con las características antes mencionadas. La θ defensina y sus análogos, las retrociclina, son péptidos naturales que han tienen un efecto antiviral en las infección por diversos virus envueltos por lo cual, resulta interesante probar su utilidad sobre DENV.

6. HIPÓTESIS

La θ defensina inhibe la infección por el virus dengue sobre la línea celular hepática Huh-7.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo General:

Analizar el posible efecto antiviral de las θ defensinas sobre la infección por virus dengue en la línea celular hepática Huh-7

7.2 Objetivos Particulares:

- ✓ Inducir la expresión del péptido correspondiente a la θ defensina en cultivos celulares a través del tratamiento de éstos con aminoglucósidos.
- ✓ Producir anticuerpos policlonales contra el péptido de la θ defensina (retrociclina) en ratones CD1.
- ✓ Analizar el efecto de la Θ defensina sobre la infección por virus dengue en células Huh-7.

8. MATERIALES Y METODOS

8.1 Cultivo celular y cepa viral.

La línea celular hepática Huh-7 (ATCC PTA8561) se cultivó en medio esencial DMEM suplementado con 8% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de glutamina, penicilina (5x10⁴U/ml), - estreptomycin (50µg/ml) y fungizona a 37°C y 5% de CO₂. La propagación del DENV serotipo 4 cepa h241 fue realizada en cerebros de ratones lactantes y el título de las preparaciones virales fue determinado por ensayo de plaqueo en células BHK-21 (Mosso *et al.*, 2008).

8.2 Ensayos de plaqueo en células BHK-21 (Baby Hamster Kidney).

Los ensayos de plaqueo viral permiten determinar la cantidad de unidades formadoras de placas o título viral de extractos de cerebro, de sobrenadantes celulares y de virus intracelulares. Para este ensayo, las células BHK fueron sembradas en placas de 24 pozos con medio MEM suplementado con 7% de SFB, penicilina (5x10⁴ U/ml), estreptomycin (50 µg/ml) y se incubaron a 37°C más 5 % de CO₂ en atmosfera húmeda. Cuando el cultivo alcanzó una confluencia de entre el 80 y 90% fueron infectadas con diluciones seriadas de extracto de cerebro, sobrenadantes celulares o extractos celulares según corresponda, durante una hora en condiciones normales de cultivo. Las diluciones empleadas son de base diez, partiendo de 10⁻¹ a 10⁻⁹. Pasada la hora de infección se procedió a agregarle carboximetilcelulosa al 0.8% adicionada con medio MEM suplementado con 5% de SFB. El cultivo infectado se incubó durante 5 días en condiciones normales de cultivo, transcurrido este tiempo se decantó el medio y la monocapa celular se tiñó con el colorante vital Naftol Blue Black. La estimación del título viral se llevó a cabo con ayuda de la siguiente formula:

$$\frac{\text{Promedio de placas a la dilucion correspondiente} \times 1000}{200} = \text{Título viral (PFU)}$$

8.3 Ensayos de viabilidad celular a diferentes concentraciones de aminoglucósidos.

Los ensayos de viabilidad para las diferentes concentraciones de aminoglucósidos (Gentamicina, Amikacina y Tobramicina) se realizaron con el kit cell titer 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Se probaron las concentraciones de 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml y 400µg/ml de Genatmicina, Amikacina y Tobramicina en el cultivo de células Huh-7 por 24 y 48 horas. Transcurrido este tiempo, se realizó el ensayo que consiste en determinar el número de células viables en ensayos de proliferación o citotoxicidad celular. El fundamento de la prueba se encuentra en la reducción de la sal inerte de tetrazolio (*[3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio]*) el cual es bio-reducido por las células a formazán, un producto coloreado soluble en el medio de cultivo. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pozos en donde se retiró el medio de cultivo celular y se agregó una mezcla que contenía 50 µl del medio correspondiente a la línea celular y 10 µl de la solución cell titer 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay dentro de cada pozo. Las células con la mezcla se incubaron durante una hora a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. La absorbancia se determinó a 490 nm en el lector de placas biotec (Elx808 Absorbance Multiplate Reader) siendo la absorbancia registrada proporcional al número de células viables.

8.4 Determinación del antígeno viral NS1.

La prueba se determinó con el kit comercial plateliaMT Dengue NS1 Ag (IBIORAD) el cual consiste en un ensayo de ELISA de tipo Sandwich para la detección cualitativa y semicuantitativa del antígeno viral NS1 el cual utiliza anticuerpos monoclonales de ratón para su detección y revelado. La determinación de NS1 se llevó a cabo según recomendaciones del fabricante registrándose la absorbancia a 459 nm en el lector de placas Biotek ELx808 Absorbance Microplate Reader.

8.5 Electroforesis de sobrenadantes en geles SDS-PAGE

Los sobrenadantes obtenidos a las 24 h después del tratamiento con aminoglucósidos fueron centrifugados 10 min a 10 000 rpm a 4 °C. Fueron mezclados con buffer de carga de Laemmli y sometidos a electroforesis en geles desnaturalizantes SDS-PAGE en gradiente discontinuo (5%, 7%, 10%, 13%, 16% y 20%) durante aproximadamente 1.5 h. Transcurrido el tiempo indicado se procedió a la tinción con Azul de Comassie y posteriormente a desteñirse con la solución desteñidora.

8.6 Ensayos de Western Blot

Una vez terminada la electroforesis ya sea de sobrenadantes o proteínas celulares totales como se indica arriba, se omite el proceso de teñido/desteñido y se procede a transferir las proteínas a membranas de nitrocelulosa mediante una cámara de transferencia semihúmeda (Bio Rad Power Pac 1000) a 17 Volts durante 45 min para el caso de sobrenadantes y en cámara húmeda a 120 Volts durante 1.5 h para proteínas totales. La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con una mezcla de PBS-Tritón x-100 0.5% mas 10% de Leche descremada durante 45 min a 37°C en agitación constante. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con anticuerpos policlonales anti- θ defensina, anti-NS5, monoclonales anti-actina o anti- E según corresponda toda la noche a 4 °C en agitación constante. Transcurrido el tiempo, las membranas se lavaron con PBS 1X-Tritón X-100 0.5% varias veces para después incubar las membranas con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Peroxidasa (HRP) durante 2 h a temperatura ambiente. Para revelar las membranas a través de la actividad peroxidasa se usó el kit West-Femto de Pierce.

8.7 Ensayos de inhibición de la infección por DENV 4 por aminoglucósidos.

Se utilizaron dos diferentes esquemas de tratamiento e infección:

1.- Células Huh-7 con una confluencia aproximada del 50% fueron tratadas durante 24 h con 200 µg/ml de Gentamicina, Amikacina o Tobramicina. Posteriormente, el virus se adicionó al sobrenadante de células tratadas con los aminoglucósidos y se incubó por 1 h a 37 °C; con éste sobrenadante con virus se infectaron las células a una MOI (Multiplicidad de infección) de 3 por 1 h más a 37 °C. Transcurrida la hora, se adicionó Glicina ácida (pH 3) al medio y la monocapa se lavó tres veces con medio Hank's y se le agregó medio completo adicionado con 200 µg/ml del aminoglucósido correspondiente durante 24 h.

2.- El cultivo de células Huh-7 a una confluencia del aproximadamente el 70% fue infectado con DENV 4 a una MOI de 3 durante 1 h a 37 °C y en condiciones generales de cultivo. Después de este tiempo, se procedió a retirar el inóculo utilizando glicina ácida (pH 3) y se lavó tres veces con medio Hank's. Las células fueron incubadas con medio completo más 200 µg/ml del aminoglucósido correspondiente durante 24 h.

El sobrenadante celular fue recuperado y almacenado en alícuotas de 60 µL para posteriores ensayos.

8.8 Ensayos de inhibición de la infección con el péptido sintético RC-1 (Bachem) en células Huh-7.

El péptido RC-1, análogo sintético de la theta defensina humana fue adquirido en Bachem, disuelto en agua MiliQ a una concentración final de 1µg/ml. Se procedió a infectar monocapas de células Huh-7 con virus DENV 4 a MOI de 3 en presencia de concentraciones de 10, 50 y 100 µg/ml del péptido. Anterior a la infección el inóculo viral fue incubado con la cantidad correspondiente de péptido durante 1 h a 37 °C para posteriormente

proceder a la infección de las monocapas. Finalmente, el inóculo fue retirado con la adición de glicina ácida (pH 3) y tres lavados con medio Hank's y se agregó medio completo a las monocapas. Los sobrenadantes fueron recuperados 24 h después para ensayos posteriores.

