



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Estudio de los mecanismos de inhibición de la infección por dengue por
vitamina D”**

TESIS

Que presenta:

M. EN C. ANTONIO HUMBERTO ANGEL AMBROCIO

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Director de Tesis:

Dra. Rosa María Del Angel

Ciudad de México

Diciembre 2016

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto de tesis.

Al Centro de Investigación y De Estudios Avanzados por brindarme todo el apoyo durante mi estancia.

De igual manera agradezco infinitamente a la Dra. Rosa María Del Angel por ser una excelente guía y permitirme trabajar en su laboratorio.

A mis asesores la Dra. Lorena Gutierrez Escolano, Dr. José Luis Rosales Encina, Dr. Vianney Ortiz Navarrete, Dr. Juan Ernesto Ludert Leon y la Dra. Ma. Isabel Salazar Sánchez, por sus valiosas observaciones que hicieron posible llevar a cabo mi proyecto de tesis.

Al Auxiliar Fernando Medina Ramírez, a los técnicos Jaime Guadalupe Zarco Esquivel Y Rubén Sánchez Islas por el apoyo brindado en el laboratorio.

RESUMEN

La 1α , 25-dihidroxi-calcitriol, vitamina D3 (VD3) tiene un amplio espectro de efectos sobre la diferenciación y proliferación celular, así mismo modula la respuesta inmune en monocitos / macrófagos, células dendríticas y linfocitos. Se ha propuesto el uso de VD3 para el tratamiento de enfermedades infecciosas, autoinmunes, bacterianas y víricas. Trabajo previo demostró que el tratamiento con VD3 reduce significativamente el número de células U937 infectadas con DENV, (Antiviral Res., 2012) 94:57. Sin embargo el mecanismo implicado en la acción antiviral de VD3 no está descrito, sin embargo se sabe que VD3 induce autofagia en muchas líneas celulares y este mecanismo ha sido propuesto para explicar la reducción por VD3 en la replicación viral. Se ha demostrado que la autofagia facilita la replicación de DENV en algunas líneas celulares pero la impide en otras. En este estudio, se caracterizaron por los mecanismos anti-DENV inducidos por vitamina D3 en células monocíticas, utilizando la línea U937 DC SIGN, la cual es altamente permisiva para la infección por DENV. Nuestros resultados muestran que VD3 es capaz de inducir autofagia en macrófagos humanos e inhibe significativamente la replicación de DENV. Sin embargo la inhibición de la autofagia o la inhibición de la fusión de autofagosomas con lisosomas, reduce parcialmente la acción del mecanismo antiviral VD3. Además, VD3 induce la secreción de catelicidina, una proteína que tiene actividad antimicrobiana directa. Estos hallazgos apoyan la idea de que la autofagia es uno de los mecanismos inducidos por VD3 para inhibir la infección por DENV. La secreción de catelicidina puede ser también otro mecanismo anti-DENV inducido por VD3 en células monocíticas. Nuestros resultados fueron confirmados por PCR en tiempo real, ensayos de Western blot, microscopía confocal y marcadores de autofagia. Nuestros resultados demuestran que VD3 inducen autofagia en células U937-DC y que la autofagia es necesaria para la inhibición mediada por VD3 de la replicación de DENV, pero la autofagia no es el único mecanismo para inhibir la infección.

ABSTRACT

The 1 α ,25-dihydroxy-calcitriol, vitamin D3 (VD3) has widely spread effects on cellular differentiation and proliferation, and immune responsiveness in monocytes/macrophages, dendritic cells and lymphocytes. The use of VD3 has been proposed for the treatment of autoimmune, bacterial and viral infectious diseases. Previous work from our group showed that treatment with VD3 resulted in a significant reduction in the number of DENV U937 infected cells, (Antiviral Res. 2012. 94:57) The mechanism involved in the antiviral action of VD3 is not fully understood but it is known that VD3 induces autophagy in many cells lines and this has been the mechanism proposed to explain VD3 reduction in virus replication. Autophagy has been shown to facilitate DENV replication in some cells lines but to impede it in others. In this study, we sought to characterize VD3-induced antiviral mechanisms in DENV infected monocytic cells, using the highly permissive cell line U937-DCSIGN.

We found that physiologically relevant concentrations of VD3 induce autophagy in human macrophages and significantly inhibits DENV proliferation but the inhibition of basal autophagy or inhibition of fusion of autophagosomes with lysosomes, partially reduces the action of the VD3 antiviral mechanism. Furthermore, VD3 induces the secretion of human cathelicidin, a protein that has direct antimicrobial activity. Our results support the idea that autophagy is one of the mechanisms induced by VD3 to inhibit DENV infection. Secretion of cathelicidin may also be an anti-DENV mechanism induced by VD3 in monocytic cells. These findings were confirmed by real time PCR, western blot assays, confocal microscopy, and autophagy markers. Our results demonstrate that VD3 induce autophagy in U937-DC cells and that autophagy is required for the VD3 mediated inhibition of DENV replication, but autophagy is not the only mechanism to inhibit DENV infection

INDICE

Contenido	Página
1.- Introducción	1
2.- Generalidades	3
2.1 Epidemiología del Dengue	3
2.2 Cuadro clínico	4
2.3 El virus Dengue	5
2.4 Ciclo de replicación de virus dengue	7
2.5 Vitamina D	9
3.- Antecedentes	11
3.1 Infecciones virales y vitamina D	11
3.2 Virus Dengue y Autofagia	11
3.3 Vitamina D y respuesta inmune innata	15
4.- Justificación	18
5.- Objetivo	20
6.- Material y métodos	22
7.- Resultados	27
8.- Discusión	43
9.- Conclusión	47
10.- Bibliografía	48

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades virales emergentes causadas por flavivirus constituyen un importante problema de salud pública a nivel mundial, debido a su rápida diseminación dependiente de vectores artrópodos y a su gran impacto socioeconómico. Los *Flavivirus* son un género de virus de RNA pertenecientes a la familia *Flaviviridae*. Este grupo de virus incluye al virus de la fiebre amarilla, al virus dengue (DENV), al virus del oeste del Nilo y al virus de la encefalitis Japonesa. De estos, el DENV se considera como el arbovirus de mayor importancia a nivel salud y de mayor diseminación en el planeta.

Se estima que dos quintas partes de la población humana viven en áreas de riesgo de transmisión de la infección por DENV. Existen cuatro diferentes serotipos de DENV (DENV1-4), cada uno con múltiples genotipos y variantes. Los DENV son transmitidos al hombre mediante la picadura de las hembras de mosquitos del género *Aedes*, principalmente *A. aegypti* y *A. albopictus* (Kunh et al 2004) (Halstead et al 2008).

La vitamina D es conocida por su papel tradicional en mineralización ósea y homeostasis del calcio. Sin embargo, en los últimos años la evidencia sugiere que además de las funciones antes descritas, la vitamina D, tiene la capacidad de modular el sistema inmune en respuesta a una infección (Bikle et al 2009). La gran cantidad de literatura sobre vitamina D incluye su participación en la modulación de la inmunidad innata (Miller et al 2010), sistema cardiovascular y cáncer. Por tanto, su uso ha sido propuesto para el tratamiento de enfermedades autoinmunes e infecciones bacterianas y virales (Baeke et al 2010) (Zasloff et al 2006). A pesar de que existen pocos casos de uso en tratamiento de infecciones virales, se desconoce el mecanismo de acción antiviral (Beard et al 2011). Para el caso del DENV solo existen dos trabajos de uso de vitamina D, durante infección, en el

primero los autores demuestran que la administración de vitamina D reduce la severidad de la enfermedad (Sánchez et al 2009) y otro donde se demuestra in vitro que la exposición a vitamina D, reduce significativamente el número de células infectadas con DENV y las citocinas proinflamatorias producidas durante la infección (Puerta-Guardo et al 2012).

Es por ello que en el presente proyecto, abordamos el estudio de los mecanismos a través de los cuáles la vitamina D, puede inhibir la infección del virus del DENV.

2. GENERALIDADES

2.1 Epidemiología del dengue

Hasta el siglo XIX la Fiebre por dengue (FD) fue considerada como una enfermedad esporádica, sin embargo, hoy en día es la enfermedad viral transmitida por mosquitos vectores más importante en el mundo. La OMS estima que ocurren más de 50 millones de infecciones con DENV a nivel mundial por año, con 500,000 casos de Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) y 22,000 muertes, principalmente en niños (OMS 2010).

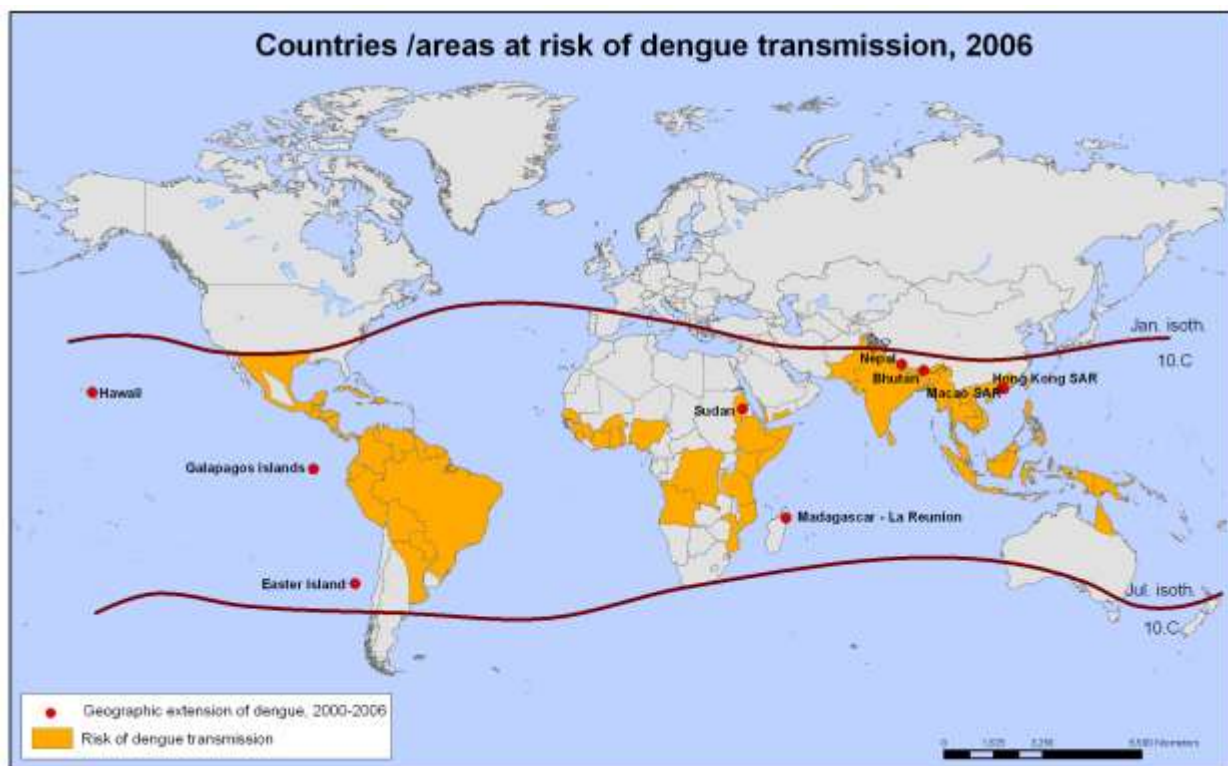


Figura1. Áreas en riesgo de transmisión. Las regiones tropicales son las zonas con mayor riesgo de transmisión debido a una mayor presencia del vector en estas áreas.

Fuente: Organización Mundial de la Salud 2006.

La combinación de factores tales como un rápido crecimiento poblacional, migración, infraestructura urbana inadecuada, incremento en el volumen de basura, así como contenedores de plástico y otros artículos abandonados proveen hábitats para el desarrollo de las larvas de *A. aegypti* en áreas urbanas,

produciendo así condiciones epidemiológicas en países en vías de desarrollo, en trópicos y subtropicos que favorecen la transmisión viral por el vector (OMS 2006). (Figura 1)

La Organización Panamericana de la Salud reporta que México ocupa el cuarto lugar en incidencia en América (OPS 2015), y por su parte el CENAPRECE en su publicación de la Semana Epidemiológica N° 44, hasta el 7 de noviembre de 2016 reporta 14 443 casos confirmados de Dengue con 11 defunciones.

2.2 Cuadro clínico

La infección en la población humana con el DENV, puede cursar en forma asintomática o expresarse en un amplio espectro de manifestaciones clínicas

Después de un periodo de incubación de 2 a 7 días, en general el paciente suele experimentar fiebre de comienzo brusco, cefaléa, dolor retro orbitario, dolores de espalda, además de mialgias intensas. Durante el primer día de aparición de los síntomas suele presentarse un exantema maculopapuloso, así como adenopatías, vesículas en el paladar e inyección conjuntival. La enfermedad puede durar una semana y habitualmente existen otros síntomas, como anorexia, náuseas o vómitos e intensa hipersensibilidad cutánea (Braunwald et al 2002).

La FHD y Síndrome de Choque por Dengue (SCD) son las formas más graves de la enfermedad. Estas tienen como característica el aumento de la permeabilidad vascular que puede llevar a una hemoconcentración y choque hipovolémico (Braunwald et al 2002).

La FHD se diagnostica detectando la tendencia hemorrágica o la existencia de hemorragias manifiestas (Rigau-Pérez et al 1999), sin que haya procesos subyacentes. El SCD es mucho más grave, y es el resultado del aumento de la permeabilidad vascular que provoca el choque hipovolémico. En FHD y SCD se presenta agitación, letargo, trombocitopenia y hemoconcentración, 2 a 5 días después del comienzo típico de la FD. En los casos más graves es evidente un shock manifiesto, con baja presión arterial, cianosis, hepatomegalia, derrames

pleurales, ascitis, equimosis y hemorragias digestivas.

El tratamiento clínico de las infecciones por DENV es sintomático y de soporte ya que, no existe ninguna vacuna aceptada, ni una terapia antiviral específica para prevenir o contrarrestar la infección (Braunwald et al 2002).

2.3 El virus dengue

Durante la infección de los virus a su célula huésped, ocurren una serie de eventos que se denominan “ciclo de replicación”. Este involucra, la unión-entrada del virus a la célula, la replicación de su genoma, la síntesis y modificación de sus proteínas, el ensamblaje de la partícula viral y por último, la liberación de la progenie al medio externo. El resultado de la coevolución del virus y su hospedero, es su sobrevivencia.

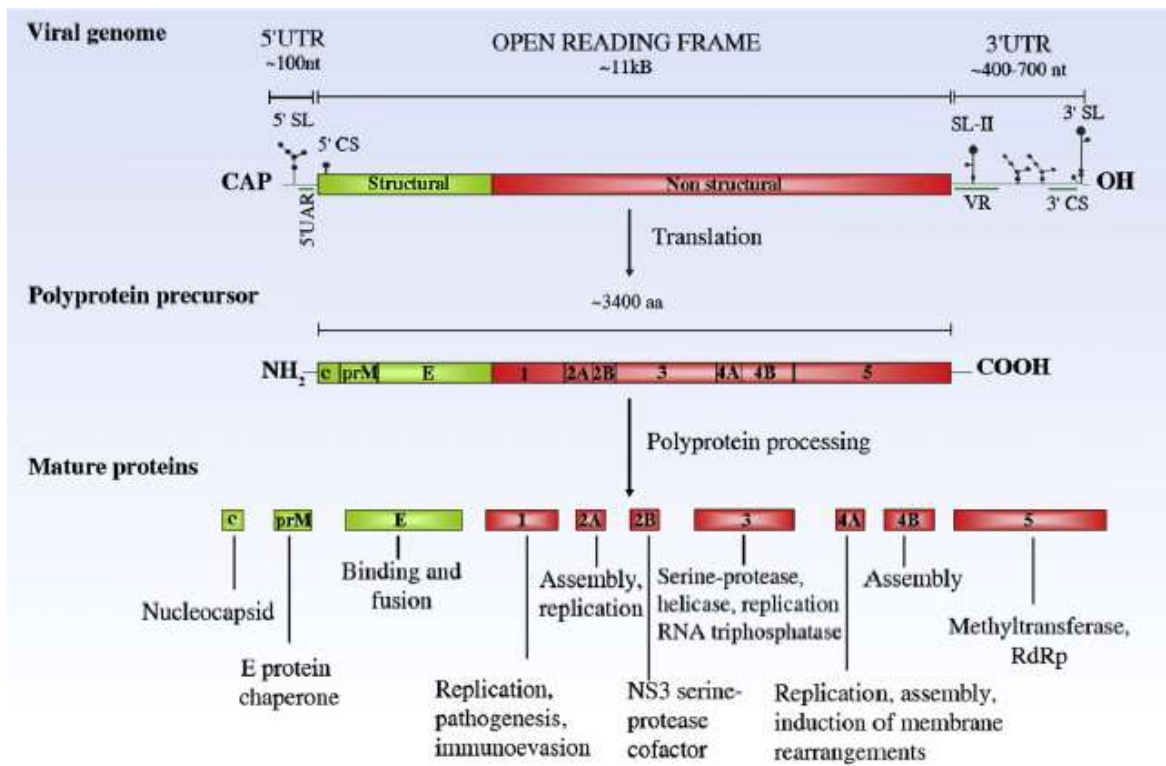


Figura 2. Genoma y Proteoma del Virus Dengue. (Fernandez-Garcia et al 2009) El genoma del DENV codifica para 3 proteínas estructurales (C, prM y E) que conforman la partícula viral y 7 no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) que están involucradas en la replicación, ensamblaje del virión así como la modulación de la respuesta celular.

