



**UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE CÓRDOBA**

Universidad Jesuita

Facultad de Ciencias Químicas

**INFECCIÓN DE MONOCITOS CON EL VIRUS ENCEPHALITIS SAINT LOUIS:
EFECTO SOBRE EL FENOTIPO CELULAR Y LA APOPTOSIS**

**Tesis de Doctorado de la Facultad de Ciencias Químicas
de la Universidad Católica de Córdoba conforme
a los requisitos para obtener el título de Doctor en Bioquímica**

por

CINTHYA CAULA

**CÓRDOBA-ARGENTINA
2016**

Director de Tesis

Dra. Lorena I. Spinsanti

Instituto de Virología "Dr JM Vanella"
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Córdoba

Co-Director de Tesis

Dr. Miguel A. Orsilles

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Católica de Córdoba

Comité de Tesis Doctoral

Dra. Adriana Gruppi

Dra. Roxana C. Cano

Dra. María C. Carpinella

Tribunal Examinador de Tesis Doctoral

Dra. Adriana Gruppi

Dr. Alejandro Lozano

Dra. Roxana V. Alasino

**“Si quieres llegar rápido, viaja solo...
Si quieres llegar lejos, viaja acompañado...”**

Proverbio africano

A mis compañeros de viaje que lo hicieron posible:

A mis amorosos padres Modesta y Chiche, que con pocas palabras pero infinidad de hechos me enseñaron que cualquiera sea el viaje, el único camino a seguir es el que te convierte en mejor persona....

A mi querido hermano Martín, un apoyo incondicionalel hará todo lo posible para allanarme el camino...

A mi esposo Guille, mi gran amor.....que me alienta siempre y tiene la habilidad de hacerme ver las cosas lindas del camino elegido....

A mis hijos Cami, Tomás y Matias.....ellos son mi faro, su luz me recuerda el único lugar en donde ansío permanecer... sus corazones...

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lorena I. Spinsanti, una hermosa persona, que me apoyó desde el primer día en este proyecto, por enseñarme, acompañarme y guiarme siempre con gran calidez humana. Gracias Lore, por tus consejos, paciencia y serenidad; ocupás un lugar en mi corazón.

Al Dr. Miguel A. Orsilles, que me posibilitó ingresar al mundo de la investigación en la UCC y aceptó formar parte de este trabajo. Gracias Miguel, por el tiempo que le has dedicado y por tus valiosos aportes.

A la Dra. Sara Palacios, Directora del Doctorado en Bioquímica de la UCC, por las charlas, consejos y por disipar mis inquietudes con palabras de aliento.

A los miembros del Comité de Tesis Doctoral por el apoyo, los consejos y las importantes contribuciones realizadas durante este largo período de formación.

A los miembros del Tribunal Examinador de Tesis por sus valiosas observaciones que enriquecieron este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Químicas, lugar donde me formé como Bioquímica y Farmacéutica. A todos mis profesores y compañeros que hicieron que tenga un maravilloso recuerdo de esos años.

A la Universidad Católica de Córdoba, que en el marco del Programa de Becas de Post-grado, colaboró en la realización de esta Tesis.

A la Dra. Paula M. Cooke, por darme la posibilidad de ingresar al mundo de la docencia. Gracias Paula! por tu apoyo, acompañamiento, las cientos de charlas, consejos, preocupaciones y alegrías compartidas. Fuiste mi profe, mi referente, hoy mi amiga!

A la Dra. Marta S. Contigiani, por abrirme las puertas del Laboratorio de Arbovirus permitiendo que forme parte de esa gran familia que es el Instituto J.M. Vanella, UNC. Gracias por compartir sus conocimientos.

A la Dra. Adriana Gruppi, que con su vasta trayectoria en la Inmunología, realizó valiosísimas contribuciones a este trabajo, aconsejando, aportando conocimientos y cooperando en la logística de los ensayos.

A mis compañeros del “Viro”, por hacerme sentir bienvenida con una sonrisa, un mate y una predisposición natural de colaboración en todo. En especial a la Dra. Viviana Ré, que me alentó a realizar esta Tesis; la Dra. M. Elisa Rivarola, por compartir sus conocimientos de SLEV; al Bioq. Javier Aguilar por familiarizarme con el cultivo celular; al Dr. Pedro I. Gil por su colaboración en la microscopía y al Dr. Gonzalo Batallán por los análisis estadísticos.