8.9 Ensayos de Inmunofluorescencia.

Se utilizaron tres esquemas distintos para la tinción celular. En el primero de ellos, las células Huh-7 se crecieron sobre laminillas y se utilizaron al alcanzar una confluencia aproximada del 50%, y se trataron durante 24 h con 200 µg/ml de Gentamicina, Amikacina y 100 µg/ml Tobramicina. Para el segundo y tercer esquema se siguió el proceso de infección señalado para los ensayos de inhibición de la infección por DENV 4 por aminoglucósidos. Posteriormente, las células fueron teñidas fijadas con p-formaldehído (PFA) al 1% 20 min a TA y se permeabilizaron con acetona fría durante 5 min con posteriores lavados con PBS 1X. El bloqueo de las preparaciones se llevó a cabo con solución de bloqueo por 45 min a 37 °C. Las monocapas fueron lavadas tres veces con PBS 1X y teñidas con un anticuerpo primario policlonal anti-θ-defensina o monoclonal anti- E según corresponda toda la noche a 4 °C. Transcurrido este tiempo se lavaron con PBS 1X y fueron teñidas con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 para ambos anticuerpos primarios en distintas preparaciones por 2 h a TA. Las preparaciones se montaron con ayuda de VECTASHIELD Mounting Medium con DAPI (Vector Laboratories) y se almacenaron a 4 °C hasta su revisión en el microscopio.

8.10 Inmunización de ratones con péptidos sintéticos.

Péptido lineal. Para la obtención de anticuerpos policlonales anti-θ defensina se utilizaron dos ratones Balb/c de tres semanas de edad a los cuales se les inocularon 25 µg/ml de péptido, que corresponde a la información contenida en el pseudogen DEFT1 y el mensajero de la θ defensina humana o Retrociclina 1 (RC-1). Se llevaron a cabo tres inoculaciones con intervalos

de una semana entre ellas. Se obtuvieron aproximadamente 200 µl de sangre de cada ratón antes del proceso de inoculación para ser utilizado como suero “pre-inmune”. Debido a la poca antigenicidad del péptido se decidió utilizar como acarreador al adyuvante Titer Max® Gold en proporciones 1:1.

Péptido circular. Se utilizó un esquema similar al antes mencionado para el péptido lineal. La diferencia entre ambos radicó en los acarreadores utilizados, para la primera inoculación se utilizó Titer Max Gold (SIGMA), para la segunda el adyuvante de Freund completo y finalmente en la última inoculación se utilizó Adyuvante de Freund incompleto. Esto para potenciar la capacidad antigénica del péptido mediante el acarreador.

El suero inmune obtenido de ambos procesos se utilizó para los ensayos de inmunofluorescencia (IF), western blot (WB) y dot blot tanto para la proteína cíclica como la lineal. El suero inmune con un título para IF 1:10 y WB 1:200.

9. RESULTADOS

9.1 Tratamiento de células Huh-7 con Aminoglucósidos.

Está ampliamente descrito que una de las formas en las que se puede lograr la síntesis de la θ defensina en células humanas es mediante el tratamiento con aminoglucósidos, los cuales debido a que reducen la fidelidad del ribosoma durante la traducción, permiten que la célula exprese proteínas con codones de paro prematuro, como el de la defensina. Por tanto, las células se trataron con tres aminoglucósidos, dos de ellos, Gentamicina y Tobramicina, reportados en distintos artículos en donde se observa su capacidad de alterar la fidelidad ribosomal y Amikacina que pertenece a la misma familia de aminoglucósidos con una estructura similar a los anteriores. Inicialmente, las células Huh-7 se trataron con concentraciones de 10, 50 y 100 μg de cada antibiótico durante 24 h y posteriormente las proteínas presentes en los sobrenadantes de cada condición se separaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE en gradiente, utilizando como control, sobrenadante de células no tratadas. Se decidió utilizar sobrenadante ya que la literatura reporta la secreción de este péptido al medio como ocurre con las α y β defensinas. Una vez teñido el gel, se comparó el patrón de proteínas entre el control y los distintos tratamientos observándose la presencia de una banda menor a 10 kDa solo en el sobrenadante de aquellas células tratadas con Gentamicina. La abundancia de ésta banda fue concentración dependiente en relación al fármaco (Figura 10).

9.2 Ensayos de viabilidad de células Huh-7 a diferentes concentraciones de Aminoglucósidos.

Con el fin de confirmar que las concentraciones usadas para los ensayos anteriores no estuvieran afectando la viabilidad celular y que esa fuera la causa de la aparición de nuevas bandas en la electroforesis, se realizaron pruebas de viabilidad ante los tres Aminoglucósidos (**Figura 11**). Las tres

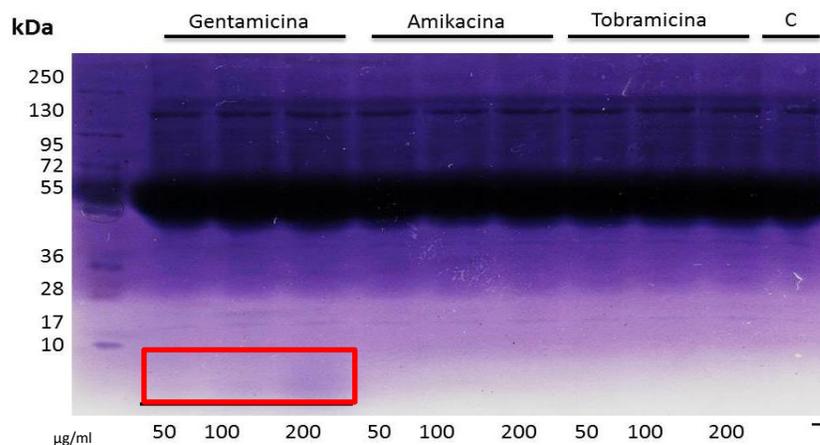


Fig 10. Electroforesis en SDS-PAGE de sobrenadantes de células Huh-7 tratadas con distintas concentraciones de Gentamicina, Amikacina y Tobramicina durante 24 h. Las proteínas presentes en los sobrenadantes de células Huh-7 tratadas por 24 hrs con distintas concentraciones de Gentamicina, Amikacina y Tobramicina, se separaron en geles SDS-PAGE en gradiente y posteriormente se tiñeron con Azul de Coomassie. La migración de los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda del gel. La aparición dependiente de concentración de una banda menor a 10 kDa se observa en las células tratadas con Gentamicina.

concentraciones de los tres Aminoglucósidos mantuvieron la viabilidad celular a niveles comparables con las células sin tratamiento, sugiriendo que la banda observada con Gentamicina, posiblemente correspondía a una proteína inducida por el tratamiento con éste aminoglucósido. Por lo tanto, se decidió continuar el trabajo con Gentamicina y aumentar la cantidad de antibiótico con el fin de aumentar la cantidad de péptido secretado.

Primeramente, se realizaron ensayos de viabilidad celular a dosis de 50, 100, 200, 300 y 400 µg/ml durante 24 y 48 h sin observar cambios significativos en la viabilidad en las células Huh-7. Dado que a concentraciones mayores de 200 µg/ml, la viabilidad fue similar a la del control, fue ésta la concentración que se utilizó para todos los ensayos subsecuentes (**Figura 12**)

9.3 Ensayos de actividad antimicrobiana.

Con el fin de saber si la banda de menos de 10kDa, observada en el sobrenadante de células tratadas con Gentamicina, correspondía a la θ defensina, se realizaron ensayos que nos pudieran brindar información respecto a la identidad de la banda obtenida. Primeramente, se evaluó el

efecto de la banda sobre la viabilidad de dos cepas de *Escherichia coli*, una de ellas resistente a aminoglucósido (1336) y la otra sensible a Aminoglucósidos (*Escherichia coli* ATCC ® 25922™). Para ello, las bacterias se tomaron en la fase de crecimiento exponencial y se sembraron en agar Müller-Hilton se dejaron crecer durante 24 h. Sobre la placa de agar se colocó el fragmento del gel de SDS-PAGE conteniendo la banda menor a 10 kDa. Como controles se emplearon: un fragmento del gel sin proteínas, una proteína del mismo carril pero no relacionada y un fragmento del gel en donde se corrió medio correspondiente a cada línea celular más 200 µg/ml de Gentamicina incubada en las mismas condiciones que las células tratadas. También se añadió directo en la placa una concentración inhibitoria de Gentamicina conocida (30 µg/ml).