A nivel molecular, esto se traduce en el desarrollo de diversas estrategias de control/modulación de los procesos celulares de su hospedero.

Los DENV son partículas icosaédricas de 50 nm de diámetro con una capa lipídica derivada del hospedero revistiendo una nucleocápside de proteína C que rodea al RNA viral (Mukhopadhyay et al 2005) (Fernández-García et al 2008).

El DENV presenta un genoma que está conformado por RNA de cadena sencilla de polaridad positiva de 11kb. Presenta CAP (m^7GpppX) en el extremo 5' pero carece de cola poliadenilada (poli A) en el extremo 3'.

Su genoma codifica para tres proteínas estructurales que son: la proteína de la cápside (C), de la premembrana (prM) y envoltura (E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, NS5). (Figura 2)

Las proteínas estructurales forman a la partícula viral, (Figura 3); mientras las no estructurales participan en la replicación, ensamblaje del virión y modulación de la respuesta celular.

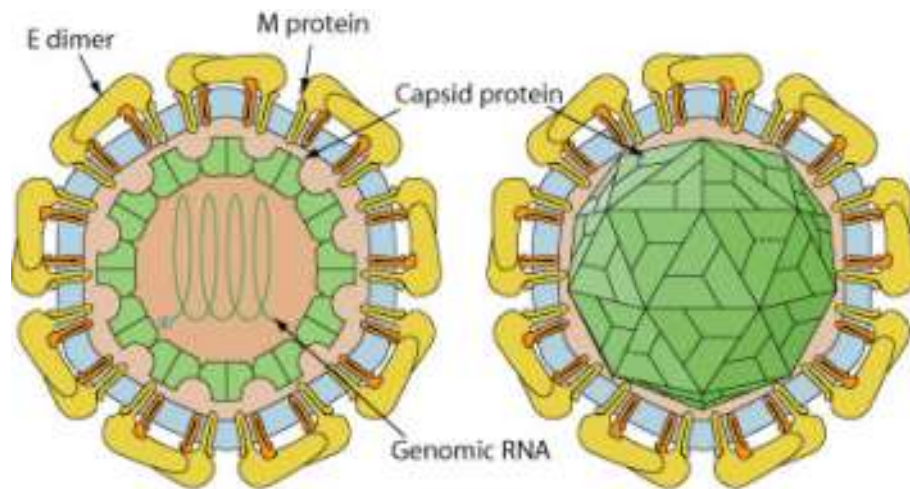


Figura 3. Proteínas estructurales ensambladas. En el esquema se muestra un corte transversal de la partícula viral en donde puede observarse la cápside icosaédrica rodeada de una membrana lipídica en las que se encuentran las proteínas E y M.

2.4 Ciclo de replicación de DENV

La entrada de DENV al citoplasma celular se realiza por endocitosis mediada por receptor. Muchas moléculas han sido propuestas como posibles receptores, pero la interacción mejor descrita es la que se lleva a cabo, en células dendríticas, con la lectina DC-SIGN como molécula responsable de la unión. Otros ejemplos descritos son: la proteína Clec5a, la cual participa en la unión del virus a la membrana celular de macrófagos. Aunque esta molécula no se requiere para la entrada del virus en el citoplasma, si participa en el inicio de cascada de señalización inducida por el virus, la cual termina con la transcripción de citocinas proinflamatorias. Estas citocinas son características de la patogenicidad inducida durante los cuadros severos de la enfermedad (Tassaneeritthep et al 2003) (Chen et al 2008).

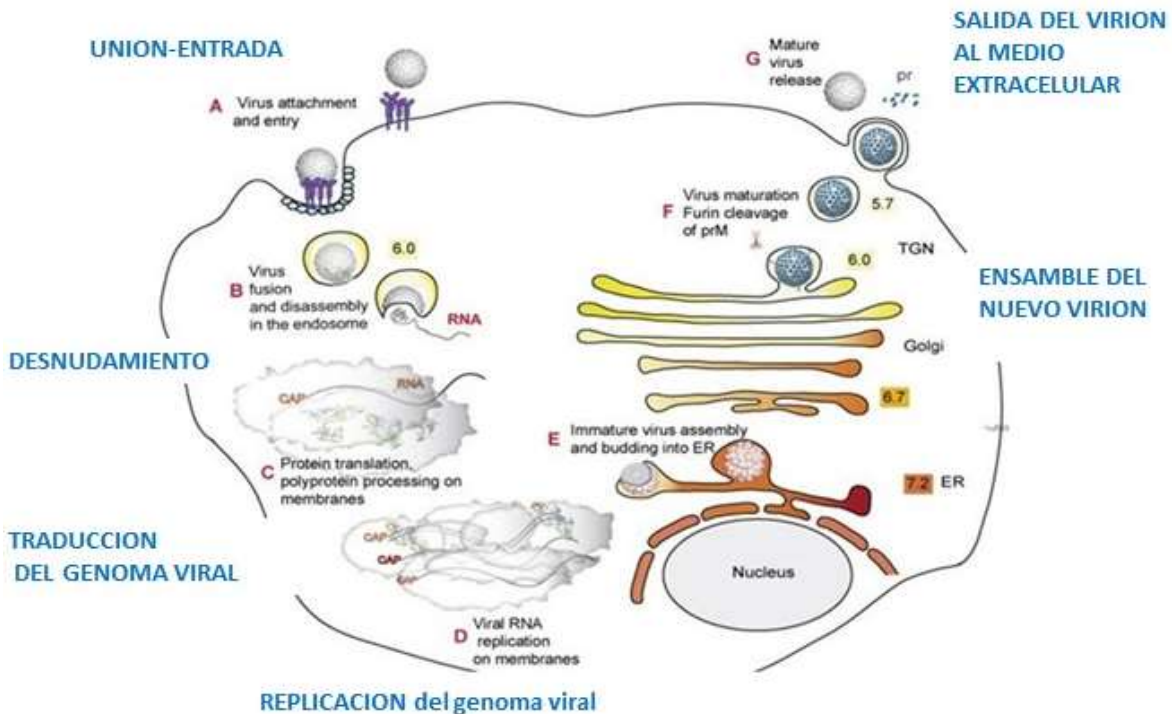


Figura 4. Ciclo de replicación del DENV. El DENV ingresa a la célula mediante endocitosis mediada por receptor, la traducción y replicación ocurre en estructuras membranosas relacionadas con el retículo endoplasmico (RE), luego, las partículas recién ensambladas son transportadas al aparato de Golgi, donde termina su maduración y son expulsadas al medio extracelular por exocitosis.

El pH ácido de los endosomas provoca cambios conformacionales en la glicoproteína E, lo cual induce la fusión de la membrana viral y con la membrana endosomal permitiendo su internalización (Modis et al 2014). Una vez dentro de la célula el genoma viral debe traducirse para generar las proteínas estructurales y no estructurales entre las que se encuentra la polimerasa viral que permite la multiplicación de los genomas y el establecimiento de una infección productiva.

La traducción y replicación de virus de cadena positiva ocurre en asociación con estructuras membranosas intracelulares relacionadas con el retículo endoplásmico (Salonen et al 2005; Mackenzie et al 2005). Cuando la nucleocápside entra al citoplasma, el genoma viral es liberado, y traducido a una poliproteína la cual sufre procesamiento co y postraduccional, por proteasas del hospedero y virales para producir las proteínas individuales para la replicación y empaquetamiento.

La replicación inicia con la síntesis de la cadena negativa, que sirve como molde para la producción de múltiples copias de RNA de cadena positiva (Clyde et al 2006). Tanto la replicación como el ensamblaje ocurren en las membranas del retículo endoplásmico (Figura 4). Las partículas recién ensambladas son transportadas hacia la red trans Golgi y en este compartimiento la proteína E experimenta cambios conformacionales y la proteína prM es procesada proteolíticamente por la furina celular en pr y M. El péptido pr permanece asociado con la proteína E hasta que el virión maduro es liberado de la célula, mientras la proteína M se asocia con la membrana viral. (Figura 5). Finalmente, la progenie viral es liberada al medio externo por exocitosis. (Mukhopadhyay et al 2005) (Fernandez et al 2009).

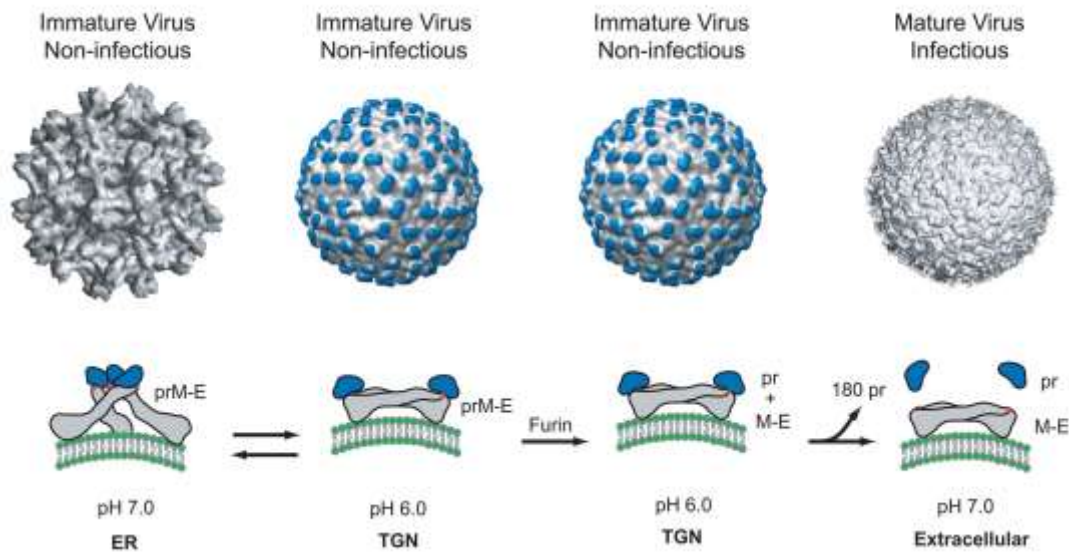


Figura 5. Maduración de la partícula viral. En la red trans Golgi la proteína prM es procesada proteolíticamente por una furina celular en pr y M. El péptido pr permanece unido a la proteína E hasta que el virión es liberado. (Perera et al 2008)

2.5 Vitamina D (1 α , 25 dihidroxivitamina D3.)

La vitamina D, es una hormona pleiotrópica, está involucrada en diversos procesos celulares tales como, respuesta inmune, mineralización ósea, inflamación y prevención de cáncer. Diferentes estudios sugieren que la vitamina D y sus metabolitos activos tienen funciones diferentes en una gran variedad de tejidos. La mayoría de los tejidos en el organismo cuentan con receptores para la forma activa de la vitamina D, por lo que la activación de su receptor nuclear media la mayoría de las funciones de esta y su activación afecta varios procesos como apoptosis, metabolismo del calcio, inmunidad y autofagia (Wu et al 2011). Las dos principales formas de vitamina D son: la vitamina D2 (ergocarciferol) y la Vitamina D3 conocida como calcitriol o colecalciferol (Holick et al 2003). La Vitamina D2 es sintetizada por plantas y hongos y no es producida en vertebrados, mientras que la vitamina D3 se produce en grandes cantidades en humanos y en la mayoría de los vertebrados.

La fuente principal de vitamina D se obtiene en la piel, en donde los rayos

ultravioleta catalizan el primer paso en la síntesis de VD convirtiendo el 7 dehydroxycolesterol en previtamina D, posteriormente este se isomeriza dependiente de temperatura y se convierte en 1,25 (OH)₂D₃.

Para obtener la forma activa de la Vitamina D, esta debe ser hidroxilada en el hígado en 25 hidroxivitamina D₃ (De Luca et al 1974). Posteriormente, es transportada al túbulo proximal en los riñones a través del torrente sanguíneo, donde es hidrolizada en la posición 1 alfa para formar el calcitriol, el cual es liberado al torrente sanguíneo (Jurutka et al 2007).

La acción biológica de Vitamina D se lleva a cabo mediante la activación del receptor de vitamina D (VDR) y el receptor retinoide X alfa (RXR- α) los cuales se encuentran en el núcleo de varios tipos de células (Bikle et al 2009). El VDR es también un factor de transcripción activado por ligando y está presente en varias células del sistema inmune incluyendo los monocitos, macrófagos, células dendríticas, células NK, así como células T y B. Entre las principales funciones reguladas por la Vitamina D están la proliferación, diferenciación, metabolismo de calcio, apoptosis, inmunidad y autofagia (Wu et al 2011).

3. ANTECEDENTES

3.1 Infecciones virales y vitamina D

La incidencia de infecciones virales aumenta típicamente en los meses de invierno, cuando la síntesis cutánea de vitamina D esta naturalmente disminuida. En contraste con los datos obtenidos en pacientes adultos, las infecciones más frecuentes en niños con deficiencia de vitamina D son de origen viral. Una de las primeras pistas que marcan la importancia de la vitamina D sobre la incidencia de infecciones virales es, que la susceptibilidad a las infecciones en niños ocurre después de evidentes carencias nutricionales (Grant et al 2008). Otro ejemplo donde la evidencia clínica y genética sugiere que vitamina D puede jugar un papel importante en la susceptibilidad es en las infecciones por el Virus de la Inmunodeficiencia Adquirida (VIH). Modelos de infecciones con VIH en el laboratorio han demostrado que el pre-tratamiento de monocitos y macrófagos humanos con vitamina D previene la infección por VIH, aunque esto es controversial porque en ocasiones la incrementa (Connor et al 1991). En otro estudio reciente se demostró que catelicidina, un péptido antimicrobiano, regulado en parte por Vitamina D puede inhibir la replicación de VIH.

Por otra parte recientemente ha sido reportado una asociación significativa entre susceptibilidad genética a bronquiolitis por Virus Sincicial Respiratorio y algunos polimorfismos de genes relacionados a la función del sistema inmune innato, incluyendo el receptor de vitamina D (Villamor et al 2006).

3.2 Virus Dengue y autofagia

Uno de los principales mecanismos que se activan por la vitamina D, es la autofagia. Diversos estudios para VIH han demostrado, que la autofagia puede ser un mecanismo antiviral, por medio del cual se inhibe la replicación.

La autofagia es un proceso homeostático en donde material citoplasmático es englobado en una doble membrana vesicular para ser degradado (Kundu et al 2008). y es una vía catabólica mediada por lisosomas en todas las células

eucariontes (Reggiori et al 2002).