A las Dres. Paula Abadi, Pilar Crespo y Alejandro Romero por su apoyo en la citometría de flujo, al Dr. Alfredo Arocena, por intruirme en el manejo de Flow jo, al Bioq. Pablo Yang por su asistencia informática.

A mis compañeros de las Cátedras Anatomía y de Inmunología, Med. Alicia Bollati, Mag. Ramón Carnero y Dra. Brenda Casarsa y a todos los que tuvieron un gesto amable y una palabra reconfortante.

A mi esposo e hijos, por su apoyo y paciencia infinita, imprescindibles para que esta Tesis haya sido posible.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Lista de Abreviaturas.....	xi
Lista de Figuras.....	xv
Lista de Tablas.....	xvii
Resumen.....	xviii
Summary.....	xix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Virus encephalitis Saint Louis	2
1.1.1 Clasificación Taxonómica	2
1.1.2 Organización estructural y genómica.....	2
1.1.3 Ciclo de Replicación	4
1.1.4 Ciclos de mantenimiento.....	5
1.1.5 Epidemiología de SLEV en Argentina.....	6
1.1.6 Aislamientos de SLEV y caracterización de cepas en Argentina	6
1.2 Monocitos.....	7
1.2.1 Origen y Función de los Monocitos	7
1.2.2 Subgrupos de Monocitos	8
1.2.3 Polarización de la función de los Monocitos	10
1.2.4 Receptores de reconocimiento y activación de Monocitos	13
1.2.5 Producción de inmunomoduladores por monocitos activados	16
1.3 Apoptosis en la Infección viral.....	18
1.3.1 Mecanismo de Muerte celular por Apoptosis	18
1.3.2 Apoptosis de la célula huésped en la infección por Flavivirus	22
1.4 Patogénesis de la enfermedad neuroinvasiva por Flavivirus: compromiso de los monocitos y la apoptosis.....	24
1.5 Bibliografía.....	26
2. OBJETIVOS.....	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
3.1 Cepas de virus y stock viral.....	38
3.1.1 Preparación de los stocks virales.....	38
3.1.2 Titulación de los stocks virales.....	38

3.2	Línea Celular U937.....	39
3.2.1	Generalidades.....	39
3.2.2	Condiciones de cultivo.....	39
3.3	Infección de células U937.....	40
3.4	Detección de antígeno viral.....	41
3.4.1	Obtención de las improntas.....	41
3.4.2	Procedimiento de Inmunofluorescenc.....	41
3.5	Curva de replicación viral.....	42
3.5.1	Extracción del ARN viral.....	42
3.5.2	PCR en tiempo real.....	42
3.6	Detección de Apoptosis.....	43
3.6.1	Marcación con Anexina V y 7-Amino-actinomicina.....	43
3.6.2	Detección <i>in situ</i> de la muerte celular.....	44
3.6.3	Determinación de caspasa 3-activa.....	45
3.6.4	Determinación del cambio de potencial de membrana mitocondrial .	46
3.7	Evaluación de la expresión de moléculas de superficie y receptores de activación	46
3.7.1	Marcación de moléculas y receptores de superficie	46
3.7.2	Marcación de receptores intracelulares	47
3.8	Cuantificación de citoquinas.....	48
3.9	Análisis Estadístico.....	48
3.10	Bibliografía.....	49
4.	RESULTADOS.....	50
4.1	Infección y replicación del SLEV en células U937.....	50
4.2	Cambios morfológicos de las células U937 por la infección con SLEV....	52
4.3	Impacto de la infección viral sobre la viabilidad de las U937.....	55
4.4	Detección de apoptosis.....	57
4.4.1	Marcación con Anexina V/ 7-AAD.....	57
4.4.2	Determinación de caspasa-3 activa.....	61
4.4.3	Prueba de TUNEL	64
4.4.4	Determinación de la disminución del potencial de membrana mitocondrial..	65
4.5	Expresión de antígenos de superficie y receptores en células U937 infectadas con SLEV.....	67
4.6	Producción de inmunomoduladores.....	77