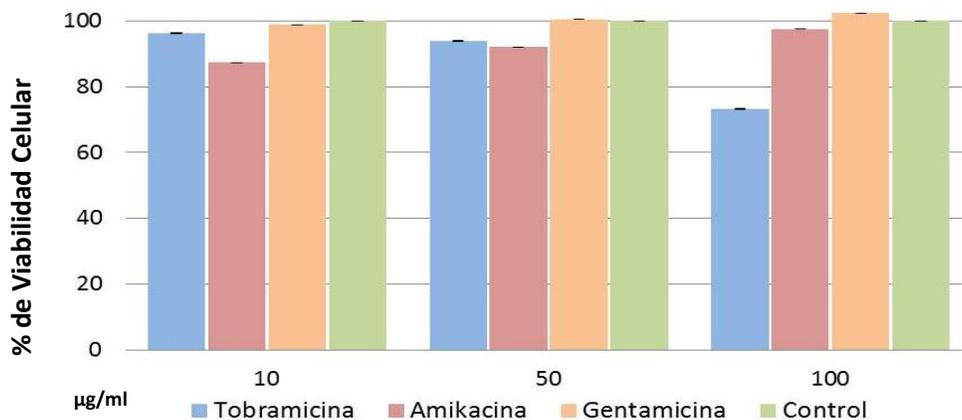


Figura 11. Ensayos de viabilidad celular a distintas concentraciones de los Aminoglucósidos: Amikacina, Tobramicina y Gentamicina. Las células Huh-7 se trataron con distintas concentraciones de Gentamicina, Amikacina y Tobramicina por 24 h y posteriormente se evaluó la viabilidad celular mediante la lectura de formazán en el medio. Los resultados fueron normalizados \pm SEM de tres experimentos independientes por realizados por duplicado.

En ambas bacterias, la banda menor a 10 kDa causó una marcada inhibición del crecimiento, no así ninguna de las bandas control incluidas, lo que sugiere fuertemente que la proteína menor a 10 kDa posee capacidad antimicrobiana al menos contra bacterias Gram (-) (Figura 13).

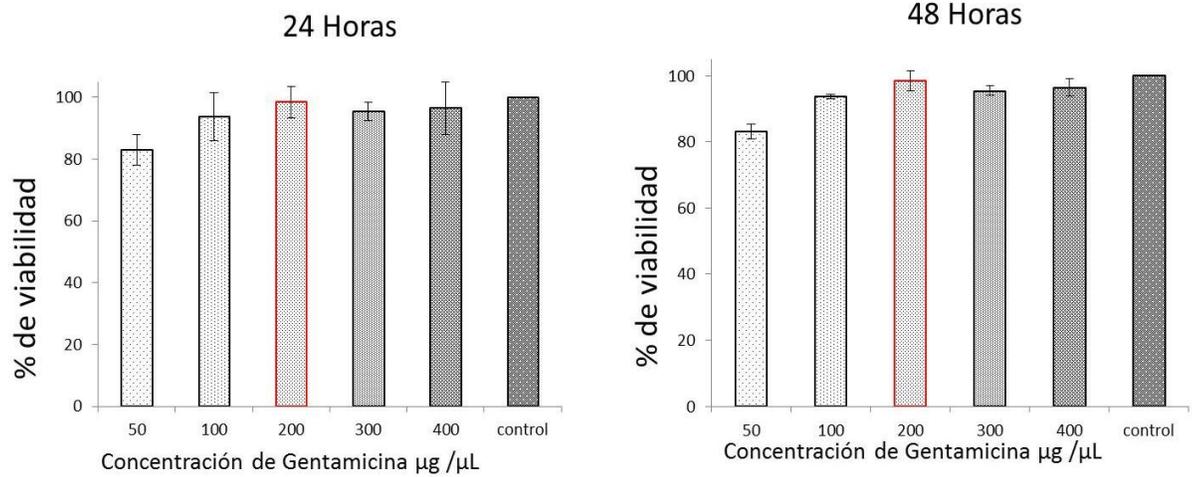


Figura 12. Ensayos de viabilidad de células Huh7 con Gentamicina. Células Huh7 fueron tratadas durante 24 y 48 hrs con Gentamicina en concentraciones de 50 a 400 µg/ml. La viabilidad celular se determinó mediante la medición de las sales de formazán formadas. Los resultados fueron normalizados \pm SD de tres experimentos independientes por duplicado. La concentración de 200 µg/ml se eligió para los experimentos posteriores.

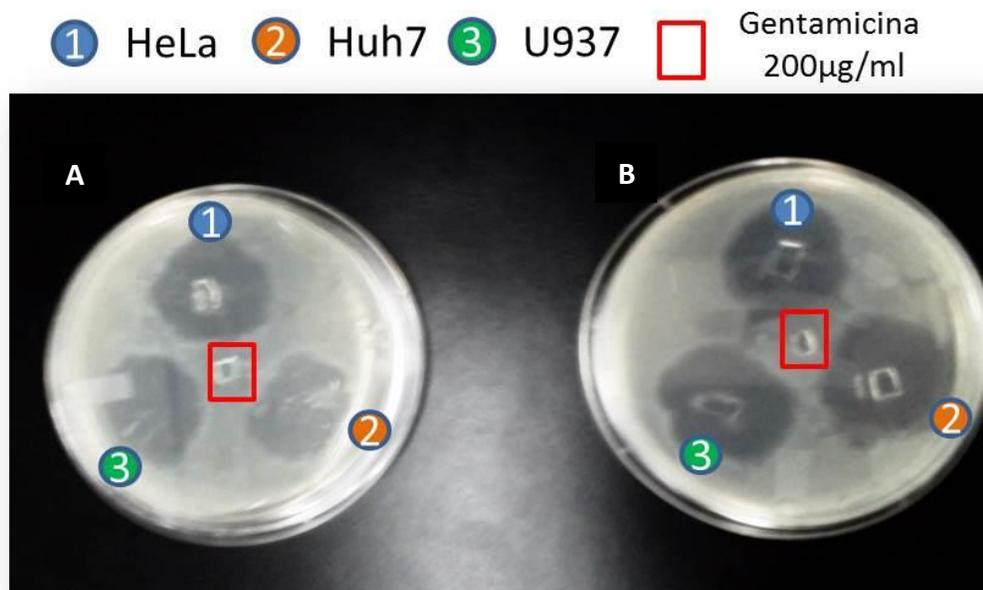


Figura 13. Ensayos de actividad antimicrobiana de la banda menor a 10 kDa. La electroforesis de los sobrenadantes de células Huh-7, HeLa y U937 diferenciadas con PMA se retados frente a Bacterias sensibles a Gentamicina (A) y resistentes a la misma (B). Frente a ambas bacterias los fragmentos de gel correspondientes a la banda menor de 10 kDa demostraron tener capacidad antimicrobiana independientemente de la línea celular que lo produjera.

9.4 Producción de anticuerpos anti- θ defensina.

Para contar con una herramienta adicional que permitiera apoyar la idea de que la banda de menos de 10 kDa corresponde a la θ defensina, se sintetizó químicamente un péptido con la secuencia lineal de la defensina la cual es: GICRCICGRGICRCICGR. Este péptido, a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$, sintetizado y donado amablemente por la Dra. Carmen Giovana Granados Ramírez del Depto. de Química del CINVESTAV, se empleó para inmunizar tres veces a dos ratones Balb/c de tres semanas con el adyuvante *Titer Max Gold*. Una vez obtenido el suero inmune, se procedió a probarlo mediante Western blot contra el péptido lineal. Como se observa en la **Figura 14**, los anticuerpos presentes en el suero inmune reconocieron al péptido lineal (Carril 1) en una dilución 1:100 mientras que el suero pre-inmune fue incapaz de reconocerlo (Carril 2) a la misma dilución.

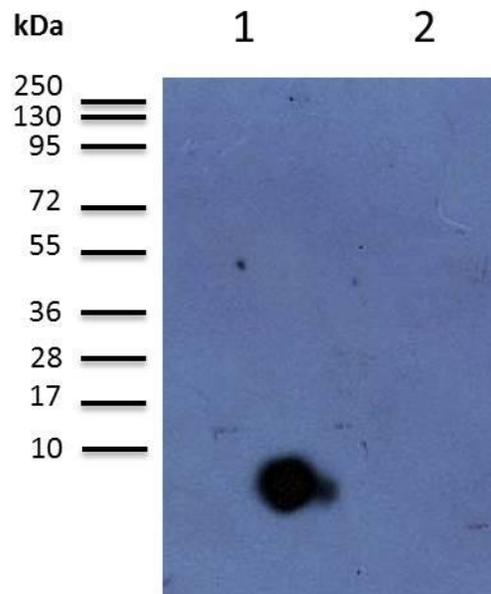


Figura 14. Reconocimiento del péptido lineal de la θ defensina por el anticuerpo policlonal anti-defensina lineal generado en ratón. El péptido lineal de la defensina, sintetizado por la Dra. Carmen Giovana Granados Ramírez del Depto de Química del CINVESTAV, fue sometido a electroforesis en SDS-PAGE, transferido a membrana de nitrocelulosa e incubado con los anticuerpos generados contra la defensina lineal (carril 1) y con los presentes en el suero preinmune (carril 2) en un ensayo de Western-blot (Dil. 1:100). El suero inmune reconoció la banda de menos de 10 kDa correspondiente al péptido lineal. La migración de los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda del gel.