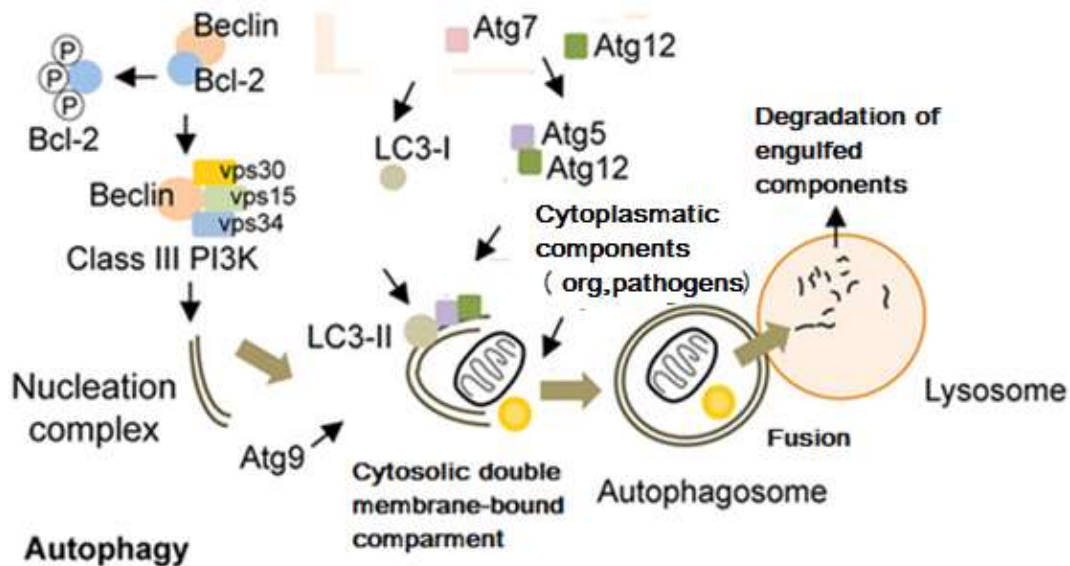


Figura 6. Proceso de autofagia. La autofagia involucra un gran número de proteínas altamente conservadas, y consta de 3 pasos fundamentales, formación de autofagosomas los cuales secuestran material citoplasmático, a continuación se realiza la fusión de las membranas del autofagosoma con el lisosoma y degradación del material secuestrado por medio de las enzimas lisosomales.

La autofagia comienza con el secuestro de materiales citoplasmáticos dentro de una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma, esta estructura puede, directamente fusionarse con el lisosoma para formar autofagolisosomas o con endosomas para formar anfisomas (Gordon et al 1988). La fusión de las vesículas autofágicas con los lisosomas permite la degradación de los materiales citoplasmáticos (Mizushima et al 2007). (Figura 6) Las proteínas Atg son esenciales para la formación del autofagosoma. El primer paso en el proceso es la unión covalente entre Atg5 y Atg12 la cual es crucial para el alargamiento de la membrana preautofagosomal y la formación del autofagosoma (Mizushima et al 2007), posteriormente, se conjuga la proteína de cadena ligera asociada a microtúbulos (LC3;Atg8) con fosfatidiletanolamida lo que la convierte de la forma citosólica (LC3I) a la forma membranal (LC3II), la cual se integra dentro de la membrana autofagosomal (Klionsky et al 2017). LC3 es comúnmente usado como un marcador para monitorear autofagia, donde la cantidad de LC3II, refleja la

existencia de autofagosomas (Mizushima et al 2007).

Durante una infección viral, los virus manipulan diferentes vías de señalización, incluyendo la autofagia. Para el caso del DENV se ha confirmado que el virus induce y requiere autofagia en su proceso de replicación. Lee et al, caracterizaron el proceso de autofagia durante la infección por DENV en 2008 (Lee et al 2008). Los autores muestran que la infección induce autofagia en una línea celular de hepatocitos y que la inhibición de ésta mediante la droga 3 metiladenina (3MA) o RNAs de interferencia, compromete la infección. Adicionalmente, demostraron que los autofagosomas inducidos por DENV co-localizan con LAMP1, un marcador de fusión lisosomal.

Panyasrivanit et al, un año después, vuelven a confirmar vía ensayos de inmunofluorescencia y ensayos de inhibición, que la infección por DENV induce y requiere autofagia y que la proteína viral de dengue NS1 colocaliza con autofagosomas, así como LAMP1 y la proteína ribosomal L28. Los autores comprobaron que M6P-R un marcador endosomal co-localiza con autofagosomas, indicando que algunos autofagosomas se fusionan con los endosomas para formar organelos llamados anfisomas. Así los autores hipotetizan que DENV podría replicarse en estos anfisomas ligando así el proceso de entrada y replicación.

Los autores también mostraron que la inhibición de la fusión lisosomal con autofagosomas incrementa la replicación viral, indicando un rol para autofagosomas inmaduros durante la replicación de DENV (Panyasrivanit et al 2009). En otro trabajo Khakpoor et al (Khakpoor et al 2009), examinaron el rol de la autofagia en la infección por DENV3, al igual que DENV2, indicando que la infección por DENV3 induce y requiere autofagia. Observaron que LAMP1 co-localiza con autofagosomas, pero en contraste con estudios previos, el tratamiento con un inhibidor de la fusión lisosomal reduce la replicación por DENV3. Por tanto el mecanismo por el cual los autolisosomas podrían contribuir a la replicación viral sigue siendo incierto.

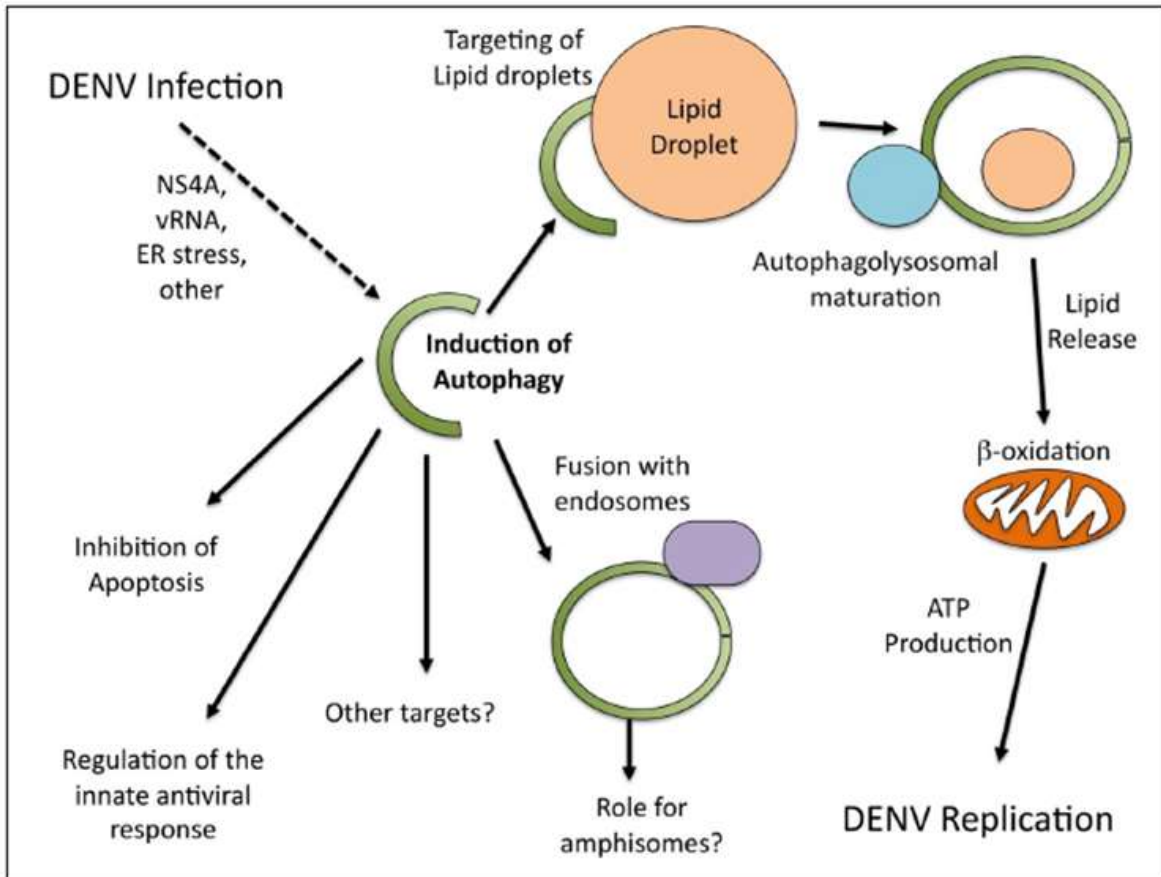


Figura 7. Inducción de autofagia por el virus dengue. La inducción de autofagia por parte del virus le permite a la célula entrar en un estado energético, favorable para la correcta producción y ensamblaje de las partículas virales, ya que al secuestrar ácidos grasos, estos se degradan y se procesan vía beta oxidación para una mayor formación de ATP. Tomado de Heaton N, Randal G, Dengue virus and autophagy; viruses 2011 , 3, 1332-1341

Por otro lado, Heaton et al proveen evidencia de que DENV induce degradación de gotas lipídicas por medio de autofagia para movilizar triglicéridos que son usados para la producción de energía mediante la β oxidación y así la célula se mantiene en un estado energético, para soportar la producción y ensamblaje de partículas virales (Heaton et al 2010). (Figura7) Si bien todos los estudios mencionados dejan claro que la autofagia es importante en la infección por DENV todos ellos han sido realizados en células hepáticas, sin embargo, Panyasrivanit et al, evaluaron la función de la autofagia en monocitos. Sorprendentemente la inducción bioquímica de autofagia en éstas células, produjo una reducción

significativa en la producción viral, mientras que la inhibición de la autofagia provocó un pequeño incremento en los niveles intracelulares virales, lo cual indicaría que la participación de la autofagia en la infección depende del tipo celular (Panyasrivanit et al 2011). Finalmente Mateo et al, usando un inhibidor novedoso de la vía autofágica llamado espautina, encontraron que se inhibía la producción viral. Concluyendo que la vía autofágica facilita la replicación del RNA viral y más importante es requerida para la producción de viriones infecciosos. (Mateo et al 2013)

DENV como parásito intracelular obligado necesita la maquinaria de la célula huésped para su replicación por lo que ha desarrollado diversas estrategias de control de algunos procesos celulares. En el caso del DENV no está claro si la autofagia beneficia al virus o es un mecanismo de defensa celular, ya que como se mencionó anteriormente, depende de la línea celular en la cual se analice el proceso. Sin embargo, siendo vitamina D un potente inductor de autofagia que a través de éste mecanismo inhibe la replicación de otros virus, es muy importante elucidar si para la infección con DENV la vitamina D está inhibiendo la replicación viral a través de ésta vía o posee mecanismos antivirales alternos.

3.3 Vitamina D y respuesta inmune innata

La importancia del vínculo entre vitamina D3 y la inmunidad innata, tomó importancia cuando algunos estudios mostraron que la respuesta de los monocitos/macrófagos a las infecciones bacterianas eran potentemente estimuladas por vitamina D (Di rosa et al 2011).

La vitamina D regula la expresión del factor estimulador de granulocitos y estimula a los macrófagos a producir prostaglandina E2. La deficiencia de vitamina D disminuye la habilidad de los macrófagos para madurar, producir antígenos de superficie específicos disminuyendo la expresión en membrana de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (Xu et al 1993) para generar enzimas lisosomales y secretar peróxido de hidrogeno (H_2O_2), herramientas esenciales para su función microbicida (Abu-amer et al 1993). En contraste la adición de

vitamina D incrementa la expresión de antígenos de superficie específicos de macrófagos, enzimas lisosomales, además de estimular la quimiotaxis y fagocitosis (Alappat et al 2010).

La habilidad de la vitamina D para estimular la diferenciación de precursores monocíticos en macrófagos también fue uno de los primeros descubrimientos que sugirieron un papel inmunomodulador para la vitamina D (Abe et al 1983), por ejemplo regula las respuestas del macrófago previniéndolos de liberar una mayor cantidad de citocinas inflamatorias que las requeridas (Alappat et al 2010).

Uno de los principales sensores de la respuesta inmune innata son los receptores tipo toll (TLR's). Los TLR's se encuentran en macrófagos, células polimorfonucleares y monocitos y son parte fundamental en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), entre los que se encuentran proteínas virales y ácidos nucleicos (Saito et al 2007). Una vez que los TLRs se activan se liberan citocinas que inducen la expresión de péptidos antimicrobianos y especies reactivas de oxígeno.

Se ha observado en diversos estudios que la vitamina D reduce la expresión de algunos TLR's específicamente TLR2, TLR4 TLR9 en monocitos humanos. Es claro que vitamina D inhibe la expresión de los TLR's, como parte de un mecanismo de retroalimentación para prevenir la excesiva activación de TLR e inflamación (Sadeghi et al 2006).

Por otra parte los niveles de vitamina D en el organismo regulan la producción de algunos péptidos antimicrobianos los cuales despliegan un amplio espectro de actividades antimicrobianas y han demostrado tener efectos antivirales (Daher et al 1986). Estos antibióticos endógenos destruyen directamente los microorganismos. Un ejemplo de estos es la catelicidina la cual es producida en monocitos humanos, neutrófilos y otras células humanas (Gombart et al 2005) y es inducida por la activación de los TLRs^{1/2}, activados por vitamina D (Liu et al 2009).

Debido a lo anterior algunos de los efectos antivirales de la vitamina D podrían ser

explicados por la expresión del péptido antimicrobiano catelicidina, la defensina humana B2 y probablemente la liberación de las especies reactivas de oxígeno. El efecto antibacteriano de la catelicidina está ligado a su habilidad para romper membranas bacterianas mediante interacciones electrostáticas (Bals et al 2003). Interacciones similares pueden ocurrir con los lípidos de la envoltura de los virus, además la catelicidina puede bloquear la entrada de los virus a la célula en una forma similar que la vista con otros péptidos antimicrobianos (Leikina et al 2005).

JUSTIFICACIÓN

En México el dengue es un problema importante de salud pública, debido principalmente al hecho de que su incidencia se ha incrementado en las últimas décadas a pesar de las múltiples intervenciones de promoción y prevención contra el vector realizadas en el país. Según datos del CENAPRECE en su publicación de la Semana Epidemiológica N° 44, hasta el 7 de noviembre de 2016 se han reportado 14 443 casos confirmados de Dengue con 11 defunciones.

En la actualidad no se dispone de un medicamento específico contra el dengue y su manejo ambulatorio se basa solo en medidas de mantenimiento como son el consumo de líquido y la administración de antipirético (paracetamol), así como la vigilancia de signos de alarma, como el dolor abdominal persistente, el vómito, las hemorragias, entre otros. El manejo intrahospitalario del paciente incluye la administración de líquidos endovenosos, vigilancia estrecha de la presión arterial y de la hemoconcentración y de ser necesario administración de hemoderivados, o manejo en unidad de cuidados intensivos (OMS. Dengue: Guías para el Diagnóstico, Tratamiento, Prevención y Control. Nueva edición. 2009).

La búsqueda de opciones terapéuticas específicas es actualmente un campo de interés de la investigación sobre dengue debido a que en áreas endémicas la elevada incidencia genera una carga importante para los servicios de salud. El impacto económico de la enfermedad incluye los costos directos de la atención de los casos y los costos indirectos ocasionados por la incapacidad de la etapa aguda de la enfermedad. Adicionalmente, el incremento de la frecuencia de casos graves hace necesario investigar alternativas de tratamiento que impacten en la reducción de éstos. Debido a que la mayoría de los casos de dengue no son graves (dengue sin signos de alarma o dengue con signos de alarma) y a que las complicaciones aparecen usualmente después del sexto día del inicio de la fiebre, encontrar opciones terapéuticas que sean de administración temprana y por vía oral sería una alternativa práctica, de fácil aplicación y de menor costo.

Por lo anterior, y teniendo en cuenta que la vitamina D inhibe la infección de diversos patógenos *in vitro*, incluyendo dengue, el estudiar los mecanismos a

través de los cuales vitamina D inhibe la infección por DENV permitirá entender su función antiviral y generar nuevas herramientas terapéuticas. La información obtenida podría predecir la eficacia del tratamiento, generando las bases para el control de una infección tan importante como lo es el dengue.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los mecanismos moleculares a través de los cuales la vitamina D, inhibe la infección por DENV en una línea celular monocítica.

Objetivos particulares.

1. Analizar la expresión de RNA mensajeros en respuesta a vitamina D.
2. Analizar el proceso de autofagia durante la infección por DENV *in vitro* en células U937 DCSIGN (macrófagos)
3. Analizar el efecto de vitamina D3 y de la autofagia durante la infección por DENV *in vitro* en células U937 DCSIGN.
4. Comprobar la producción de péptidos antimicrobianos durante la infección con DENV en células tratadas con vitamina D.

Diseño experimental

Objetivo 1: Analizar la expresión de RNA mensajeros en respuesta a vitamina D

Infección de células y tratamientos.