4.7	Relación entre los diferentes parámetros según la infección de las células U937 con SLEV cepa CbaAr-4005 y cepa 78V-6507.....	78
5.	DISCUSIÓN.....	85
5.1	Capacidad de infección y replicación de SLEV.....	85
5.2	Consecuencias de la infección del SLEV sobre la viabilidad de monocitos humanos.....	90
5.2.1	Identificación del mecanismo de muerte.....	90
5.2.2	Vías de activación de la apoptosis en monocitos infectados.....	93
5.3	Expresión de moléculas de superficie y receptores en monocitos infectados con SLEV.....	99
5.3.1	Moléculas de superficie asociados a diferenciación celular.....	99
5.3.2	Moléculas y receptores asociados a activación celular.....	102
5.4	Producción de Inmunomoduladores por monocitos infectados.....	106
5.5	Bibliografía.....	111
6.	CONCLUSIONES.....	122

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- AcNT: anticuerpos neutralizantes
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- Ag: antígeno
- AIF: factor inductor de apoptosis, del inglés *apoptosis inductor factor*
- AL: apoptosis tardía, del inglés *later*
- Apaf-1: del inglés *Apoptosis protease activating factor-1*
- ARN: ácido ribonucleico
- AT: apoptosis temprana
- BHE: barrera hematoencefálica
- Bid: del inglés *Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-interacting domain death agonist*
- CCL : *chemokine (C-C motif) ligand*
- CD: célula dendrítica
- CDmo: células dendríticas derivadas de monocitos
- cel.: célula
- CF: citometría de flujo
- CHOP: del inglés *c/EBP homologous protein*
- CLEC5A: del inglés *C-type lectin domain family 5 member A*
- CMH: complejo mayor de histocompatibilidad
- CMSP: células mononucleares de sangre periférica
- cMoP: progenitor de monocitos común, del inglés *common monocyte progenitor intermediates*)
- CPA: célula presentadora de antígeno.
- CXCL10: del inglés *chemokine (C-X- C motif)*
- DC-SIGN: del inglés *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-Integrin*
- DENV: Dengue virus
- DF: dengue febril o fiebre de dengue
- DH: dengue hemorrágico
- DIABLO: del inglés *direct IAP-binding protein with low pl.*
- DISC: complejo de señalización de inducción de muerte, del inglés *death-inducing signaling complex.*
- dUTP: del inglés *terminal deoxynucleotidyl transferase*

EC: efecto citopático

FADD : del inglés *Fas-associated death domain*

FasL: ligando Fas.

FITC: isotiocianato de fluoresceína

FSC: forward scatter

GM CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos- monocitos, del inglés *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

h: hora

hi: alta, del inglés *high*

HLA: antígeno leucocitario humano, del inglés *Human leukocyte antigen*.

HSCs: células madres hematopoyéticas, del inglés *haematopoietic stem cells*

HSP: proteínas de choque térmico, del inglés *heat shock proteins*

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses

IL: interleuquina

IMF: intensidad media de fluorescencia

INF: interferón

IRF-3 : del inglés *Interferon Regulatory Factor 3*

JEV: del inglés *Japanese encephalitis virus*

K562: línea celular mielode humana

Li Tc: linfocito T citotóxico

Li Th: linfocito T colaborador, del inglés *helper*

LPS: lipopolisacárido

M1: monocitos o macrófagos activados clásicamente

M2: monocitos o macrófagos activados alternativamente

MCP: proteína quimiotáctica de monocitos, del inglés *monocyte chemoattractant protein*

MDP: progenitor de macrófagos y CD, del inglés *macrophage and dendritic cell precursor*)

MEM: Medio Esencial Mínimo

mid: media del inglés *middle*

min: minutos

MIP-1bis: proteína inflamatoria de macrófagos, del inglés *macrophage inflammatory protein*.