Así mismo como sintetizamos el péptido lineal, sintetizamos la forma nativa o cíclica. Esta proteína al igual que la lineal, se empleó para la generación de anticuerpos siguiendo la misma estrategia que con la forma lineal. Sin embargo, el suero inmune obtenido después de tres inmunizaciones fue incapaz de reconocer a la forma lineal o cíclica en ensayos de Western-blot e inmunofluorescencia. Es posible que la misma forma cíclica del péptido redujera su capacidad inmunogenico.

9.5 Detección de la producción de la θ defensina en células Huh-7 por inmunofluorescencia.

Con el fin de saber si la defensina era producida en las células sometidas a tratamiento con Gentamicina, como lo sugerían los ensayos de electroforesis de sobrenadantes, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia empleando el anticuerpo policlonal producido en ratón contra el péptido lineal. Para ello, las células Huh-7 al 60% de confluencia, tratadas 24 h con 200 $\mu\text{g/ml}$ de Gentamicina, se fijaron, se bloquearon y se incubaron con el anticuerpo primario (suero inmune anti- θ defensina) en dilución 1:1 y 1:20 al igual que el suero pre-inmune como control.

Como puede se observa en la **figura 15**, solo en el caso de las células tratadas con Gentamicina se detectó tinción positiva con el anticuerpo anti-defensina lineal y no así con las células no tratadas o en presencia del suero preinmune; el control negativo con el segundo anticuerpo tampoco mostró reacción. Este resultado sugiere fuertemente que las células tratadas con Gentamicina producen una molécula de localización citoplasmática, reconocida por el anticuerpo anti-defensina lineal, reforzando la idea de que la Gentamicina permite la expresión de la θ defensina en las células Huh-7.

9.6 Efecto sobre la infección por Dengue del tratamiento con Gentamicina de las células Huh-7.

Con el fin de determinar si la presencia de Gentamicina y la concomitante expresión de la θ -defensina pudieran tener un efecto inhibitorio sobre la

expresión del virus dengue, las células Huh-7 fueron tratadas con Gentamicina e infectadas con Dengue. Bajo estas condiciones, se midieron tres parámetros que permitirían determinar el efecto sobre el ciclo replicativo viral. El primero, fue la cantidad de la proteína viral NS1 presente en el sobrenadante de células infectadas mediante ELISA. Se sabe que la síntesis proteica del virus Dengue es equimolar, es decir, cada una de las proteínas virales se sintetiza en la misma cantidad; partiendo de lo anterior, la medición de NS1 refleja de lo que sucede con las demás proteínas virales dentro de la célula como consecuencia.

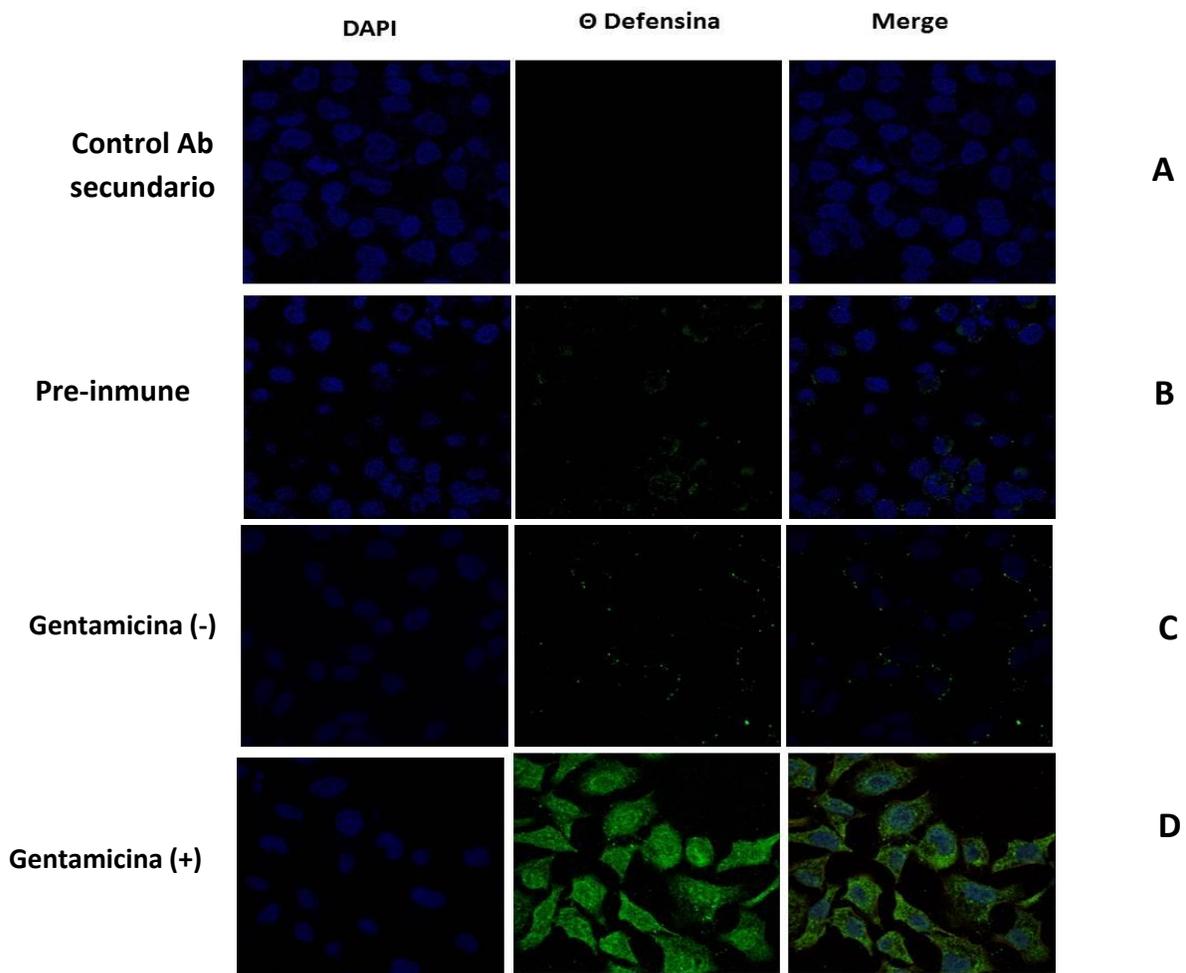


Figura 15. Inmunofluorescencia de células Huh-7 tratadas con 200µg/ml de Gentamicina por 24 h.

El panel A muestra el control de anticuerpo secundario. En el panel B se observan células tratadas y teñidas con suero pre-inmune. El panel C, células no tratadas y teñidas con suero inmune. Finalmente el panel D muestra células tratadas con Gentamicina y teñidas con el suero inmune, única condición en la cual se observa marca en el citoplasma celular, presuntamente la θ defensina.

El segundo esquema de tratamiento probado, fue el postratamiento, en donde las células Huh-7 se infectaron primero a una MOI de 3 durante 1 h y posteriormente se trataron con 200 µg/ml de Gentamicina por 24 h. En estas condiciones, el tratamiento con Gentamicina indujo una reducción del 77% en la cantidad de NS1 en el sobrenadante de células tratadas en comparación con las células infectadas y no tratadas, confirmando el resultado anterior (**Fig. 16-A**). Por otra parte el pretratamiento de las células con Amikacina y Tobramicina tuvieron un efecto similar sobre la secreción de NS1 pero en menor medida comparado con el visto por Gentamicina (**Fig 17**).