Aislamientos de RNAm PCR y preparación de librerías

Secuenciación masiva e identificación de RNAm

Análisis bioinformático de proteínas codificadas en los RNA mensajeros

Objetivo 2: Analizar el proceso de autofagia durante la infección por DENV in vitro en células UJ37 DCSIGN.

Cuantificación de la proteína LC3B en células infectadas con DENV

Cuantificación de la proteína SQSTM1/p62 en células infectadas con DENV

Determinación de porcentaje de infección en células infectadas y tratadas con inhibidores e inductores de autofagia

Objetivo 3: Analizar el proceso de autofagia durante la infección por DENV in vitro en células U937 DC SIGN tratadas con vitamina D

Cuantificación de la proteína LC3B en células infectadas con DENV y tratadas con vitamina D

Cuantificación de la proteína SQSTM1/p62 en células infectadas con DENV y tratadas con vitamina D

Determinación de porcentaje de infección en células tratadas inductor e inhibidores de autofagia en presencia de vitamina D

Determinación de porcentaje de infección en células tratadas con inhibidor de la fusión autofagosoma-lisosoma en presencia de vitamina D

Objetivo 4: Comprobar la producción de péptidos antimicrobianos durante la infección con DENV en células tratadas con vitamina D

Determinación de la expresión de Receptores tipo toll en células tratadas con vitamina D

Determinación de producción de catelicidina en células en tratamiento con vitamina D

MATERIAL Y MÉTODOS

Stock viral y líneas celulares

Para el presente proyecto se empleó la línea celular U937-DCSIGN amablemente donada por el Dr. Aravinda Da Silva de la Universidad de Carolina del Norte de E.U.A. Estas células son derivadas de la línea celular promonocítica U937, con la salvedad de que fueron transfectadas con el receptor DC-SIGN, lo cual las hace altamente susceptibles a la infección por DENV. Estas células al ser macrófagos secretan un gran número de citocinas y quimiocinas. Al igual que las células U937 al tratarlas con 12-miristato, 13-acetato de forbol (PMA) se diferencian a macrófagos, volviéndose adherentes, a la vez que exhiben características morfológicas similares a los macrófagos.

Las células se cultivaron en medio RPMI advanced suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (PAA, Ontario, Canada), 200 mM de L-glutamina, 200 mM de antibióticos (estreptomina ampicilina) y 2 % de bicarbonato de sodio (Sigma Aldrich).

La cepa viral usada en este estudio fue obtenida de un caso clínico detectado en 2008, denominada DENV-2 Yuc18500. El aislamiento se realizó a partir del suero de un paciente con diagnóstico de fiebre hemorrágica por dengue en el estado de Yucatán, en el Laboratorio de Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales "Hidemy Noguchi" de la Universidad Autónoma de Yucatán y fue una amable donación de la Dra. María Alba Loroño Pino.

Para la propagación, el DENV obtenido del aislado clínico se propagó en ratones neonatos cepa CD-1. Cada uno de los ratones neonatos de la camada fue inoculado en la región occipital con 10 µl de extracto de DENV, con una jeringa de insulina. Se sacrificaron los ratones, al presentar manifestaciones clínicas como temblores o parálisis y se extrajo el tejido cerebral mediante punción occipital con jeringa de 5 ml. Se colectaron los cerebros en un tubo eppendorf, se maceraron y posteriormente se diluyeron en un volumen de medio MEM. Se centrifugó el tubo eppendorf a 13,000 rpm 30 minutos a 4°C y se extrajo la primera fase la cual se colocó en tubos eppendorf. Posteriormente, se volvió a centrifugar a 13,000 rpm

15 minutos a 4°C. Se extrajo de igual forma la primera fase, la cual se filtró a través de 0.42 µm y posteriormente en uno de 0.20 µm. El extracto filtrado se repartió en alícuotas y se guardaron a -70°C hasta su uso (Gould et al 1991).

Titulación viral

Los títulos de DV fueron determinados por ensayos de placa en células BHK21 (Reyes del Valle et al 2005). Las células BHK fueron crecidas en medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y cuando alcanzaron una confluencia de 80 a 90% éstas se inocularon con diluciones de DENV 10⁻¹ a 10⁻⁸. Después de 2 horas de adsorción, se adicionó a la monocapa medio MEM con carboximetilcelulosa al 3% (Sigma), 0.5% de suero fetal bovino y 2mM de L-glutamina. Las placas fueron incubadas a 37°C por 6 días y posteriormente se fijaron con formaldehído al 10% y se tiñeron con naftol blueblack al 0.5% (Sigma). Se contó el número de placas en cada dilución y se determinó el título viral.

Infección de células y tratamiento

Se sembraron 1x 10⁶ células en una placa P100 y se realizó su diferenciación con una solución de phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) a una concentración final de 160 nM por tres días a 37°C. Posteriormente, las células se infectaron con DV-2 Yuc18500 a una MOI de 3 a 37°C por 2 horas. Después, se desechó el inoculo viral lavando dos veces con PBS. Para la inducción del proceso de autofagia las células fueron tratadas con 300 nM de rapamicina (CALBIOCHEM 553210) en medio completo, el cual fue adicionado cada 24 horas por 3 días. Para inhibir el proceso autofagia las células se trataron con 3 mM de 3 metiladenina (sigma Aldrich M9281) o wortmaninna (sigma Aldrich W1628) en medio completo cada 24 hrs por 3 días. Para inhibir el proceso de fusión de autofagosoma con el lisosoma, las células fueron tratadas con 30 mM de L-asparagina (sigma Aldrich A0884) en medio completo cada 24 hrs por 3 días. Por último, las células fueron tratadas con vitamina D cada 24 hrs por 3 días. Todos los experimentos se hicieron siguiendo el mismo proceso de infección y los esquemas de tratamiento para cada fármaco.

Aislamiento de RNA, PCR y preparación de librerías.

Los RNA mensajeros de las células no infectadas, infectadas y tratadas con

vitamina D3 fueron aislados usando el kit RNA easy (Quiagen, Germantown MD. USA) y cuantificado con un espectrofotómetro nanodrop 1000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). La integridad del RNA fue verificada usando Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent Tech Santa Clara CA, USA). Las librerías de secuencias de RNA de las muestras de RNA fueron obtenidas de un RNA total usando el kit Illumina® Truseq RNA simple preparation. (Illumina, San Diego CA, USA). Estas librerías fueron secuenciadas usando un Genome Analyzer GAIIx II (Illumina) en el Instituto de Biotecnología-UNAM (Cuernavaca Morelos, México). Para confirmar los cambios en los niveles de RNAs mensajeros entre las diferentes condiciones, se realizó PCR en punto final. La síntesis de cDNA se realizó con un kit usando un Transcriptasa reversa Improm II (Promega). En la parte de abajo se describen los primers usados para llevar a cabo la reacción de PCR con una Taq polimerasa (Invitrogen)

	Genes (primers)		
	mTOR	NOD2	TNFalpha
F	TCCGAGAGAT GAGTCAAGAGG	TGCGGACTCT ACTCTTTGAGC	CACGCTCTTC TGTCTACT GA
R	CACCTTCCAC TCCTATGAGGC	CCGTGAACCT GAACTTGAAC	ATCTGAGTGT GAGGGTCTGG

Análisis de la red de proteínas.

Se realizó un análisis de interacciones proteína-proteína, mediante el programa STRING (string-db.org). Este análisis nos permitió identificar las proteínas relacionadas, así como los procesos biológicos y los componentes celulares en los que participan las proteínas involucradas. La red se presentó de tal forma que las asociaciones más fuertes fueron representadas por líneas más gruesas y viceversa y donde las proteínas fueron representadas como nodos

Análisis por Western blot

Los extractos celulares fueron tratados con el buffer de lisis RSB-NP40 (1.5 mM MgCl₂, Tris-HCl pH 7.5 10 mM, 10 mM NaCl, 1% IGEPAL) en presencia de un coctel de inhibidores de proteasas (roche). Un total de 35 µg/ml de los extractos totales fueron separados por electroforesis en SDS-PAGE y transferidos a una membrana de nitrocelulosa (BioRad). Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas en PBS triton X-100 con 10% de leche baja en grasa. La presencia de las dos formas de la proteína LC3 usada para el seguimiento de autofagia fue detectada usando un anticuerpo primario policlonal hecho en conejo anti LC3 (Sigma Aldrich L7543) y un anticuerpo anti conejo acoplado a HRP como anticuerpo secundario. La proteína SQSTM1/p62 fue detectada usando el anticuerpo monoclonal anti SQSTM1/p62 (1 µg/ ml, ABCAM ab56416) y la proteína hCPA18/LL-37 usando el anticuerpo monoclonal sc130552 (1:500, Santa Cruz Biotechnology) ambos hechos en ratón. Adicionalmente, el anticuerpo anti actina hecho en ratón fue usado como control de carga. Las proteínas fueron reveladas usando el Super Signal West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

Citometría de flujo para detección de autofagia e infección viral

Las células U937-DCSIGN fueron tratadas como se indicó anteriormente y fueron analizadas mediante citometría de flujo para determinar la cantidad de LC3II (Eng et al., 2010). Las células fueron resuspendidas en PBS con 0.05% de saponina y a continuación fueron incubadas con el anticuerpo primario anti LC3B hecho en conejo (Sigma Aldrch L7534) por 20 minutos. Posteriormente, las células se incubaron con un anticuerpo secundario anti conejo conjugado con Alexa 488. (Life technologies A21206) por 20 minutos más. Posterior a la incubación se hicieron lavados con PBS. Se usó un equipo BD LSR Fortessa para el análisis de los datos, contando un mínimo de 30,000 células y el análisis de los datos se realizó mediante el software Cyflogic.

Cuantificación de la infección

Las células se fijaron con formaldehído 1% y se permeabilizaron y bloquearon con

solución permeabilizadora (PBS1x saponina 0.1% con SFB 1%). A continuación se incubaron por 2 hrs a temperatura ambiente con un anticuerpo monoclonal anti E (4G2) para teñir la proteína viral. Como anticuerpo secundario se usó un anti-raton acoplado a Alexa 488 (Lide Technologies A11029). Se usó un equipo BD LSR Fortessa para el análisis de los datos, contando un mínimo de 30,000 células y el análisis de los datos se realizó mediante el software Cyflogic.

Cuantificación de progenie viral

Los sobrenadantes de células infectadas y tratadas fueron analizados para determinar la progenie viral por medio del ensayo de unidades formadoras de focos. Al alcanzar confluencia la monocapa de células VERO en placas de 96 pozos fueron inoculadas con diluciones seriales de sobrenadante de células infectadas con DENV2 (volumen final 50 μ L) por 1 hr a 37°C para permitir la adsorción viral. Después se removió el inóculo y se adicionaron 200 μ l de medio completo a la monocapa de células, lavadas previamente con solución Hanks. El medio fue retirado 48 hpi, se fijaron con formaldehído 1% y se permeabilizaron por 20 minutos con solución permeabilizadora (PBS 1x, 0.1% saponina y 1% SFB). A continuación se incubó con anticuerpo anti E (4G2) y con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488. La progenie viral fue determinada mediante la observación de focos en microscopio de fluorescencia y expresada como Unidades formadoras de focos. (FFU) /mL.

Microscopía electrónica de transmisión.

Las células infectadas y tratadas como se describió anteriormente fueron fijadas por 60 minutos con glutaraldehído 2.5% en buffer cacodilato de sodio 0.1 M, pH7.2, después se adicionó tetraóxido de osmio en el mismo buffer por 60 minutos. Las muestras se deshidrataron incrementando las concentraciones de etanol y después fueron tratadas con óxido de propileno. Se realizó la inclusión de las muestras en resina polybed epoxy y se polimerizaron a 60 °C por 24 h. Los cortes semifinos de casi 60 nm fueron contrastados con acetato de uranilo y analizados en el microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011. (Jeol Ltd., Tokio Japón) (Chavez-Munguia., 2003).

RESULTADOS

La transcripción de los RNAm relacionados con la vía de la autofagia se inducen por vitamina D.

El primer paso en la determinación de los mecanismos celulares inducidos por vitamina D3 para inhibir la infección por DENV fue analizar los RNAm que se producen en respuesta al tratamiento con vitamina D3. Así, las células U937 DCSIGN se infectaron con DENV2 y fueron tratadas con vitamina D3 como se describió anteriormente. Para confirmar el efecto de la vitamina D3 sobre las células, se midieron los niveles de expresión de TLR4 y TLR2 en la superficie celular. Como era de esperarse, en las células tratadas con vitamina D3 pudimos comprobar una reducción significativa de la expresión de TLR2 y TLR4 en la superficie celular U937 SIGN-DC mediante citometría de flujo (Tabla 1).

Receptor tipo toll	% de reducción en la expresión de TLR	Análisis estadístico (ANOVA)
TLR2	20.6±2.5	P< 0.001
TLR4	12.9±4.5	P<0.001

Tabla 1. Cuantificación de la expresión de TLR 2 y TLR 4 dependiente del tratamiento de vitamina D en células U937-DCSIGN. Los datos representan el porcentaje de reducción obtenido con 5 μ M de vitamina D.

Una vez comprobado el efecto de vitamina D3 sobre estas dos moléculas, se identificaron aquellos RNA mensajeros diferencialmente expresados en presencia de la vitamina D3 mediante un ensayo de secuenciación masiva. El análisis bioinformático de los datos obtenidos nos permitió determinar que si bien varias vías celulares son moduladas por vitamina D3 (datos no mostrados), la vía con los cambios más significativos en niveles de expresión de RNA mensajeros fue la autofagia. (Tabla 2).

Biological Process (GO)			
<i>pathway ID</i>	<i>pathway description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
GO:0000045	autophagosome assembly	15	9.2e-34
GO:0016236	macroautophagy	16	2.37e-33
GO:0031669	cellular response to nutrient levels	18	4.91e-32
GO:0006914	autophagy	17	4.22e-31
GO:0009267	cellular response to starvation	17	5.82e-31

Cellular Component (GO)			
<i>pathway ID</i>	<i>pathway description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
GO:0000407	pre-autophagosomal structure	11	1.73e-23
GO:0034045	pre-autophagosomal structure membrane	6	1.55e-12
GO:0005776	autophagosome	6	1.01e-08
GO:0000421	autophagosome membrane	4	3.2e-06
GO:0098805	whole membrane	12	3.2e-06

KEGG Pathways			
<i>pathway ID</i>	<i>pathway description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
04140	Regulation of autophagy	13	1.02e-29

Tabla 2. Análisis de los mensajeros inducidos por vitamina D. Los RNAs mensajeros encontrados codifican para para proteínas involucradas en el ensamblaje de autofagosomas, macroautofagia, autofagia y estas proteínas tienen localizaciones específicas dentro de las estructuras autofagosomales y membranas autofágicas relacionadas. Tomada del análisis hecho en el programa STRING:

Interesantemente, la mayoría de los RNA mensajeros encontrados en esta vía aumentaron su expresión en presencia de vitamina D3 y la disminuyeron en las células infectadas con DENV. Para confirmar la estrecha interacción de estos genes en la vía de autofagia se realizó un interactoma (Figura 8). Como podemos observar, todas las proteínas resultantes de los genes identificados interactúan entre sí y son parte de la vía de autofagia.

Vitamina D3 modula expresión del ARN mensajero de proteínas relacionadas con autofagia.

Para corroborar el cambio en los niveles de expresión de algunos de los RNA mensajeros identificados mediante los ensayos de secuenciación masiva se realizó un ensayo de RT-PCR de algunos de ellos como mTOR, NOD2 y TNF alfa. Así pudimos confirmar que el tratamiento con vitamina D3 reduce la expresión de los tres genes (Figura 9). En conclusión el tratamiento de células macrófagos con vitamina D3 regula la expresión de varios RNAs involucrados en la vía de autofagia.