MO: médula ósea

MOI: índice de multiplicidad de infección

MVV: del inglés *Murray Valley virus*
MYD88: del inglés *myeloid differentiation primary response protein*.
N: células necróticas
NCR: del inglés *non-coding region*
NFkB: de inglés *nuclear factor kB*
Neuro2a: línea celular de neuroblastoma murino
NL: nódulos linfáticos
nts: nucleótidos
ORF: del inglés *open reading frame*
PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos.
PBS: buffer fosfato salino
PE: ficoeritrina
pi: post infección
PM: peso molecular
PMA: forbol-12-miristato-13-acetato
PS: fosfatidilserina
qRT-PCR: PCR en tiempo real
RANTES: del inglés *regulated upon activation normal T cell expressed and presumably secreted*.
RE: retículo endoplásmico
RM: receptor de manosa
RNS: especies reactivas del nitrógeno, del inglés *reactive nitrogen species*
ROS: especies reactivas del oxígeno, del inglés *reactive oxygen species*
r.p.m: revoluciones por minuto
RRP: receptores de reconocimientos de PAMP
SLEV: del inglés *Saint Louis encephalitis virus*
SMAC: del inglés *second mitochondria-derived activator of caspases*
SNC: sistema nervioso central
SSC: *side scatter*
TA: temperatura ambiente
TAM : acrónimo de TYRO3, AXL y MER
TGF-β: factor transformante del crecimiento beta, del inglés *transforming growth factor β*
TIM: del inglés *T-cell immunoglobulin and mucin domain*
TLR: del inglés *toll like receptor*

TMB: tetrametilbencidina

TMRE: tetrametilrodamina, etil éster perclorato

TNF: del inglés *tumor necrosis factor*

TNF-R: receptor de TNF.

TRAIL: ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (del inglés *TNF-related apoptosis-inducing ligand*)

TRAIL-R: receptor de TRAIL

TRIF: del inglés *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*

TUNEL: del inglés *transferase-mediated dUTP nick end labeling*

u.f.p.: unidades formadoras de placas

V: células viables

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

WNV: virus del Oeste de Nilo (del inglés *West Nile virus*)

WNV Cp: proteína de la cápside de WNV

XIAP: del inglés *X-linked inhibitor of apoptosis*

YFV: virus de la fiebre amarilla

ZIKV: virus del ZIKA

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de un flavivirus	3
Figura 2. Representación esquemática de la organización del genoma de flavivirus.....	4
Figura 3. Mecanismos de ingreso / salida y replicación viral de flavivirus en la célula hospedadora.	5
Figura 4. Desarrollo y expresión de marcadores de superficie de los subgrupos de monocitos	10
Figura 5. Esquema simplificado de polarización de activación de monocitos	12
Figura 6. Implicancias de la unión de los flavivirus a los receptores de lectina	14
Figura 7. Expresión de TLRs y vías de señalización	16
Figura 8. Ilustración de Apoptosis y Necrosis.....	19
Figura 9. Vías Extrínsecas e Intrínseca de Apoptosis.....	21
Figura 10. Vías de muerte o supervivencia en la infección por Flavivirus.....	23
Figura 11. Patogénesis de la encefalitis por flavivirus.....	25
Figura 12. Detección de antígeno viral de SLEV	50
Figura 13. Porcentaje de células U937 Ag SLEV+	51
Figura 14. Carga viral de sobrenadantes de cultivos de células U937	52
Figura 15. Imágenes de células U937 controles, infectadas y con tratamiento con PMA.....	54
Figura 16. Distribución SSC vs FSC de células U937.....	55
Figura 17. Gráfico dot-plot con ventana para evaluación de viabilidad.....	56
Figura 18. Cinética de la viabilidad de las células U937 infectadas con SLEV	57
Figura 19. Gráfico dot-plot. Poblaciones según marcación Anexina/7-AAD.....	58
Figura 20. Cinética de la distribución de las subpoblaciones celulares según marcación Anexina/7-AAD.....	59
Figura 21. Porcentajes de células U937 en apoptosis tardía en cultivos controles (-) e infectados con SLEV	61
Figura 22. Distribución de células caspasa-3 activa en función FSC.....	62
Figura 23. Frecuencia de la distribución de caspasa-3 activa	63
Figura 24. Prueba de TUNEL	64