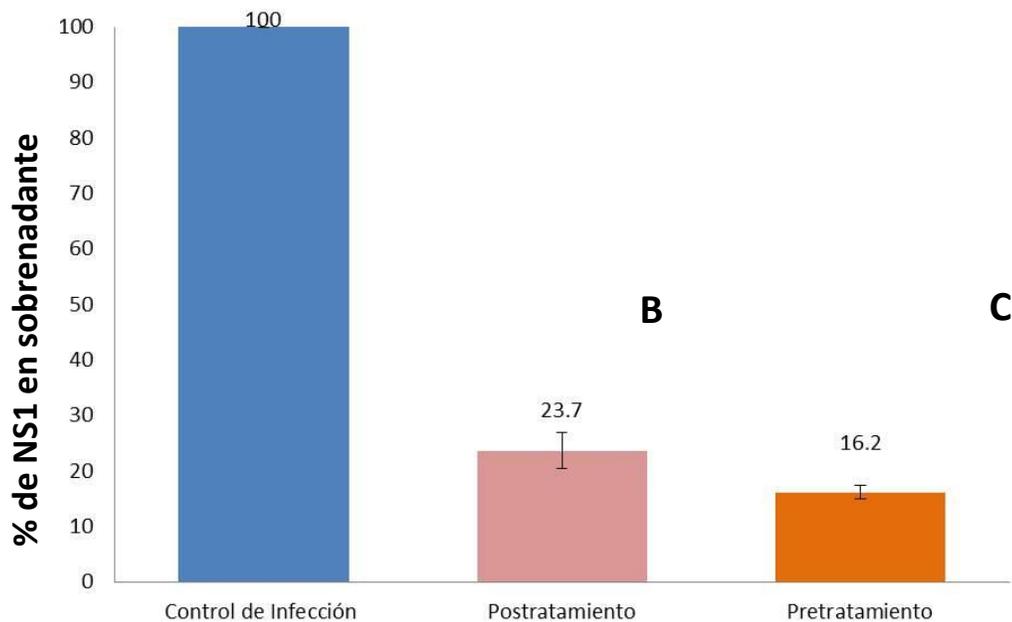


Figura 16. Efecto del tratamiento con Gentamicina en la secreción de NS1 en células Huh-7 infectadas con dengue. Las células Huh-7 tratadas por 24 hrs antes de la infección con 200 µg/ml de Gentamicina (pretratamiento) o sin tratar, se infectaron con dengue a una MOI de 3 por 1 hr a 37°C. A continuación un grupo de células no tratadas se mantuvo sin tratar con Gentamicina (control de infección) y al otro grupo se le dio el tratamiento con Gentamicina 200 µg/ml (postratamiento). Las células pretratadas, se mantuvieron bajo tratamiento con Gentamicina después de la infección. A las 24 hrs post-infección, se tomó el sobrenadante de las células y se determinó la cantidad de proteína NS1 mediante ELISA. Los resultados fueron normalizados con respecto al control ± SD de tres experimentos independientes.

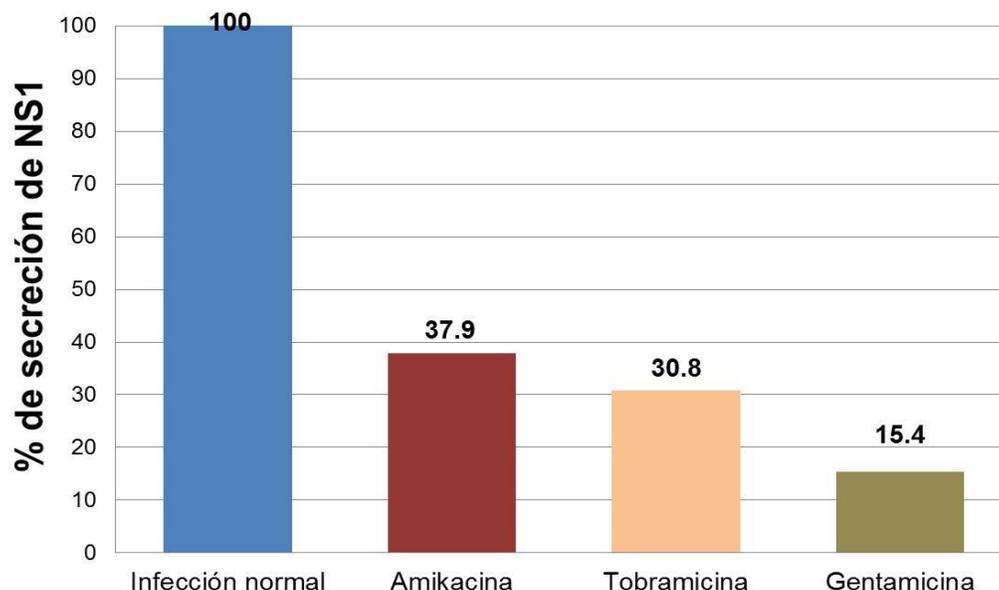


Figura 17. Efecto del tratamiento con Amikacina y Tobramicina en la secreción de NS1 en células Huh-7 infectadas con dengue. Las células Huh-7 tratadas por 24 hrs antes de la infección con 200 $\mu\text{g/ml}$ de Amikacina o 100 $\mu\text{g/ml}$ A las 24 hrs post-infección, se tomó el sobrenadante de las células y se determinó la cantidad de proteína NS1 mediante ELISA. Los resultados fueron normalizadas con respecto al control \pm SD de tres experimentos independientes. n=1.

9.7 Ensayos de plaqueo de sobrenadantes de células infectadas y tratadas.

Para confirmar el efecto inhibitorio sobre la infección inducido por el tratamiento con Gentamicina, se midió un segundo parámetro de la infección que fue la producción viral. Así, las células Huh-7 fueron tratadas e infectadas durante 24 h. A continuación, la cantidad de progenie viral presente en los sobrenadantes de las células infectadas tratadas y no tratadas se determinó mediante un ensayo de plaqueo. Los resultados obtenidos mostraron una reducción significativa de la progenie viral de 0.8 en escala logarítmica es decir 80% en las células tratadas en comparación con las células no tratadas, reforzando la idea de que la Gentamicina tiene un efecto inhibitorio del ciclo replicativo viral (**Figura 18**).

A pesar de que Amikacina y Tobramicina son ambos aminoglucósidos como Gentamicina, ninguno de ellos tuvo un efecto inhibitorio sobre la infección

viral sugiriendo que solo Gentamicina tiene un efecto inhibitorio sobre la infección por dengue (*datos no mostrados*).

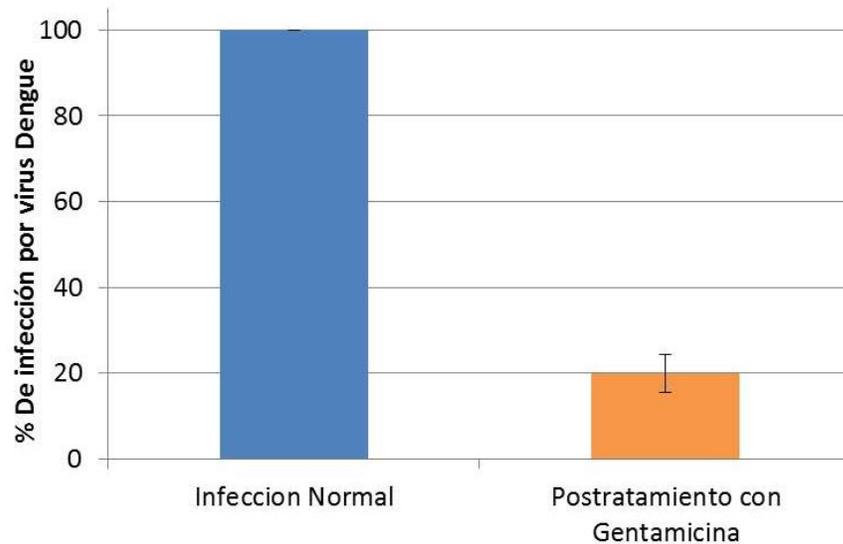


Figura 18. Efecto del tratamiento con Gentamicina en la producción viral en células Huh-7 infectadas con Dengue. Las células Huh-7 se infectaron con Dengue a una MOI de 3 por 1 h a 37 °C. A continuación un grupo de células se trató con 200 µg/ml de Gentamicina por 24 h y la cantidad de partículas virales infectivas se cuantificó en el sobrenadante de las células tratadas y no tratadas. Los resultados fueron normalizadas con respecto al control \pm SD de tres experimentos independientes.

9.8 Inmunofluorescencia de células tratadas con Gentamicina e infectadas con DENV4.

El tercer parámetro que se usó para confirmar el efecto inhibitorio de la Gentamicina sobre la infección por Dengue fue la detección de la proteína E en células infectadas mediante inmunofluorescencia. De la misma manera que en los ensayos anteriores, las células Huh-7 fueron pretratadas con Gentamicina y Amikacina a una concentración de 200 µg/ml y con tobramicina a 100µg/ml y posteriormente fueron infectadas con virus Dengue. La cantidad de células fluorescentes y la intensidad de fluorescencia en las células tratadas con Amikacina y Tobramicina fue muy similar a la observada en las células sin tratamiento, sin embargo, en las células tratadas con Gentamicina se observó una disminución en la cantidad de células fluorescentes al igual que en la intensidad de fluorescencia en ellas,

confirmando una vez más, que la Gentamicina tiene un efecto inhibitorio de la infección viral y que éste efecto es exclusivo de Gentamicina y no de los otros dos Aminoglucósidos (**Figura 19**).