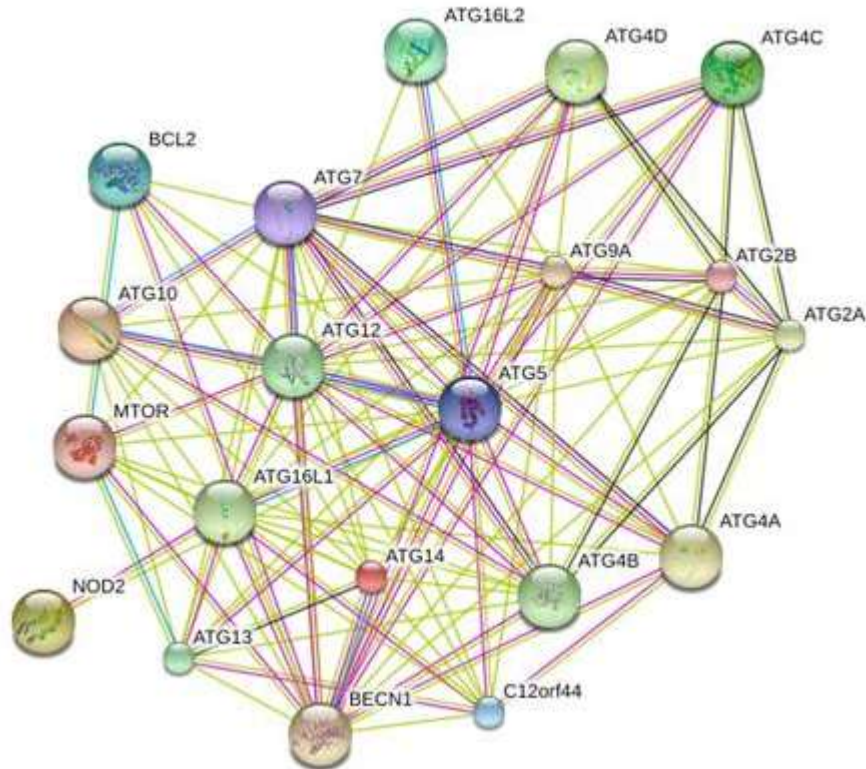


Figura 8. Análisis de la interacción de proteínas codificadas en los genes inducidos por Vitamina D3. La red de 22 RNAs mensajeros codifica para proteínas cuya expresión se modificó después del tratamiento con Vitamina D3 en células infectadas con el virus Dengue. La red se diseñó en el programa STRING versión 9.05. Cada línea representa un tipo de interacción distinta descrita en la literatura.

Vitamina D3 induce autofagia en las células U937 DCSIGN.

Debido a que los estudios de transcriptómica apuntaban a la inducción de autofagia en las células tratadas con vitamina D3, decidimos analizar este proceso. Para ello, se siguió la expresión de la proteína LC3 la cual está involucrada en la vía de autofagia. Un incremento en la cantidad de ésta proteína, correlaciona con un aumento en el número de autofagosomas, por lo que es considerada un buen indicador de la formación de autofagosomas (Klionsky et al., 2016). En un ensayo de Western-blot, el anticuerpo detecta dos bandas: LC3I, que es la forma citosólica de la proteína y otra que corresponde a LC3II, que es la forma conjugada de la proteína con fosfatidiletalonamida (PE) la cual está presente en autofagosomas (Klionsky et al., 2016).

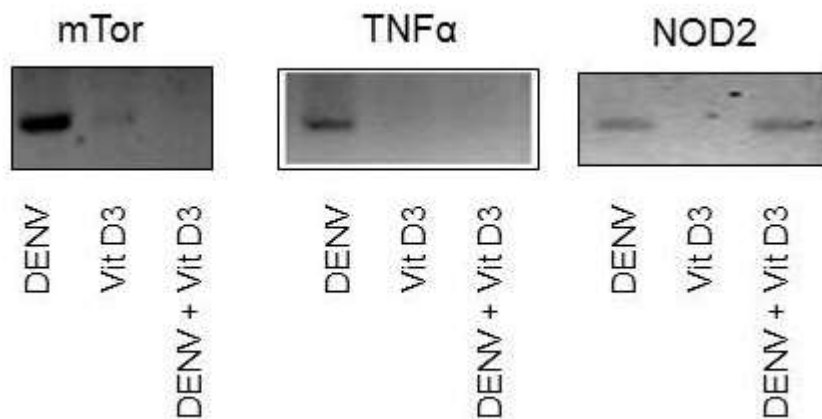


Figura 9. Vitamina D incrementa la expresión RNAs mensajeros que codifican para proteínas relacionadas con la vía de autofagia. El RNA extraído de células U937 DCSIG infectadas con DENV (DENV), tratadas con 5 μ M de vitamina D (VitD3) y células infectadas con DENV y tratadas con 5 μ M de vitamina D3 (DENV + VitD3) se sometió a RT-PCR en presencia de oligonucleótidos específicos para amplificar mTOR, TNF alfa y NOD2.

Aunque el peso molecular de LC3II es mayor que LC3I, debido a la adición de PE, LC3II migra más rápido que LC3I en SDS-PAGE, probablemente debido a su extrema hidrofobicidad. LC3I generalmente se detecta en un peso molecular de 16 kDa, mientras que LC3II en aproximadamente 14 kDa. El análisis por Western-blot reveló que la adición de vitamina d3 indujo un aumento en los niveles de expresión de LC3II confirmando que la vitamina D3 es un potente inductor de autofagia. Por otro lado en la infección por DENV también se induce un aumento en los niveles de expresión de LC3II sin embargo este fue menor en comparación con las células tratadas con vitamina D3.

Como controles positivo y negativo, se usó el inductor de autofagia, rapamicina (Rap) y el inhibidor 3-metiladenina (3MA), como se esperaba se observó un aumento en los niveles de expresión de LC3II en presencia de rapamicina y una reducción significativa en las células tratadas con 3MA. (Figura 10A). El tratamiento de células con los dos moduladores del proceso de autofagia no alteró la viabilidad celular (Figura 11),

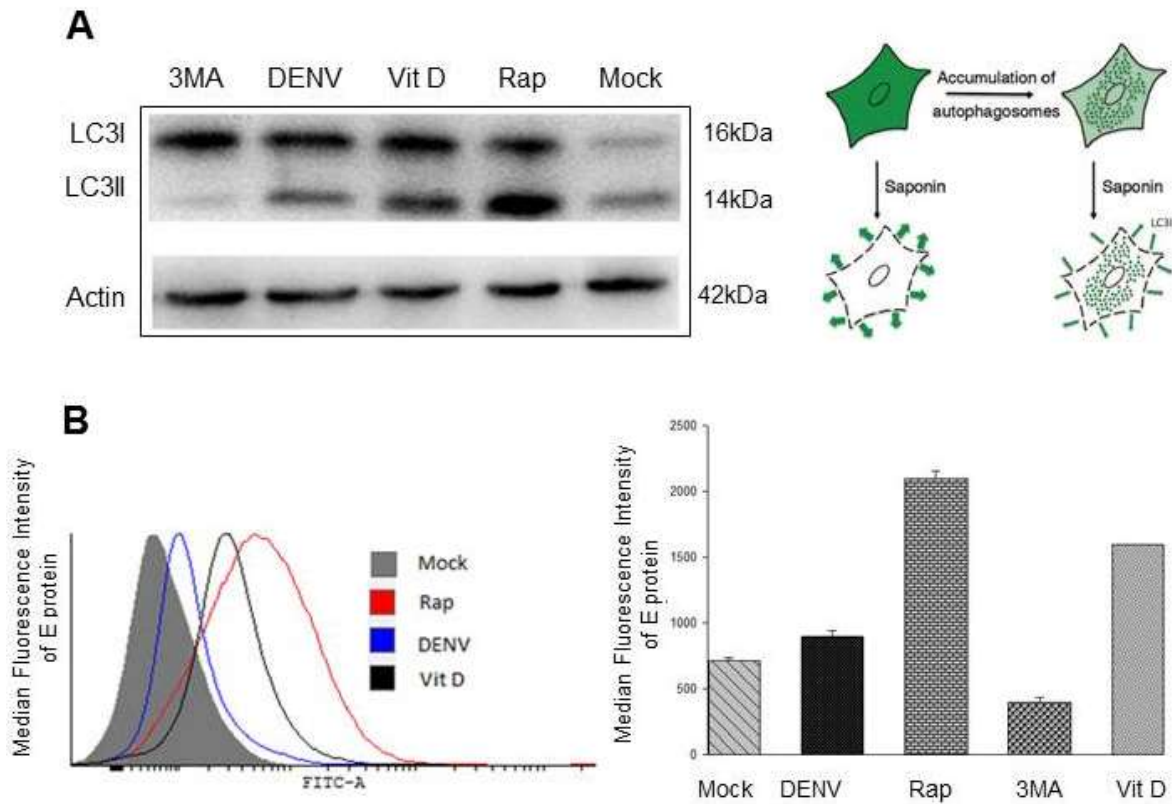


Figura 10. Vitamina D induce autofagia en células U937 DC SIGN. A) Extractos proteicos totales de células U937 DCSIGN tratadas con 3mM de 3 metiladenina (3MA), 5 μ M de vitamina D3 (vit D), 300nM de rapamicina (Rap) o infectadas con virus Dengue (DENV) a una MOI de 3 se usaron para analizar la presencia de la dos formas de la proteína LC3.. Se uso un anticuerpo anti actina como control de carga. Se muestra un Western blot representativo. B) La expresión de LC3II se evaluó por citometría de flujo. Después de la permeabilización de las células tratadas con saponina, estas fueron incubadas con un anticuerpo anti LC3 y un anticuerpo unido a FITC. Los histogramas indican la intensidad de fluorescencia media y son representativos de tres experimentos diferentes.

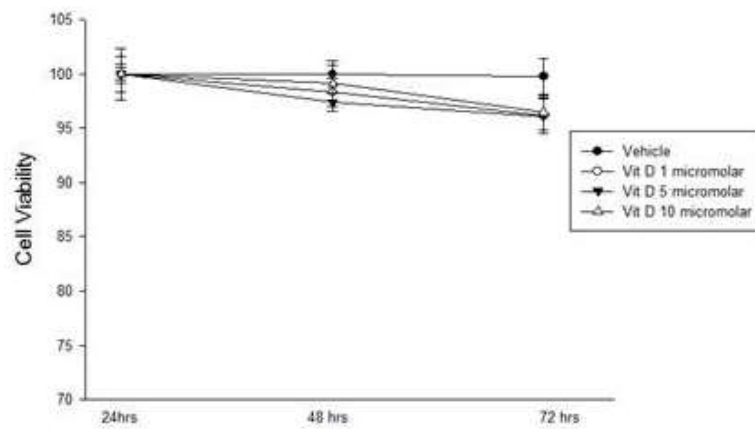
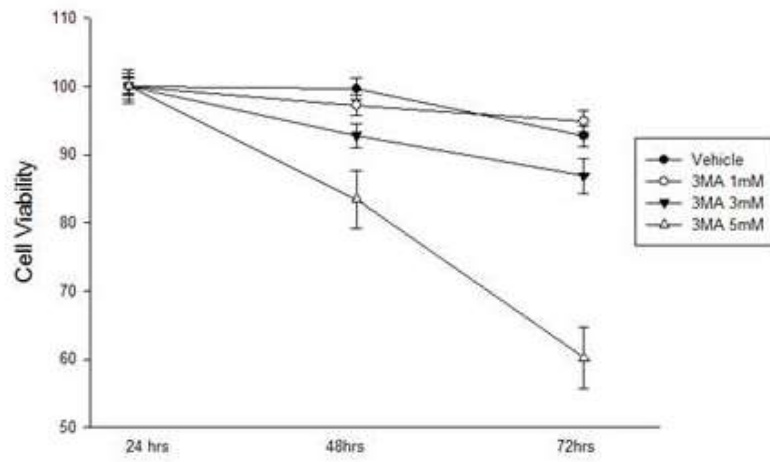
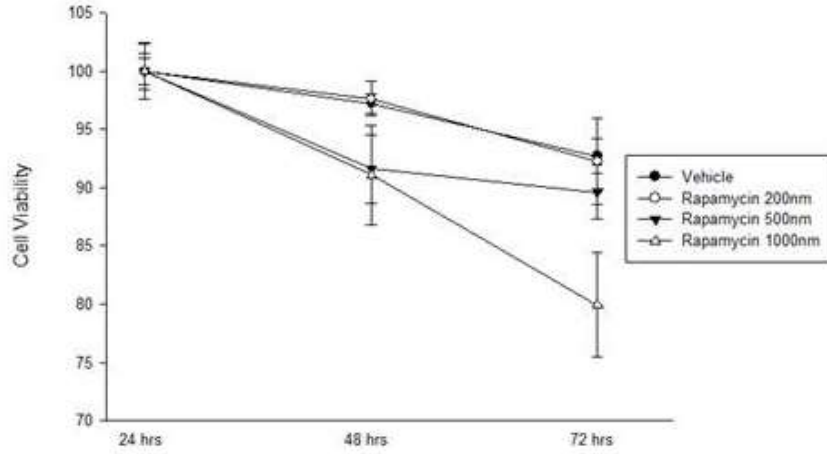


Figura 11. Viabilidad celular en presencia de rapamicina, 3 metiladenina y vitamina D3. El ensayo de viabilidad se realizó mediante citometria de flujo. Las células fueron teñidas con yoduro de propidio.

Otra manera de corroborar la inducción de autofagia por vitamina D3 en células U937 DC-SIGN fue por la presencia de LC3II mediante un ensayo de citometría de flujo (Eng et al., 2010). Aunque las dos formas de LC3 están presentes en las células, sólo la forma LC3II se asocia a las membranas, por lo tanto, la incubación de las células con saponina provoca la salida de LC3I de la célula permitiendo la detección de la forma LC3II, la cual está asociada a autofagosomas. Al igual que en el ensayo de Western-blot, la cantidad de células positivas para LC3II aumenta en presencia de la vitamina D3. Como se esperaba la cantidad de células positivas LC3II también aumentó en presencia de rapamicina y se redujo en presencia de 3MA (Figura 10B). Los resultados obtenidos a partir de tres experimentos independientes indican que existen diferencias significativas en la cantidad de células positivas para LC3II entre las células tratadas con Vitamina D3 y las no tratadas, confirmando que vitamina D3 induce autofagia en macrófagos humanos.

Vitamina D3 induce el flujo autofágico completo.

Para verificar que la vitamina D3 es capaz de inducir el flujo autofágico completo, analizamos mediante ensayo de Western blot la degradación de la proteína SQSTM1/p62. La proteína SQSTM1/p62 es degradada en el lisosoma después de la inducción de autofagia y de la fusión con lisosomas. Debido a esto, la ausencia de esta proteína indica la inducción del flujo autofágico completo. Se detectó una cantidad similar de SQSTM1 / p62 en las células no infectadas e infectadas por DENV, sin embargo, se observó una degradación completa de SQSTM1 / p62 en las células tratadas con vitamina D3, confirmando que la vitamina D3 induce el flujo autofágico completo que lleva a la degradación de p62.

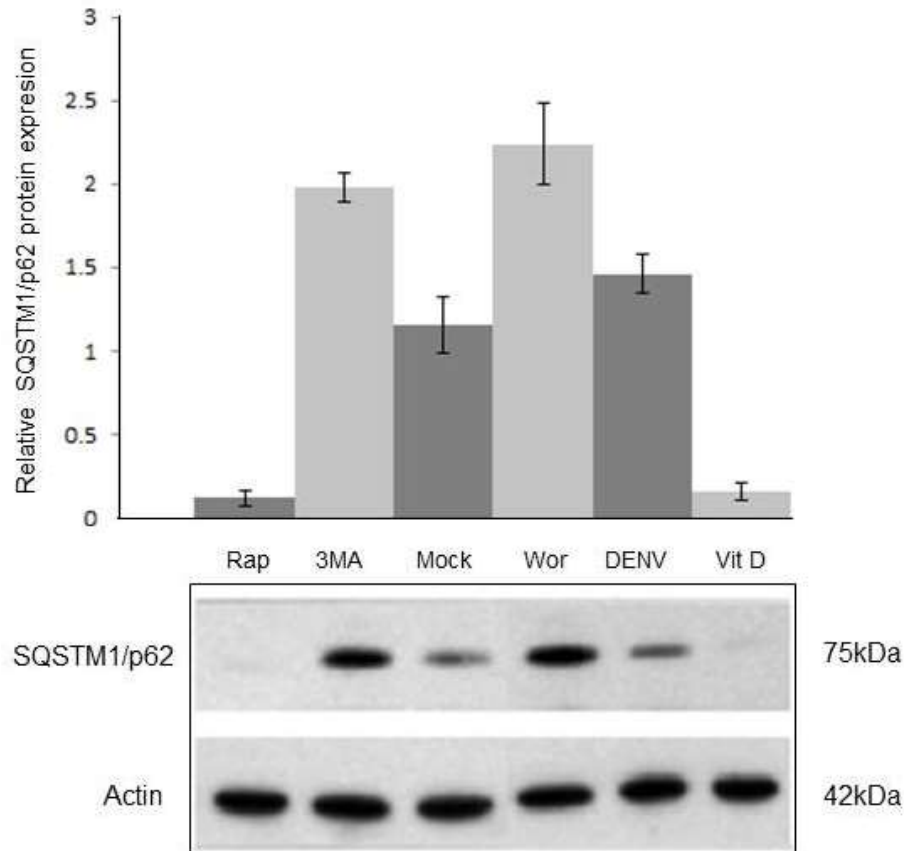


Figura 12. Vitamina D induce flujo autofagico completo en células U937DCSIGN. Las células U937 fueron tratadas con 3mM de 3 metiladenina, o 300nM de rapamicina o 5µM de vitamina D o infectadas con Virus Dengue a una MOI de 3. Se cuantificaron los niveles de expresión de SQSTM1/p62 mediante un ensayo de western blot. Se usó un anticuerpo anti actina como control de carga. Se muestra un ensayo representativo así como el análisis densitometrico de tres ensayos independientes *P< 0.05

Al igual que la vitamina D la rapamicina causó la degradación completa de SQSTM1/p62, mientras que en la presencia de 3MA y wortmanina, inhibidores de autofagia, se observaron niveles más altos de SQSTM/p62. Los resultados obtenidos a partir de tres experimentos independientes indican que existen diferencias significativas en la cantidad de SQSTM1/p62 entre las células tratadas con vitamina D3 y las no tratadas (Figura 12).