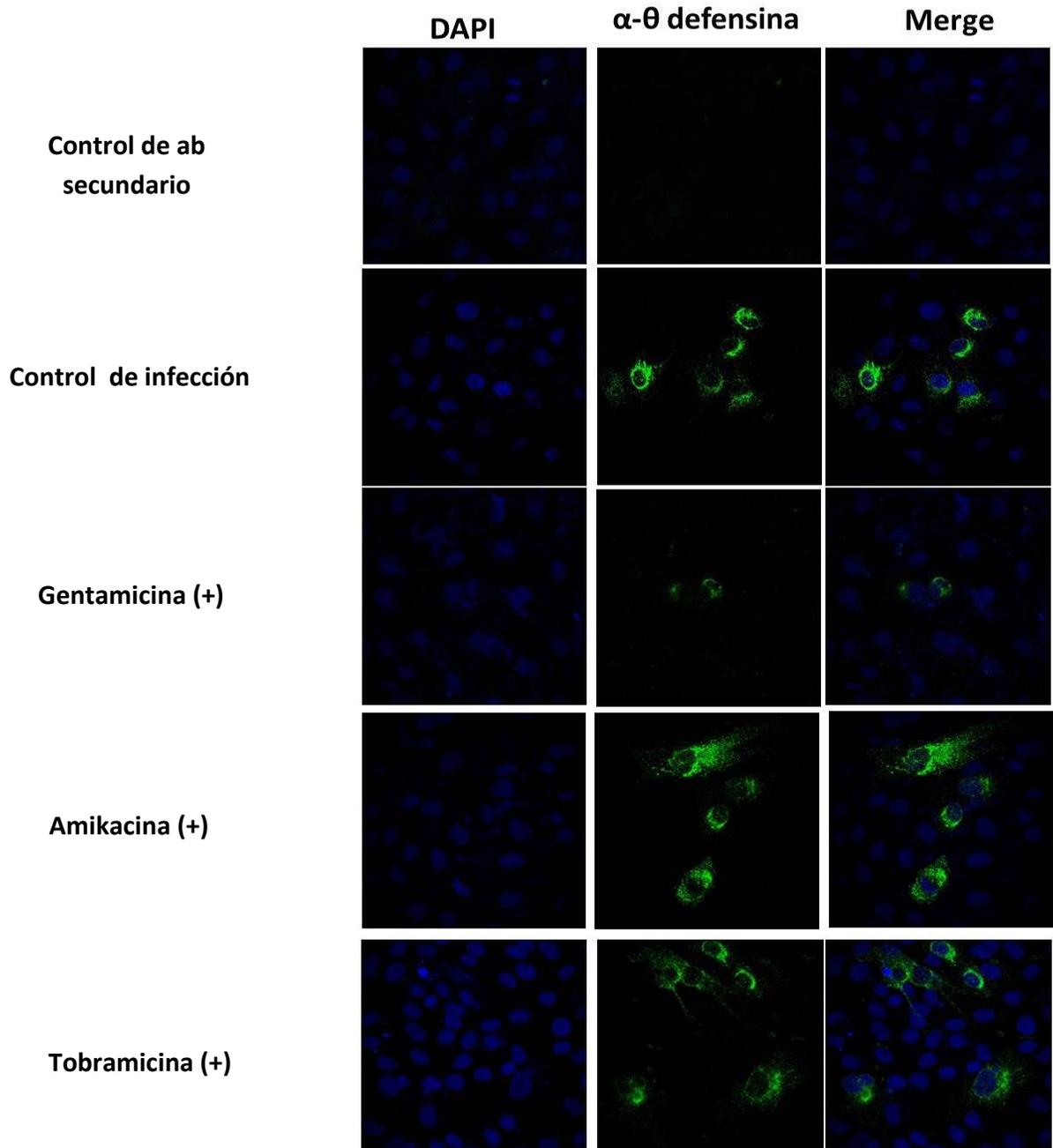


Figura 19. Efecto del tratamiento con gentamicina, amikacina y tobramicina en la infección por dengue de células Huh7. Las células Huh7 fueron tratadas por 24 h antes de la infección con 200 μ g/ml de Gentamicina y Amikacina o con 100 μ g/ml de Tobramicina o sin tratar. Se infectaron con dengue 4 a una MOI de 3 por 1 hr a 37 °C. A continuación un grupo de células no tratadas se mantuvo sin tratar y los otros grupos continuaron el tratamiento con el aminoglicósido correspondiente. A las 24 h post-infección, las células se fijaron, se bloquearon y se incubaron con el anticuerpo anti-E. Las muestras se analizaron por microscopía confocal. Los resultados mostrados constituyen imágenes representativas de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

10. DISCUSIÓN.

Dengue es la principal infección por arbovirus en el mundo y cerca de la mitad de la población está en riesgo de contraerla. Actualmente no existe un esquema farmacológico o vacuna disponible para tratar o disminuir la morbilidad y mortalidad de la enfermedad. Por tanto, el desarrollo e investigación de nuevos fármacos que permitan disminuir la incidencia de la infección o que ayuden en el tratamiento de los pacientes es relevante desde el punto de vista social, farmacológico y de investigación. Bajo esta perspectiva, en el presente trabajo se evaluó la actividad antiviral frente a virus Dengue de la θ Defensina, un péptido de bajo peso molecular el cual ejerce efecto sobre VIH tanto en pasos tempranos como tardíos de la infección. La θ Defensina es un péptido que se encuentra de manera natural en los neutrófilos del macaco rhesus, sin embargo, en el caso del humano, solo se encuentra en forma de pseudogen, encontrándose el mensajero en extractos de médula ósea, timo, bazo y testículos, sin que se exprese la proteína. Por lo tanto, en éste trabajo se plantea el uso de aminoglucósidos, para producir la θ Defensina de manera endógena en células Huh-7.

Los aminoglucósidos son una familia de antibióticos comúnmente utilizados para el tratamiento de infecciones bacterianas. El mecanismo de acción de todos los miembros de la familia se basa en la inhibición de la síntesis proteica al unirse directamente y de forma irreversible a la subunidad 30s del ribosoma bacteriano. En el caso de células eucariotas los aminoglucósidos se unen a la subunidad 18s del ribosoma de forma transitoria, causando alteración de la fidelidad de la traducción lo que permite la traducción de mensajeros que contengan codones de paro prematuros como es el caso del mensajero de la θ Defensina.

Inicialmente se utilizaron tres aminoglucósidos Gentamicina, Amikacina y Tobramicina. Específicamente se reportó por Venkataraman en 2009, que la Tobramicina inducía el salto en el codón de paro prematuro del mensajero de la θ Defensina y permitía su expresión en células HL60. Sin

embargo, en el presente trabajo, utilizando el modelo de las células Huh-7, se observó que solo Gentamicina parecía tener efecto sobre la inducción de una proteína con peso molecular menor a 10 kDa en el perfil de proteínas de los sobrenadantes de células tratadas. Una vez comprobada la no citotoxicidad de varias concentraciones de Gentamicina (50 – 400 µg/ml) se decidió utilizar para los siguientes ensayos la concentración de 200 µg/ml.

La primera estrategia se empleó para saber si la banda menor a 10 kDa pudiera corresponder a la θ Defensina endógena fue determinar su capacidad bactericida. Esta capacidad se probó tanto sobre bacterias susceptibles como resistentes a Gentamicina, observando inhibición del crecimiento sobre ambas cepas. Se ha reportado que la θ Defensina y sus análogos (Retrociclinas) tienen una potente actividad antimicrobiana tanto en bacterias Gram + como Gram - [27, 47, 51, 52]. Si bien estos resultados proporcionaron pistas sobre la identidad de la banda menor a 10 kDa se decidió utilizar un péptido sintetizado químicamente con la secuencia lineal de la θ Defensina para producir anticuerpos anti θ Defensina en ratón.

Los anticuerpos reconocieron, por western blot, el péptido con el cual fueron generados. Sin embargo fueron incapaces de reconocer el péptido en sobrenadantes de células tratadas con Gentamicina. Este hecho puede deberse a la capacidad de la θ defensina de unirse a proteínas como la Fetuina que se encuentra en grandes concentraciones en el suero con el cual se suplementa el medio de cultivo [34, 35] afectando su detección o bien por su tamaño, ya que al ser transferida la banda al filtro de nitrocelulosa pudiera perderse gran parte de ella. Si esto último es lo que está ocurriendo, el uso de la técnica de dotblot, podría evitar la falta de detección. Esta estrategia está siendo abordada ahora en el laboratorio.

A pesar de que los anticuerpos no reconocieron la proteína de los sobrenadantes de células tratadas con Gentamicina, si dieron una tinción positiva solo aquellas células tratadas con Gentamicina durante 24 h., lo cual refuerza la teoría de que bajo la inducción con Gentamicina el ribosoma

permitiría la traducción del mensajero de la defensina. La localización de la marca fue totalmente citoplasmática, lo cual corresponde a lo reportado por Venkataraman y cols., en 2009 con células bajo tratamiento con Tobramicina y por Wang W. y cols., en 2003 con marcaje directo sobre la defensina,.

Las diferencias encontradas entre el trabajo de Ventakaraman y cols. en donde se utilizó como fármaco inductor la Tobramicina y en el presente trabajo solo observamos inducción en presencia de Gentamicina, podrían deberse a que el grupo de Ventakaraman utilizó células transféctadas con la secuencia de la defensina y en éste caso son células en estado basal, de lo cual resulta obvio que en el primer caso el mensajero tendría una mayor probabilidad de traducirse que en nuestros ensayos debido a la existencia de un mayor número de copias, afinidad por el ribosoma, etc. Además, existe una cantidad considerable de literatura reportando que Gentamicina puede inducir la traducción de mensajeros con codones de paro prematuros y debido a esto se ha utilizado en enfermedades genéticas como Distrofia Muscular de Duchenne y fibrosis quística alcanzando una recuperación de la proteína funcional de hasta un 30% en los pacientes[53-56], por su parte para Tobramicina este efecto no ha sido confirmado por otras publicaciones exceptuando la aquí mencionada.

Habiendo demostrado que la banda de menos de 10 kDa tenía capacidad bactericida y que una molécula de localización citoplásmica era detectada por anticuerpos anti-defensina lineal en el citoplasma de células tratadas con Gentamicina, se consideró que se contaba con suficiente evidencia para plantear que la defensina se estaba produciendo en las células tratadas con Gentamicina. Por lo tanto, procedimos a realizar los ensayos de inhibición de la infección por Dengue bajo tres esquemas. En el primero de ellos el virus se incubó por 1 h a 37 °C con el sobrenadante de células tratadas con Gentamicina durante 24 hrs. Esto, para permitir la interacción del virus con la defensina que se pudiera hallar en el medio. Posteriormente, se infectaron las células con esta mezcla durante 1 h. El

resultado de este Pre-tratamiento con los sobrenadantes fue una marcada disminución en la producción proteínas virales como NS1 y la progenie viral que se observó en ensayos de plaqueo. En el segundo esquema, se realizó un pos-tratamiento de las células después de infectarlas por 1 h. Los resultados de este esquema fueron similares a los anteriores tanto en ensayos de plaqueo como en la medición de la proteína NS1, confirmando el papel inhibitorio de la infección inducido por la Gentamicina.

Finalmente, en el último esquema, se utilizó el péptido sintetizado químicamente, el RC-100, que corresponde a la theta defensina humana (pseudogen DEFT1). El péptido fue incubado con el virus durante 1h a 37 °C en concentraciones de 20 y 30 µg/ml del péptido, observándose, en ambas concentraciones, una disminución en la producción de la proteína viral NS1.

A pesar de que inicialmente se planteó que la medición de NS1 podría ser un reflejo de todas las proteínas virales, por ser éstas sintetizadas de manera equimolar, tenía el inconveniente de que al medir la proteína presente en el sobrenadante, los niveles de ella dependían no sólo de su eficiencia de síntesis sino también de su eficiente secreción. Para eliminar el hecho de que la Gentamicina estuviera interfiriendo con la secreción de NS1, se decidió medir el efecto de la Gentamicina sobre la cantidad de proteína viral E dentro de la célula infectada por inmunofluorescencia. De la misma manera que en los ensayos anteriores se realizaron esquemas pre-tratamiento y post-tratamientos. En ambos casos se observó un menor número de células infectadas en comparación con el control de infección normal sin tratamiento así como una menor intensidad en la marca de las células infectadas, confirmando el efecto inhibitorio de la infección por Dengue inducido por el tratamiento con Gentamicina. De la misma manera, se encontró que pre-tratamiento de las células con Amikacina y Tobramicina, no inducía una disminución en el número de células infectadas, por el contrario, en el caso de Tobramicina se apreció un mayor número de éstas así como una mayor intensidad en la marca de las células infectadas.

En resumen, nuestros resultados indican que el tratamiento con Gentamicina de las células Huh-7 inhibe la infección por Dengue. Este efecto puede ser adjudicado a la presencia de la defensina en las células tratadas o a la acción directa de la Gentamicina sobre la traducción o replicación viral. Con respecto a la θ defensina, se ha reportado que inhibe la entrada de virus como influenza, herpes, VIH, baculovirus, etc., todos virus envueltos como Dengue [31, 35, 43]. Uno de los mecanismos de la defensina se basa en impedir cambios conformacionales en las proteínas encargadas de la fusión virus-célula así como de los virus con receptores celulares. De esta manera el virus no puede fusionar su membrana o interactuar con la célula blanco. Hasta ahora con los experimentos realizados no es posible discernir que paso de la infección se ve alterado por la defensina. Para lograr esto será necesario diseñar experimentos adicionales cuyos resultados permitan comprender el mecanismo por el cual la θ Defensina actúa frente a virus Dengue.

La segunda hipótesis que intenta explicar el por qué se induce una reducción en la infección involucra una acción directa de la Gentamicina sobre el virus. A éste respecto se sabe por ensayos realizados por Zhang X y cols., en 2009, que un aminoglucósido análogo de la Gentamicina la Geneticina o G418, disminuye la infección por Dengue de células VERO, la formación de placas en células BHK así como el efecto citopático provocado por el virus Dengue 2 sobre estas células. Para descartar o comprobar esta hipótesis es necesario realizar ensayos que permitan conocer si existe interacción de Gentamicina con componentes virales ya sea a nivel proteico o con ácidos nucleicos llámese RNA o intermediarios como lo sugieren Kim H., y cols., [57] al observar la unión de aminoglucósidos como la Neomicina B, al promotor del RNA viral del virus de la Influenza a concentraciones submicromolares. Los genomas tanto de influenza como de Dengue son de RNA de cadena positiva, sugiriendo que puede existir un comportamiento similar de Gentamicina frente a ambos virus.

Con los resultados aquí mostrados es posible afirmar que la θ Defensina y/o la Gentamicina constituyen alternativas para inhibir la infección por Dengue en una línea celular hepática como la Huh-7. Es interesante resaltar que un antibiótico de uso común como lo es Gentamicina pudiera tener nuevos mecanismos de acción mostrando efectos antivirales contra virus como Dengue. El utilizar un antibiótico ampliamente conocido y probado para el tratamiento de Dengue permitiría tener una mayor certeza en cuanto a los efectos adversos y los resultados potenciales a obtener, lo cual es muy importante en el ámbito farmacológico y clínico.

11. CONCLUSIONES

- A. El tratamiento de células Huh-7 con Gentamicina antes y después de la infección con virus Dengue 4 disminuye la producción de la proteína NS1 y de la progenie Viral en al menos un 80% (0.8 Log.).
- B. Se obtuvieron pruebas de que Gentamicina induce en células Huh-7 la producción de un péptido menor a 10 kDa con capacidad antimicrobiana.
- C. Los anticuerpos producidos contra la secuencia lineal de la θ reconocieron una proteína/péptido con distribución citoplasmática en células tratadas con Gentamicina.
- D. Existe una disminución en la infección de células tratadas con Gentamicina que puede deberse o no al efecto del aminoglucósido o de la expresión de la θ defensiva.

12. PERSPECTIVAS

1. Secuenciar la banda menor a 10 kDa por MS/MS.
2. Probar que Amikacina y Tobramicina no tienen el mismo efecto en la inducción de la θ defensina en células Huh-7 de igual manera que Gentamicina.
3. Probar el tratamiento con Gentamicina frente a los serotipos restantes de virus dengue (DENV 1,2 y 3).|
4. Buscar el mensajero de la θ defensina en las células Huh-7.