El efecto inhibitorio en la infección por DENV inducida por la vitamina D3 sólo es parcialmente debido al proceso de autofagia.

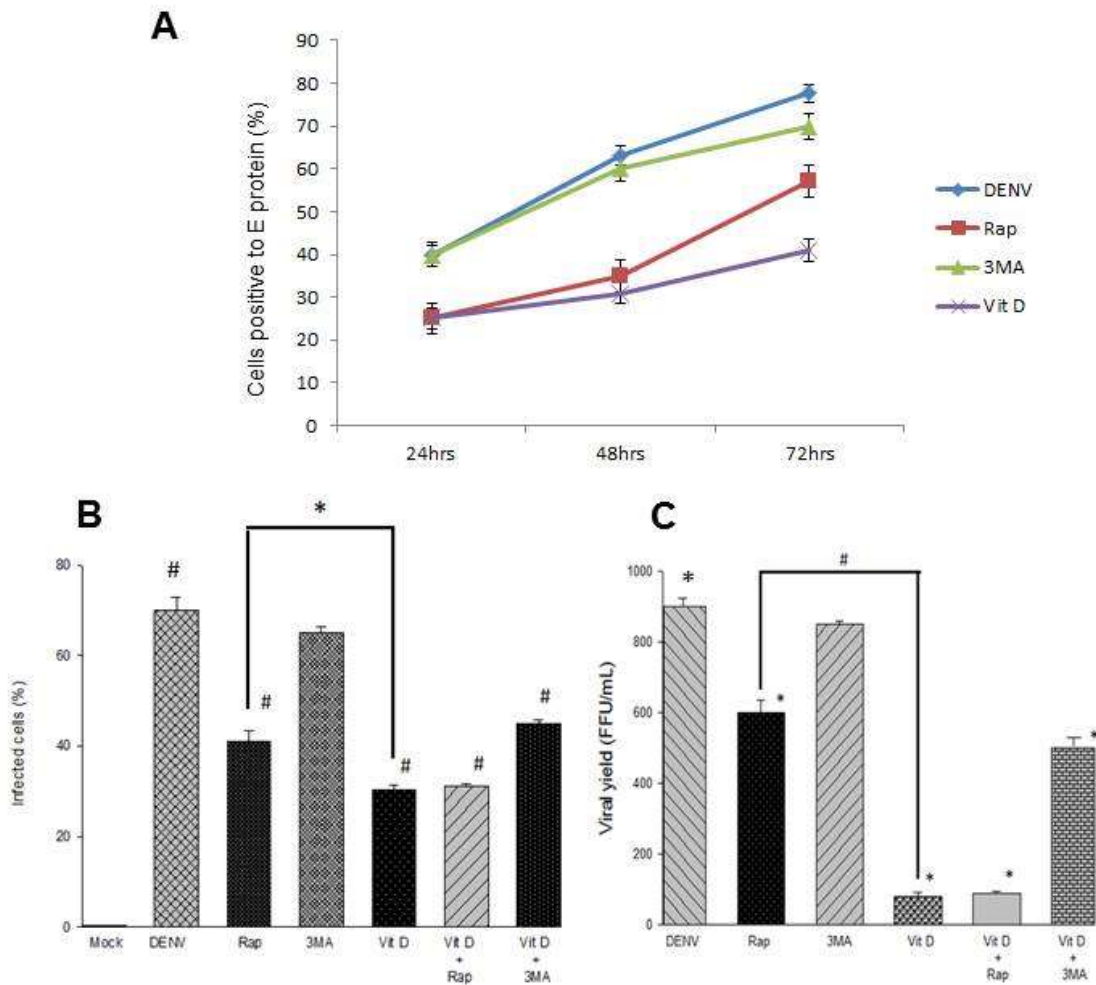


Figura 13. El efecto inhibitorio en la infección por DENV inducido por vitamina D3 es solo parcialmente debido al proceso de autofagia. A) Células U937 DCSIGN fueron infectadas con una MOI de 3 y tratadas con **vehículo**, 3 mM de 3 metiladenina (3MA), 5 μ M de vitamina D3 (Vit D) o 300 nM de rapamicina (Rap) por 24, 48 y 72 hrs. Posteriormente, las células fueron incubadas con el anticuerpo 4G2 (anti E) y con un anticuerpo secundario acoplado a FITC. El porcentaje de infección fue determinado mediante citometría de flujo. B) Porcentaje de infección de células U937 DC SIGN infectadas con DENV y tratadas con el vehículo de los fármacos, 300nM de rapamicina (Rap), 3mM de 3 metiladenina (3MA), 5 μ M de vitamina D3 (Vit D) solas y posteriormente con el inductor de autofagia y el inhibidor (3MA) en presencia de vitamina D3. C) Ensayo de cuantificación de progenie viral por ensayo de unidades formadoras de focos. Células tratadas en condiciones anteriormente descritas. El porcentaje de células infectadas o los valores de la progenie viral expresada como FFU/ml fueron obtenidos de tres ensayos independientes. * $p < 0.05$

Para analizar el efecto del tratamiento con vitamina D3 en la infección por DENV, las células U937-DC-SIGN se infectaron con DENV y fueron tratadas con vitamina D3 o rapamicina (Rap) o 3-metiladenina (3MA) como se describió anteriormente. La cantidad de células infectadas se determinó por citometría de flujo a las 24, 48 y 72 horas post infección. A las 24 horas, hubo una reducción significativa en la cantidad de células infectadas tratadas con vitamina D3 y con rapamicina en comparación con las células no tratadas o con las células tratadas con 3-MA (25 vs 40%). Esta inhibición significativa en la cantidad de células infectadas también se observó a las 48 (30 vs 62%) y 72 horas (36 vs. 78%) en presencia de vitamina D3, lo que indica que la vitamina D3 inhibe la infección por DENV. Sin embargo, aunque la rapamicina indujo una reducción similar a vitamina D3 en la cantidad de células infectadas a las 24 horas post-infección, esta inhibición a 48 (30 vs 62% para la vitamina D y 35% vs 62 para la rapamicina) y a las 72 horas (36 vs 78% para la vitamina D en comparación con 55 vs 78% para la rapamicina) fue menor en las células tratadas con rapamicina en comparación con las células tratadas vitamina D3 (Figura 13A).

La cantidad de células infectadas en presencia de 3MA fue similar a la cantidad observada en células no tratadas. Todos estos resultados indican que la vitamina D3 es mejor inhibidor de la infección por DENV que la rapamicina.

Para analizar la contribución del proceso de autofagia en la inhibición de la infección por DENV inducida por vitamina D3, las células U937-DC-SIGN se infectaron con DENV, se trataron de la forma antes descrita y además usando tratamientos con vitamina D3 y rapamicina y con vitamina D3 y 3MA y se cuantificó la infección a las 72 hrs por citometría de flujo.

Como se observó antes, la vitamina D3 indujo una inhibición aún más significativa de la cantidad de células infectadas en comparación con el tratamiento con rapamicina (71 vs 30% en comparación con 70 vs 41%), sin embargo, la incubación con ambos fármacos, (vitamina D3 y rapamicina) no generó un efecto sinérgico en la inhibición de la cantidad de células infectadas en comparación con cada uno de los fármacos por separado (71 vs 31% en comparación con el 71 vs

30% respectivamente). En contraste, la incubación con la vitamina D3 y con el inhibidor de autofagia 3MA causó un aumento en la cantidad de células infectadas (30 a 48%), sin embargo, la cantidad de células infectadas no alcanzó los niveles observados en las células no tratadas o en las células tratadas con 3MA solo (71 o 65%, respectivamente), sugiriendo que la autofagia no es el único proceso antiviral inducido por la vitamina D3 (Figura 13B).

Para confirmar estos resultados, decidimos evaluar la cantidad de progenie viral mediante un ensayo de unidades formadoras de focos, en el sobrenadante de las células infectadas con DENV y tratadas con los diferentes compuestos como en el experimento anterior. (Figura 13C) En este caso, se observó una mayor reducción en la progenie viral en células tratadas con vitamina D3 en comparación con las células tratadas con rapamicina (903 vs 589 FFU/ml en comparación con 903 vs 89 FFU / ml). Como se observó anteriormente, la incubación con vitamina D3 y rapamicina al mismo tiempo no indujo una inhibición mayor en la producción de progenie viral en comparación con las células tratadas solamente con vitamina D3 (89 vs 96 FFU / ml). En contraste, la incubación con la vitamina D3 y 3MA provocó un aumento en la progenie viral (89-512 FFU / ml), sin embargo el número de focos no alcanzó los niveles observados en las células no tratadas o en las células tratadas con 3MA (512 vs 903 o 830 FFU / ml) (Figura 13C). Estos resultados apoyan la idea de que la autofagia es sólo uno de los mecanismos implicados en la inhibición de la infección DENV inducida tratamiento con vitamina D3, ya que al inhibir la autofagia se recupera solo parcialmente los niveles de infección.

La inhibición de la infección por DENV inducida por la vitamina D3 requiere enzimas lisosomales.

El último paso en el proceso de autofagia es la degradación de los componentes atrapados en los autofagolisosomas después de la fusión entre autofagosoma y lisosoma. Para analizar la importancia de la actividad lisosomal en la inhibición de la infección por DENV inducida por la vitamina D3 se usó L-asparagina (L-ASN), el cual es un inhibidor de la fusión autofagosoma-lisosoma (Panyasrivanit et al., 2011). Después de confirmar que el tratamiento con células L-ASN no alteraba la

viabilidad celular (Figura 14), el efecto del inhibidor fue probado en células infectadas tratadas vitamina D3. Como se observó anteriormente, en las células tratadas con rapamicina y vitamina D3 se redujo la cantidad de células infectadas (62-46% o 62-29%, respectivamente).

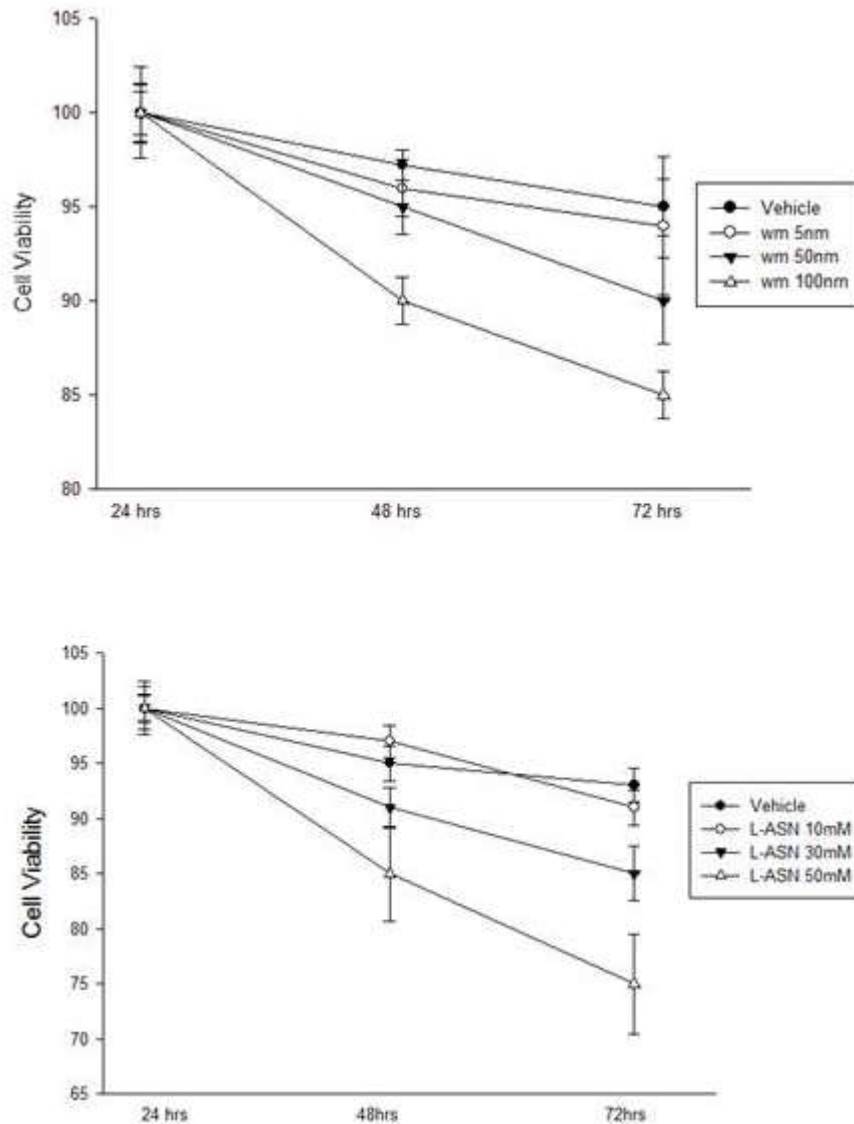


Figura 14. Viabilidad celular de wortmaninna y L-asparagina. El ensayo de viabilidad se realizó mediante citometria de flujo. Las células fueron teñidas con ioduro de propidio.

Esta reducción en la cantidad de células infectadas se revirtió casi completamente

en el caso de las células tratadas con rapamicina cuando estas se incubaron con L-ASN (46-53%).

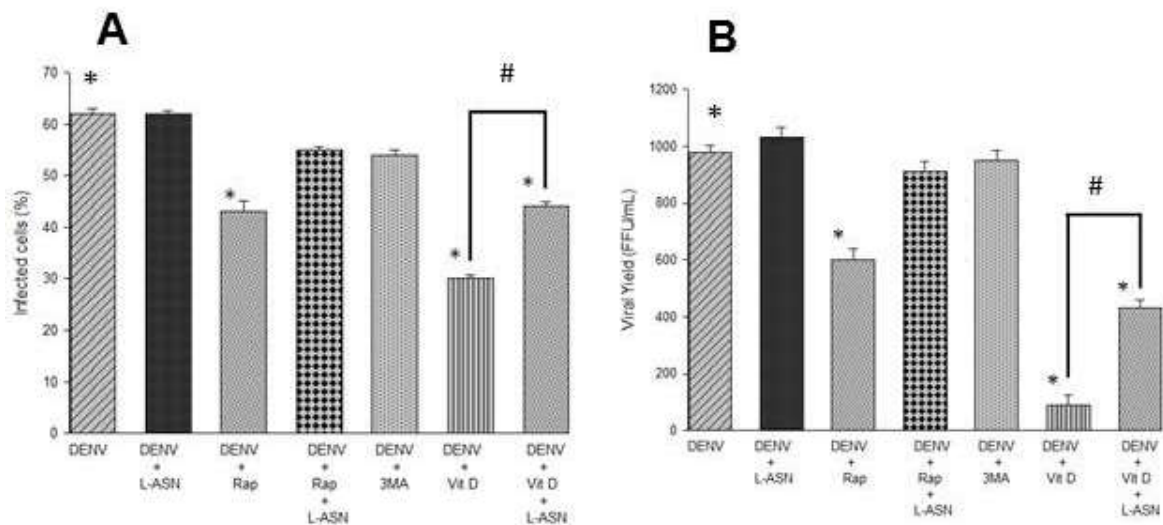


Figura 15. **La inhibición de la infección inducida por vitamina D requiere enzimas lisosomales.** Células u937 fueron infectadas con virus Dengue a una MOI 3 y tratadas 3 metiladenina o Rapamicina o vitamina D o con el L- asparagina solo o en combinación con rapamicina o en combinación con vitamina D por 72 hrs. La infección viral fue determinada por A) citometría de flujo y por B) ensayo de unidades formadoras de focos. En ambos casos se usó el anticuerpo 4g2 antiE unido a un anticuerpo secundario acoplado a FITC. El porcentaje de células infectadas o los valores de la progenie viral expresada como FFU/ml fueron obtenidos de tres ensayos independientes. *p<0.05

Sin embargo, para el caso de células tratadas con vitamina D3 y L- ASN el efecto antiviral inducido por vitamina D3 solo se recuperó parcialmente, (del 29 al 44%) (Figura 15A). Resultados similares fueron observados al medir progenie viral en los sobrenadantes con las células de experimento anterior, en donde el tratamiento de rapamicina causó una reducción en la progenie viral (980-582 FFU / ml), que se recuperó en la presencia de L-ASN (580-926 FFU / ml), mientras que la inhibición inducida por la vitamina D3 (980-67 FFU / ml) se recuperó sólo parcialmente por la L-ASN (67-427 FFU / ml).

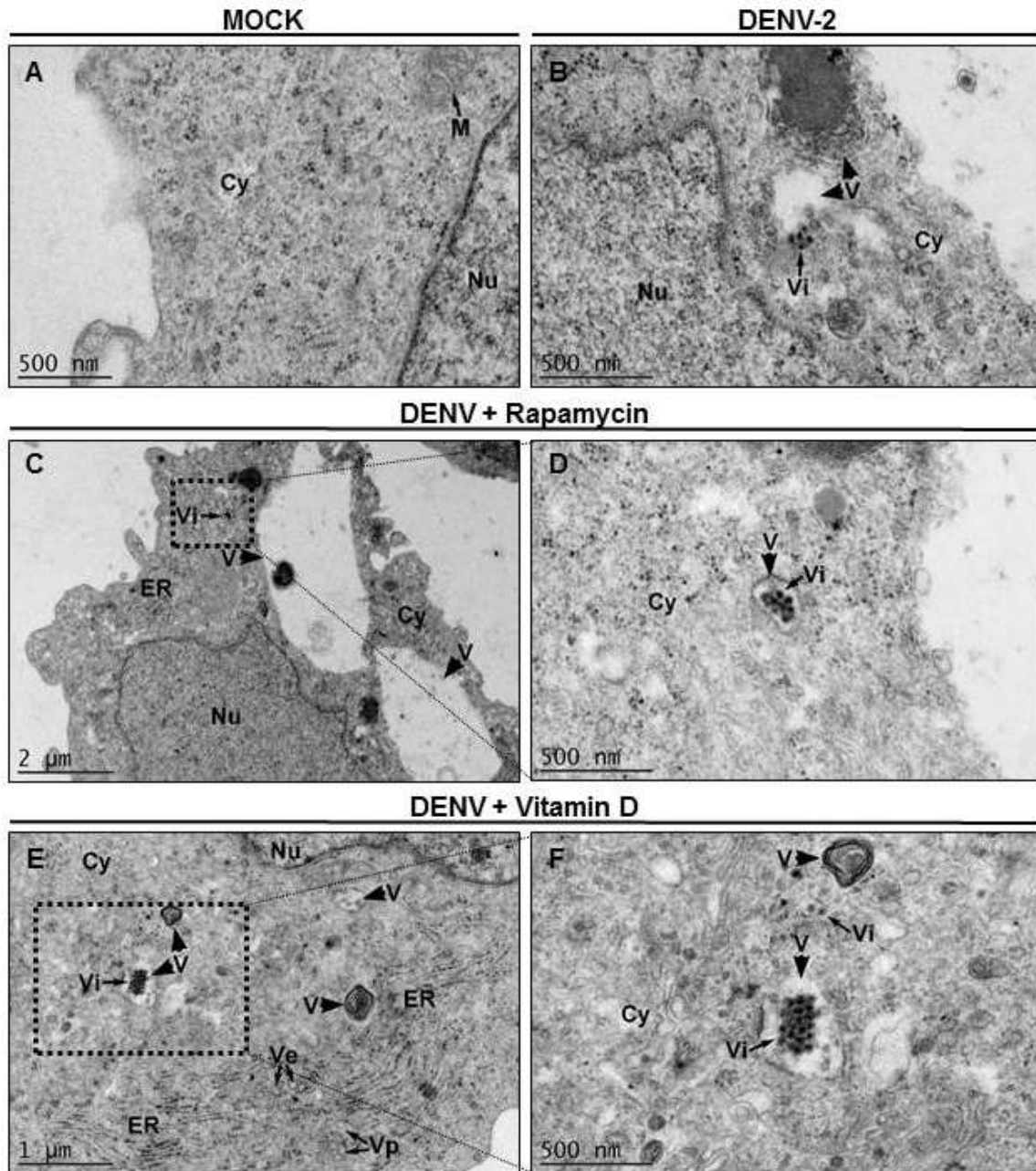


Figura 16 La vitamina D3 induce la formación de vesículas similares a autofagosomas y estas vesículas atrapan partículas virales. Células U937 DC SIGN fueron infectadas a una MOI de 3 y tratadas con vehiculo o 5μM de vitamina D3 o 300 nm de rapamicina por 24 hrs y fueron analizadas a través de microscopía electrónica de transmisión. Las flechas anchas señalan las vesículas con características de autofagosomas. Las flechas delgadas señalan la presencia de partículas virales. Cy: citoplasma, M: mitocondria; Nu: nucleo; ER: retículo endoplasmico V: vesículas autofagosoma-like; Ve: vesículas de doble membrana; Vp: paquetes membranosos; Vi: partículas virales -like

Esto apoya la conclusión de que el último paso en el proceso de autofagia, la fusión de lisosomas-autofagosomas, es uno de los mecanismos inducidos por la vitamina D3 involucrados en la inhibición de la infección DENV (Figura 15B) y que la autofagia es solo uno de los mecanismos a través de los cuales vitamina D3 inhibe la infección por DENV.

La vitamina D3 induce formación de vesículas tipo autofagosoma y estas vesículas engullen partículas similares a virus.

Para analizar el proceso de autofagia inducido por la vitamina D3 en las células infectadas con DENV, se realizó un análisis de microscopía electrónica de transmisión. La presencia de partículas de tipo viral cercanas al retículo endoplásmico se observó claramente en células infectadas con DENV (Figura 16B).

En presencia de rapamicina, se observaron estructuras de doble membrana compatibles con autofagosomas (Figura 16C y 16D) y se observaron partículas similares a virus dentro de estas membranas. Sin embargo, en las células tratadas con vitamina D3 se detectó una mayor cantidad de partículas similares a virus en los compartimentos con doble membrana (Figura 16E), lo que sugiere que el tratamiento con vitamina D3 y rapamicina inducen vesículas tipo autofagosoma capaces de atrapar viriones.

El tratamiento con vitamina D3 induce la producción de catelicidina

Debido a que nuestros estudios de autofagia sugerían que vitamina D3 estaba induciendo algún proceso adicional a la autofagia que era capaz de inhibir la infección por DENV aún más que la rapamicina, decidimos explorar la producción de péptidos antimicrobianos. Para ello, decidimos medir la expresión de catelicidina mediante Western blot usando un anticuerpo que detecta la presencia de hCap18 / LL37. En las células tratadas con vitamina D3 se observó la síntesis de hCAP18 / LL-37 de una manera dependiente de concentración (figura 17A), apoyando la idea de que vitamina D3 estaba induciendo mecanismos adicionales capaces de inhibir la infección con DENV.

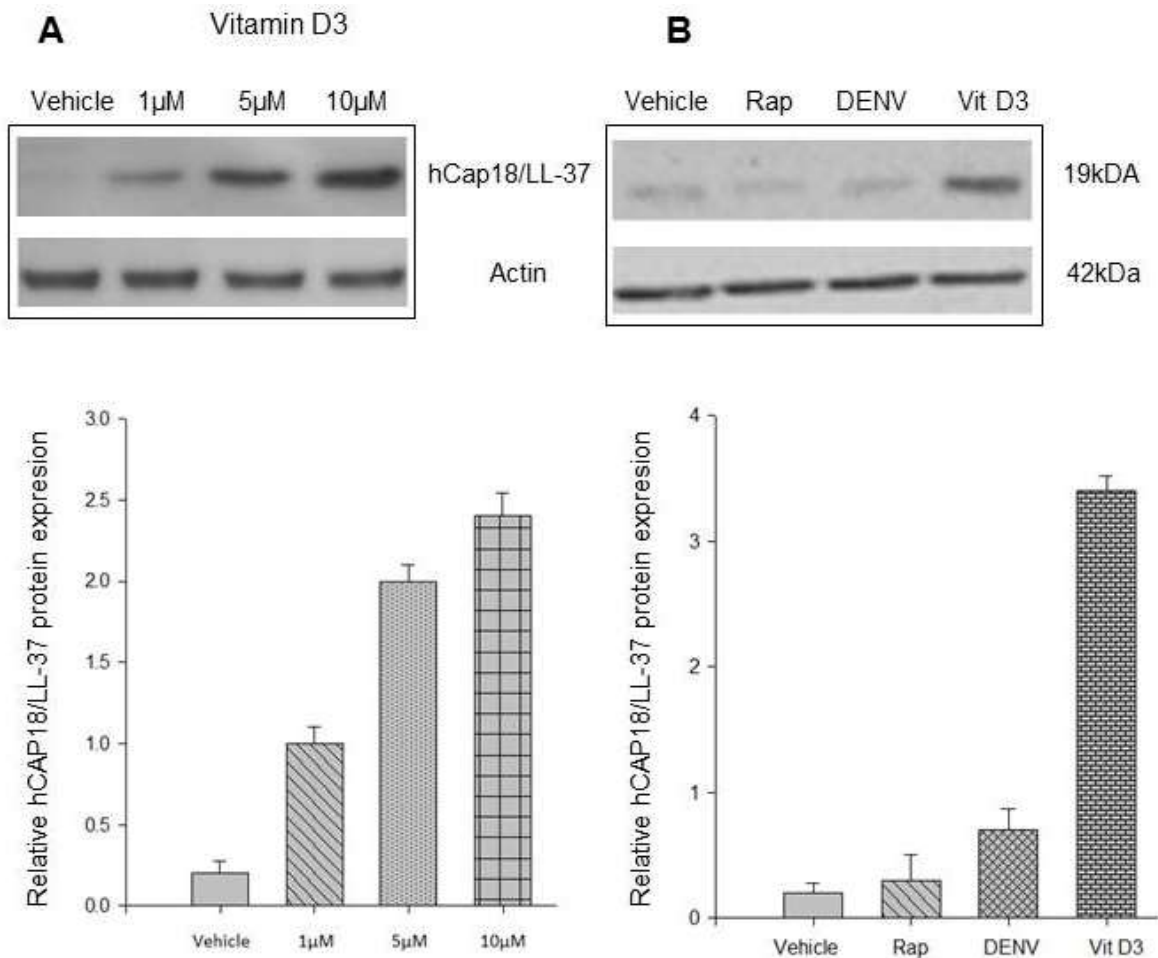


Figura 17. Vitamina D induce la expresión de la proteína hCAP18/LL37. Extractos totales de proteínas de células U937 no infectadas, incubadas con diferentes concentraciones de vitamina D3 (1µM - 10µM) o infectadas con virus dengue (DENV) o células tratadas con rapamicina, fueron analizadas mediante ensayo de western blot. Se muestra un western blot representativo (arriba) así como los respectivos análisis densitométricos (abajo). Los valores de hCAP18/LL37, fueron obtenidos de tres experimentos diferentes. *P<0.05.

Este péptido antimicrobiano solo se produjo en cantidades importantes en la presencia de vitamina D3. Y no así en las células infectadas con DENV o en las células tratada con rapamicina. Este hecho sugiere que la inhibición de la infección por DENV causada por vitamina D3 se debe a la inducción de autofagia y a la producción de péptidos antimicrobianos como catelicidina (Figura 17B).

DISCUSION

Recientemente se han descubierto nuevas propiedades terapéuticas de Vitamina D, por lo que su administración se ha vuelto muy común en diferentes patologías, específicamente en trastornos autoinmunes. Aunque, algunas evidencias sugieren que la vitamina D3 tiene propiedades antimicrobianas, los mecanismos involucrados en estas propiedades siguen siendo poco claros. En nuestro laboratorio hemos demostrado que la vitamina D3 es capaz de inhibir la infección por DENV en monocitos y hepatocitos, así mismo la vitamina D3 inhibe la producción de citocinas proinflamatorias en macrófagos infectadas con DENV.

En este trabajo, se caracterizaron los mecanismos antivirales inducidos por vitamina D3 en células mononucleares infectadas con DENV. Entre otros, se identificaron por ensayo de secuenciación masiva 22 mRNAs pertenecientes a la vía de autofagia los cuales incrementaron su expresión por acción de vitamina D3, este conjunto de genes disminuyó su expresión en las células infectadas.

Aunque Yuk et al demostraron previamente que la vitamina D3 inducía autofagia en monocitos (Yuk et al., 2009), confirmamos este efecto en la línea celular U937 DC-SIGN. La presencia de vitamina D3 indujo la formación de autofagosomas (conversión de LC3I-LC3II) y también la degradación lisosomal de la proteína p62 confirmando así que la vitamina D3 es un inductor del flujo autofágico completo. Ante esta perspectiva, evaluamos la participación de la autofagia en la inhibición de la infección por DENV. La adición de vitamina D3 a las células infectadas causó una inhibición de la infección viral y esta inhibición fue parcialmente revertida cuando se bloqueó el proceso de autofagia, lo que sugiere que la autofagia es solo uno de los mecanismos desencadenados por la vitamina D3 que participa en la inhibición de la infección por DENV.

La autofagia es un proceso complejo, que incluye la formación de membranas las cuales se forman alrededor de organelos diana o componentes celulares para eventualmente secuestrarlos formando los autofagosomas. Estos autofagosomas se fusionan posteriormente con lisosomas, los cuales vierten su contenido

enzimático, permitiendo la degradación del contenido luminal. Teniendo en cuenta este mecanismo, no es sorprendente que la autofagia se pueda utilizar como una defensa intrínseca de la célula contra los virus. Campbell et al demostraron que la inducción de la autofagia por la vitamina D3 podría inhibir el VIH y la co-infección por *Mycobacterium Tuberculosis* en macrófagos (Campbell y Spector, 2012).

Como parásitos intracelulares, durante el transcurso de una infección, los virus interactúan con las proteínas relacionadas con la autofagia. Se ha descrito que los trofoblastos primarios de placenta humana son altamente resistentes a la infección de muchos virus, esta resistencia es conferida por los miRNA del cromosoma 19 los cuales son empaquetados dentro de exosomas derivados del trofoblasto. Estos miRNAs atenuan la replicación viral en las células receptoras mediante la inducción de autofagia (Delorme-Axford et al., 2013).

La autofagia desempeña ambos papeles, por una parte actúa como mecanismo antiviral en los ciclos relicativos y patogénesis de algunos virus (Kudchodkar y Levine, 2009), y favoreciendo la replicación de otros virus (Heaton and Randall, 2011). Nuestros resultados concuerdan con estudios previos sobre DENV y autofagia en macrófagos, demostrando que la inducción de autofagia en monocitos disminuye la infección por DENV (Panyasrivanit et al., 2011).