13. REFERENCIAS

1. Gibbons, R.V., *Dengue conundrums*. Int J Antimicrob Agents, 2010. **36 Suppl 1**: p. S36-9.
2. Iglesias, N.G. and A.V. Gamarnik, *Dynamic RNA structures in the dengue virus genome*. RNA Biol, 2011. **8(2)**: p. 249-57.
3. Kyle, J.L. and E. Harris, *Global spread and persistence of dengue*. Annu Rev Microbiol, 2008. **62**: p. 71-92.
4. Simmons, C.P., et al., *Dengue*. N Engl J Med, 2012. **366(15)**: p. 1423-32.
5. Whitehorn, J. and C.P. Simmons, *The pathogenesis of dengue*. Vaccine, 2011. **29(42)**: p. 7221-8.
6. Rico-Hesse, R., *Dengue virus virulence and transmission determinants*. Curr Top Microbiol Immunol, 2010. **338**: p. 45-55.
7. Perera, R. and R.J. Kuhn, *Structural proteomics of dengue virus*. Curr Opin Microbiol, 2008. **11(4)**: p. 369-77.
8. Fernandez-Garcia, M.D., et al., *Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell*. Cell Host Microbe, 2009. **5(4)**: p. 318-28.
9. Bollati, M., et al., *Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design*. Antiviral Res, 2010. **87(2)**: p. 125-48.
10. Murphy, B.R. and S.S. Whitehead, *Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 587-619.
11. Smit, J.M., et al., *Flavivirus cell entry and membrane fusion*. Viruses, 2011. **3(2)**: p. 160-71.
12. Rodenhuis-Zybert, I.A., J. Wilschut, and J.M. Smit, *Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67(16)**: p. 2773-86.
13. Rodenhuis-Zybert, I.A., J. Wilschut, and J.M. Smit, *Partial maturation: an immune-evasion strategy of dengue virus?* Trends Microbiol, 2011. **19(5)**: p. 248-54.
14. Wong, S.S., et al., *The dengue virus M protein localises to the endoplasmic reticulum and forms oligomers*. FEBS Lett, 2012. **586(7)**: p. 1032-7.
15. Dong, H., et al., *2'-O methylation of internal adenosine by flavivirus NS5 methyltransferase*. PLoS Pathog, 2012. **8(4)**: p. e1002642.
16. Bustos-Arriaga, J., et al., *Activation of the innate immune response against DENV in normal non-transformed human fibroblasts*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5(12)**: p. e1420.
17. Mosso, C., et al., *Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT*. Virology, 2008. **378(1)**: p. 193-9.
18. Reyes-Del Valle, J., et al., *Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells*. J Virol, 2005. **79(8)**: p. 4557-67.
19. Rothman, A.L., *Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms*. Nat Rev Immunol, 2011. **11(8)**: p. 532-43.
20. Navarro-Sanchez, E., P. Despres, and L. Cedillo-Barron, *Innate immune responses to dengue virus*. Arch Med Res, 2005. **36(5)**: p. 425-35.
21. Fischl, W. and R. Bartenschlager, *Exploitation of cellular pathways by Dengue virus*. Curr Opin Microbiol, 2011. **14(4)**: p. 470-5.
22. Heaton, N.S. and G. Randall, *Dengue virus and autophagy*. Viruses, 2011. **3(8)**: p. 1332-41.

23. Soto-Acosta, R., et al., *The increase in cholesterol levels at early stages after dengue virus infection correlates with an augment in LDL particle uptake and HMG-CoA reductase activity.* Virology, 2013. **442**(2): p. 132-47.
24. Pagni, S. and A. Fernandez-Sesma, *Evasion of the human innate immune system by dengue virus.* Immunol Res, 2012. **54**(1-3): p. 152-9.
25. Bhatt, S., et al., *The global distribution and burden of dengue.* Nature, 2013. **496**(7446): p. 504-7.
26. Munoz-Jordan, J.L. and B.L. Fredericksen, *How flaviviruses activate and suppress the interferon response.* Viruses, 2010. **2**(2): p. 676-91.
27. Tang, Y.Q., et al., *A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins.* Science, 1999. **286**(5439): p. 498-502.
28. Tongaonkar, P. and M.E. Selsted, *SDF2L1, a component of the endoplasmic reticulum chaperone complex, differentially interacts with {alpha}-, {beta}-, and {theta}-defensin propeptides.* J Biol Chem, 2009. **284**(9): p. 5602-9.
29. Nguyen, T.X., A.M. Cole, and R.I. Lehrer, *Evolution of primate theta-defensins: a serpentine path to a sweet tooth.* Peptides, 2003. **24**(11): p. 1647-54.
30. Craik, D.J., *Chemistry. Seamless proteins tie up their loose ends.* Science, 2006. **311**(5767): p. 1563-4.
31. Cole, A.M., et al., *Retrocyclin: a primate peptide that protects cells from infection by T- and M-tropic strains of HIV-1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 1813-8.
32. Tang, M., et al., *Orientation of a beta-hairpin antimicrobial peptide in lipid bilayers from two-dimensional dipolar chemical-shift correlation NMR.* Biophys J, 2006. **90**(10): p. 3616-24.
33. Conibear, A.C., et al., *The cyclic cystine ladder in theta-defensins is important for structure and stability, but not antibacterial activity.* J Biol Chem, 2013. **288**(15): p. 10830-40.
34. Wang, W., et al., *Retrocyclin, an antiretroviral theta-defensin, is a lectin.* J Immunol, 2003. **170**(9): p. 4708-16.
35. Leikina, E., et al., *Carbohydrate-binding molecules inhibit viral fusion and entry by crosslinking membrane glycoproteins.* Nat Immunol, 2005. **6**(10): p. 995-1001.
36. Wang, W., et al., *Retrocyclins kill bacilli and germinating spores of Bacillus anthracis and inactivate anthrax lethal toxin.* J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32755-64.
37. Daly, N.L., et al., *Retrocyclin-2: structural analysis of a potent anti-HIV theta-defensin.* Biochemistry, 2007. **46**(35): p. 9920-8.
38. Wang, W., et al., *Activity of alpha- and theta-defensins against primary isolates of HIV-1.* J Immunol, 2004. **173**(1): p. 515-20.
39. Munk, C., et al., *The theta-defensin, retrocyclin, inhibits HIV-1 entry.* AIDS Res Hum Retroviruses, 2003. **19**(10): p. 875-81.
40. Owen, S.M., et al., *RC-101, a retrocyclin-1 analogue with enhanced activity against primary HIV type 1 isolates.* AIDS Res Hum Retroviruses, 2004. **20**(11): p. 1157-65.
41. Gallo, S.A., et al., *Theta-defensins prevent HIV-1 Env-mediated fusion by binding gp41 and blocking 6-helix bundle formation.* J Biol Chem, 2006. **281**(27): p. 18787-92.
42. Venkataraman, N., et al., *Reawakening retrocyclins: ancestral human defensins active against HIV-1.* PLoS Biol, 2009. **7**(4): p. e95.
43. Yasin, B., et al., *Theta defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry.* J Virol, 2004. **78**(10): p. 5147-56.

44. Brandt, C.R., et al., *Evaluation of a theta-defensin in a Murine model of herpes simplex virus type 1 keratitis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(11): p. 5118-24.
45. Liang, Q.L., K. Zhou, and H.X. He, *Retrocyclin 2: a new therapy against avian influenza H5N1 virus in vivo and vitro*. Biotechnol Lett, 2010. **32**(3): p. 387-92.
46. Rothan, H.A., et al., *Inhibition of dengue NS2B-NS3 protease and viral replication in Vero cells by recombinant retrocyclin-1*. BMC Infect Dis, 2012. **12**: p. 314.
47. Lamers, R.P., et al., *Characterization of the retrocyclin analogue RC-101 as a preventative of Staphylococcus aureus nasal colonization*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(11): p. 5338-46.
48. Gupta, P., et al., *Retrocyclin RC-101 blocks HIV-1 transmission across cervical mucosa in an organ culture*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2012. **60**(5): p. 455-61.
49. Cole, A.L., et al., *The retrocyclin analogue RC-101 prevents human immunodeficiency virus type 1 infection of a model human cervicovaginal tissue construct*. Immunology, 2007. **121**(1): p. 140-5.
50. Eade, C.R., et al., *The anti-HIV microbicide candidate RC-101 inhibits pathogenic vaginal bacteria without harming endogenous flora or mucosa*. Am J Reprod Immunol, 2013. **69**(2): p. 150-8.
51. Hooven, T.A., et al., *Retrocyclin inhibits Gardnerella vaginalis biofilm formation and toxin activity*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(12): p. 2870-2.
52. Sassi, A.B., et al., *Formulation development of retrocyclin 1 analog RC-101 as an anti-HIV vaginal microbicide product*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(5): p. 2282-9.
53. Edelman, A., I. Sermet-Gaudelus, and J.P. Rousset, *Genetic testing to provide targeted treatment for cystic fibrosis patients*. Pharmacogenomics, 2007. **8**(9): p. 1101-4.
54. Sermet-Gaudelus, I., et al., *In vitro prediction of stop-codon suppression by intravenous gentamicin in patients with cystic fibrosis: a pilot study*. BMC Med, 2007. **5**: p. 5.
55. Wilschanski, M., et al., *Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations*. N Engl J Med, 2003. **349**(15): p. 1433-41.
56. Wagner, K.R., et al., *Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations*. Ann Neurol, 2001. **49**(6): p. 706-11.
57. Kim, H., et al., *Aminoglycoside antibiotics bind to the influenza A virus RNA promoter*. Mol Biosyst, 2012. **8**(11): p. 2857-9.