Dado que la autofagia es un proceso catabólico en citosol dependiente de los lisosomas, la inhibición de la fusión entre los autofagosomas y los lisosomas desempeña un papel central, debido a esto decidimos evaluar la participación de los lisosomas en el proceso de inhibición de la infección. Nuestros resultados indican claramente que la inhibición de la fusión entre autofagosomas y lisosomas reduce parcialmente la acción de la vitamina D3, lo que confirma que uno de los mecanismos implicados en la inhibición de la infección mediada por la vitamina D3 es la autofagia. Por otra parte, la presencia de partículas de tipo viral dentro de las estructuras compatibles con autofagosomas, apoya nuestra conclusión. En este sentido, se ha descrito que algunas proteínas de autofagia interactúan con componentes virales o viriones para degradación lisosómica (Kudchodkar y Levine, 2009). Esto podría ocurrir durante la infección con DENV. Por otra parte la

autofagia ha estado involucrada en la generación de respuesta inmune innata y adaptativa contra los virus (Kudchodkar y Levine, 2009). El sistema inmune innato involucra la participación de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) los cuales se expresan en muchos tipos de células. Los PRRs sensan el ambiente para patrones moleculares asociados a patógenos, (PAMPs) específicos y señalizan para iniciar la traducción de proteínas antimicrobianas tales como la catelicidina, una proteína con actividad antimicrobiana.

La evidencia sugiere que la vitamina D3 aumenta la expresión de la β -defensina 4a y del gen que codifica la catelicidina. Ambos péptidos son mediadores intracelulares de actividad antibacteriana y antiviral (Gombart et al., 2005, Wang et al., 2004). Además, la catelicidina induce la transcripción de proteínas relacionadas con la autofagia, BECLIN1 y la proteína NOD2 (del inglés nucleotide binding oligomerization domain-containing protein 2) las cuales están involucradas en autofagia (Borella et al., 2014). Yuk et al demostraron que la vitamina D3 induce autofagia en monocitos humanos vía catelicidina, la cual activa la transcripción de los genes relacionados con autofagia beclina y Atg5 (Yuk et AL 2009). La vitamina D también induce la colocalización de fagosomas micobacterianos con autofagosomas en macrófagos humanos de una manera dependiente de catelicidina (Yuk et al., 2009). La autofagia puede actuar como un mecanismo antiviral del sistema inmune innato, presumiblemente secuestrando y degradando estructuras virales reduciendo la replicación viral y puede ser inducido por los ligandos de TLR, desencadenando la formación de autofagosomas y la inducción de una respuesta antiviral (Delgado y Deretic, 2009; Shi y Kehrl, 2008).

Estudios recientes han propuesto la inducción de péptidos antimicrobianos asociados con los TLRs y síntesis de la β -defensina 2 humana como probable mecanismo antiviral regulado en los monocitos después del tratamiento con vitamina D3 (Liu y Modlin, 2008). Nuestros resultados muestran que la vitamina D3 induce la producción de hCPA18/LL37, en macrófagos infectados con DENV. Las catelicidinas comprenden una familia de proteínas de mamífero que contienen un dominio antimicrobiano catiónico C-terminal que se activa después de liberarse de

la porción catelicidina N-terminal de la holoproteína. Aunque se describió previamente que los péptidos maduros muestran un amplio espectro de actividad antimicrobiana (Zanetti, 2004), algunos de ellos también han demostrado tener actividad antiviral. El péptido antimicrobiano LL37 fue capaz de inhibir la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en células mononucleares de sangre periférica, incluyendo células T CD4 (+) (Bergman et al., 2007), así como inhibir la formación de placas del virus vaccinia y la expresión de RNAm (Howell Et al., 2004). Además, LL37 tiene una actividad antiviral significativa in vivo contra el virus de la gripe, reduciendo la gravedad de la enfermedad y la replicación viral en ratones infectados (Barlow et al., 2011) y también es eficaz contra la infección del virus sincial respiratorio in vitro (Currie et al., 2013). Por lo tanto, consideramos probable que el LL37, contribuya a la actividad anti DENV observada en células tratadas con vitamina D3.

CONCLUSIÓN

En resumen, en este trabajo se demostró que vitamina D3 es capaz de regular genes de la vía de autofagia. Presentamos evidencia de que el proceso de autofagia inducido por la vitamina D3 es parcialmente responsable de la inhibición de la infección por DENV en macrófagos. Esta posibilidad está sustentada por la presencia de partículas virales en vesículas de doble membrana en las células infectadas y tratadas con vitamina D3, sugiriendo que la autofagia está contribuyendo a la inhibición de la infección viral por destrucción de virus recién sintetizados. Además, se demostró la producción del péptido antimicrobiano hCPA18 / LL-37 o catelicidina en células infectadas con DENV y tratadas con vitamina D3, el cual se ha demostrado que tiene importantes actividades antivirales.

Todos estos resultados nos permiten sugerir que la vitamina D3 inhibe la infección por DENV utilizando al menos dos mecanismos diferentes, la inducción de autofagia y la producción del péptido antimicrobiano LL37.

Bibliografia

Abu-Amer Y, Bar-Shavit Z. Impaired bone marrow-derived macrophage differentiation in vitamin D deficiency. *Cell Immunol* 1993; 151:356–68

Abe E, Miyaura C, Tanaka H et al. 1,25-dihydroxy-1,25(OH)₂D₃ promotes fusion of mouse alveolar macrophages both by a direct mechanism and by a spleen cell-mediated indirect mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80:5583–7.

Alappat L, Valerio M, Awad AB. Effect of vitamin D and β-sitosterol on immune function of macrophages. *Int Immunopharmacol* 2010; 10:1390–6.

Beard, J.A., Bearden, A., Striker, R., 2011. Vitamin D and the anti-viral state. *J. Clin. Virol.* 50, 194–200.

Bals R, Wilson JM. Cathelicidins—a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci.* 2003; 60:711–20.

Bikle D. Vitamin D and immune function: understanding common pathways. *Curr Osteoporos Rep.* 2009; 7:58–63]

Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:26–34.

Borella, E., Neshar, G., Israeli, E., Shoenfeld, Y., 2014. Vitamin D: a new anti-infective agent? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1317, 76-83.

Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Harrison *Principios de Medicina Interna* 15 ed Mac graw hill. México 2002. Pp 1363,1373-1374.

Brown, A.J., Dusso, A., Slatopolsky, E., 1999. Vitamin D. *The American journal of physiology* 277, F157-175

Campbell, G.R., Spector, S.A., 2012. Vitamin D inhibits human immunodeficiency virus type 1 and *Mycobacterium tuberculosis* infection in macrophages through the induction of autophagy. *PLoS pathogens* 8, e1002689

Chavez-Munguia, B., Cristobal-Ramos, A.R., Gonzalez-Robles, A., Tsutsumi, V., Martinez-Palomo, A., 2003. Ultrastructural study of *Entamoeba invadens* encystation and excystation. *Journal of submicroscopic cytology and pathology* 35, 235-243.

Chen S T et al. Clec5a is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature.*

2008;453:672-6.

Daher K, Selsted M, Lehrer R. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol.* 1986; 60:1068.

Delgado, M.A., Deretic, V., 2009. Toll-like receptors in control of immunological autophagy. *Cell death and differentiation* 16, 976-983.

Delorme-Axford, E., Donker, R.B., Mouillet, J.F., Chu, T., Bayer, A., Ouyang, Y., Wang, T., Stolz, D.B., Sarkar, S.N., Morelli, A.E., Sadovsky, Y., Coyne, C.B., 2013. Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 12048-12053.

De Luca HF. Vitamin D: the vitamin and the hormone. *Fed Proc* 1974; 33:2211–9.

Demasters, G., Di, X., Newsham, I., Shiu, R., Gewirtz, D.A., 2006. Potentiation of radiation sensitivity in breast tumor cells by the vitamin D3 analogue, EB 1089, through promotion of autophagy and interference with proliferative recovery. *Molecular cancer therapeutics* 5, 2786-2797.

Di Rosa M, Malaguarnera M, Nocletti F; Vitamin D3 a helpful immuno-modulator; *immunology* 2011, 134, 123-139

Eng, K.E., Panas, M.D., Karlsson Hedestam, G.B., McInerney, G.M., 2010. A novel quantitative flow cytometry-based assay for autophagy. *Autophagy* 6, 634-641.

Fernandez-Garcia M., Mazzon M., Jacobs M., Amara A. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host & Microbe* 2009;5:318-328

Gombart, A.F., Borregaard, N., Koeffler, H.P., 2005. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 1067-1077.

Gordon, P.B., Seglen, P.O., 1988. Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151, 40–47.

Gould EA, Clegg JC: Growth, titration and purification of alphaviruses and flaviviruses. In *Virology: a practical approach* Edited by: Mahy BWJ. IRL press, Oxford, U.K; 1991:43-78.

Grant, W.B., 2008. Variations in vitamin D production could possibly explain the seasonality of childhood respiratory infections in Hawaii. *The Pediatric infectious disease journal* 27, 853.

Gubler, D.J., 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical microbiology reviews* 11, 480-496.

Halstead, S. B. 2008. Dengue virus-mosquito interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 53: 273-91.

Heaton NS, Randall G: Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe* 2010, 8:422-432.

Heaton, N.S., Randall, G., 2011. Dengue virus and autophagy. *Viruses* 3, 1332-1341.

Holick MF. Vitamin D: a millenium perspective. *J Cell Biochem* 2003; 88:296–307.

Hoyer-Hansen, M., Bastholm, L., Mathiasen, I.S., Elling, F., Jaattela, M., 2005. Vitamin D analog EB1089 triggers dramatic lysosomal changes and Beclin 1-mediated autophagic cell death. *Cell death and differentiation* 12, 1297-1309.

Jurutka PW, Bartik L, Whitfield GK et al. Vitamin D receptor: key roles in bone mineral pathophysiology, molecular mechanism of action, and novel nutritional ligands. *J Bone Miner Res* 2007; 22(Suppl 2):V2–10.

Khakpoor, A.; Panyasrivanit, M.; Wikan, N.; Smith, D.R. A role for autophagolysosomes in dengue virus 3 production in HepG2 cells. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 1093-1103

Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., Adhihetty, P.J., Adler, S.G., Agam, G., Agarwal, R., Aghi, M.K., Agnello, M., Agostinis, P., Aguilar, P.V., Aguirre-Ghiso, J., Airolidi, E.M., Ait-Si-Ali, S., Akematsu, T., Akporiaye, E.T., et al Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12, 1-222.

Kudchodkar, S.B., Levine, B., 2009. Viruses and autophagy. *Reviews in medical virology* 19, 359-378.

Liu, P.T., Modlin, R.L., 2008. Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Current opinion in immunology* 20, 371-376.

Kuhn RJ: The Flaviviruses. In Fundamentals of Molecular Virology. Edited by Acheson NH. John Wiley and Sons, 2004:182/190.

Lee, Y.R.; Lei, H.Y.; Liu, M.T.; Wang, J.R.; Chen, S.H.; Jiang-Shieh, Y.F.; Lin, Y.S.; Yeh, T.M.; Liu, C.C.; Liu, H.S. Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. *Virology* **2008**, *374*, 240-248.

Leikina E, Delanoe-Ayari H, Melikov K, Cho MS, Chen A, Waring AJ, et al. Carbohydratebinding molecules inhibit viral fusion and entry by crosslinking membrane glycoproteins. *Nat Immunol.* 2005; 6(10):995–1001.

Liu PT, Schenk M, Walker VP, Dempsey PW, Kanchanapoomi M, Wheelwright M, et al. Convergence of IL-1beta and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses. *PLoS One.* 2009; 4(6):e5810.

Mackenzie, J. (2005). Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic* 6, 967–977

Mateo R, Nagamine C, Spagnolo J, Mendez E, Rahe M, Gale M, Yuan J, Kirkegaard K. Inhibition of cellular autophagy deranges dengue virus maturation. *J. virol* 2013; 87; 1312-1321.

Miller J, Gallo RL. Vitamin D and innate immunity. *Dermatol Ther.* 2010; 23:13–22.

Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., Ohsumi, Y., 1998. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395, 395–398.

Mizushima, N., 2007. Autophagy: process and function. *Genes & development* 21, 2861-2873.

Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature.* 2004;22:313-9

Mosso, C., Galvan-Mendoza, I.J., Ludert, J.E., del Angel, R.M., 2008. Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology* 378, 193-199.

Mukhopadhyay, S.; Kuhn, R. J.; Rossmann, M. G. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, 3,

13-22.

Nagpal, S., Na, S., Rathnachalam, R., 2005. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocrine reviews* 26, 662-687.

OMS Areas de riesgo en transmisión. 2006 [consultado enero 2012]

Disponible

en:http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/World_DengueTransmission_2006_10%20November.png

OMS Global alert and response: Impact of dengue. World Health Organization 2010 [Consultado diciembre 2011]. Disponible en: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>.

OPS Vigilancia epidemiológica de dengue. Organización Panamericana de la SALud Disponible en <http://ais.paho.org/atlas/dengue/paneldengue1.html>

Panyasrivanit, M.; Khakpoor, A.; Wikan, N.; Smith, D.R. Co-localization of constituents of the dengue virus translation and replication machinery with amphisomes. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 448-456.

Panyasrivanit, M., Greenwood, M.P., Murphy, D., Isidoro, C., Auewarakul, P., Smith, D.R., 2011. Induced autophagy reduces virus output in dengue infected monocytic cells. *Virology* 418, 74-84.

Panyasrivanit M, Greenwood M, Induced autophagy reduces virus output in dengue infected monocytic cells. *Virology* 2011 74-84.

Perera R, Kunh R: Structural Proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol.* 2008 August ; 11(4): 369–377

Puerta-Guardo H, De la cruz I, Rosales V, Ludert J, Del Angel RM; The 1 α ,25-dihydroxy-vitamin D3 reduces dengue virus infection in human myelomonocyte (U937) and hepatic (Huh-7) cell lines and cytokine production in the infected monocytes *Antiviral Research* 94 (2012) 57–61

Puerta-Guardo, H., Medina, F., De la Cruz Hernandez, S.I., Rosales, V.H., Ludert, J.E., del Angel, R.M., 2012. The 1 α ,25-dihydroxy-vitamin D3 reduces dengue virus infection in human myelomonocyte (U937) and hepatic (Huh-7) cell lines and cytokine production in the infected monocytes. *Antiviral research* 94, 57-61.

Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* 1(1):11-21, 2002.

Reyes-Del Valle J, Chavez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM: Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol* 2005, 79:4557-4567

Rigau-Perez J, Clark G, Gluber DJ, Reiter P, Sanders E, Vondam A. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. *Lancet* 1999; 352

Sadeghi K, Wessner B, Laggner U et al. 1,25(OH)₂D₃ down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *Eur J Immunol* 2006; 36:361–70.

Saito T, Gale M. Principles of intracellular viral recognition. *Cur Opin Immunol*. 2007; 19:17–23

Salonen A, T Ahola, L Kaariainen. Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr Top Microbiol. Immunol* 2005;285:139-173.

Sanchez-Valdez, E., Delgado-Aradillas, M., Torres-Martínez, J.A., Torres-Benítez, J.M., 2009. Clinical response in patients with dengue fever to oral calcium plus vitamin D administration: study of 5 cases. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 52, 14–17

Shi, C.S., Kehrl, J.H., 2008. MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. *The Journal of biological chemistry* 283, 33175-33182.

van Etten, E., Mathieu, C., 2005. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: basic concepts. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 97, 93-101.

Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* 1(1):11-21, 2002.

Rigau-Perez J, Clark G, Gluber DJ, Reiter P, Sanders E, Vondam A. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. *Lancet* 1999; 352

Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun

W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* 2003;7:823-829.

Xu H, Soruri A, Gieseler RK, Peters JH. 1,25-Dihydroxy1,25(OH)₂D₃ exerts opposing effects to IL-4 on MHC class-II antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes. *Scand J Immunol* 1993; 38:535–40.

Wang, J., Lian, H., Zhao, Y., Kauss, M.A., Spindel, S., 2008. Vitamin D3 induces autophagy of human myeloid leukemia cells. *The Journal of biological chemistry* 283, 25596-25605.

Wang, T.T., Nestel, F.P., Bourdeau, V., Nagai, Y., Wang, Q., Liao, J., Tavera-Mendoza, L., Lin, R., Hanrahan, J.W., Mader, S., White, J.H., 2004. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *Journal of immunology* 173, 2909-2912.

Wu S, Sun J; Vitamin D, Vitamina D receptor, and macrophagy in inflamation and infection; *Discovery medicine* 2011, 59 325-335

Yuk, J.M., Shin, D.M., Lee, H.M., Yang, C.S., Jin, H.S., Kim, K.K., Lee, Z.W., Lee, S.H., Kim, J.M., Jo, E.K., 2009. Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell host & microbe* 6, 231-243.

Villamor E. A potential role for vitamin D on HIV infection? *Nutr Rev* 2006; 64:226–33.

Zasloff, M., 2006. Fighting infections with vitamin D. *Nat. Med.* 12, 388–390