Figura 25. Captación del colorante TMRE.....	65
Figura 26. Porcentaje de células con polaridad de membrana conservada	66
Figura 27. Porcentaje de células con disminución del potencial de membrana mitocondrial	67
Figura 28. Gráficos de densidad de distribución de células U937 CD14+	69
Figura 29. Viabilidad de células U937 CD14+	70
Figura 30. Correlación entre el porcentaje de células viables vs porcentaje de U937 CD14+	71
Figura 31. Cinética de la expresión de HLA-DR	72
Figura 32. Gráficos de densidad de distribución de la expresión de HLA-DR.....	73
Figura 33. Viabilidad de células U937 según expresión HLA-DR.....	74
Figura 34. Densidad de distribución de la expresión de HLA-DR vs CD14.....	74
Figura 35. Frecuencia de la expresión de CD95.....	75
Figura 36. Frecuencia de la expresión intracelular de TLR-3.....	76
Figura 37. Frecuencia de la expresión intracelular de TLR-2.....	76
Figura 38. Representación del número de copias de ADN viral (x104), porcentaje de células en apoptosis y porcentaje de U937 CD14+	78
Figura 39. Correlación entre el porcentaje de células en apoptosis, porcentaje de células U937 CD14+ y número de copias virales	79
Figura 40. Correlación entre el porcentaje de células U937 CD14+ y número de copias virales	80
Figura 41. Diagrama de barras de concentración de citoquinas TNF y IL-6	81
Figura 42. Correlación entre apoptosis versus [TNF] y [IL-6]	82
Figura 43. Correlación entre [TNF], [IL-6] y copias virales	83
Figura 44. Niveles de IL-10 en sobrenadante.....	83
Figura 45. Correlación entre número de copias virales, apoptosis e IL-10	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Lista de cebadores y sondas utilizados para la qRT-PCR	43
Tabla II. Anticuerpos monoclonales utilizados.....	47
Tabla III. Viabilidad de células U937 en cultivos controles (-) e infectados con SLEV cepa 78V-6507 y CbaAr-4005, a distintos días pi.....	59
Tabla IV. Apoptosis temprana y tardía de células U937 en cultivos controles e infectados con SLEV cepa 78V-6507 y CbaAr-4005, a distintos días pi.....	60
Tabla V. Porcentajes de las células positivas para caspasa-3 activa en células controles (-) y cultivos infectados con SLEV cepa 78V-6507 y CbaAr-4005, a distintos días pi	64
Tabla VI. Expresión de CD14 en la membrana de las células U937 sin infectar e infectadas con SLEV 78V6507 y CbaAr4005 a distintos días pi.....	68
Tablas VII. Concentración de citoquinas (A)- TNF, (B)- IL-6, (C)- IL-10.....	77

RESUMEN

Los flavivirus transmitidos por los mosquitos son una gran amenaza actual y emergente, que afecta a millones de personas en todo el mundo. La forma grave de enfermedad comprende la neuroinvasiva descrita para el virus *encephalitis Saint Louis* (SLEV), el virus de la Encefalitis Japonesa (JEV, *Japanese Encephalitis virus*) y el virus del Oeste del Nilo (WNV, *West Nile virus*), como también la forma hemorrágica desencadenada por el virus del dengue (DENV). En este contexto, la respuesta inmune es un componente crucial de la defensa del huésped, ya que su compromiso podría tener consecuencias sobre la virulencia de la cepa y la fisiopatogenia de la infección. En este trabajo se investigó la interacción entre SLEV y células de la inmunidad innata, en un modelo de infección *in vitro* de monocitos humanos (células U937) con cepas de distinta virulencia y condiciones epidemiológicas de aislamiento (Cba-Ar 4005 y 78V-6507). Se evaluó la capacidad de infectar y replicar del virus, se identificó y cuantificó la forma de muerte del monocito y se caracterizó el perfil fenotípico y funcional de esta célula mediante la determinación de marcadores de maduración y activación (CD14, HLA-DR), la expresión de TLR (*Toll-like receptor*) y mediadores biológicos secretados (TNF, IL-6, IL-10). Como resultado de este trabajo de Tesis se ha demostrado la susceptibilidad de células humanas de linaje monocítico a la infección y replicación por ambas cepas de SLEV. Se ha identificado que la infección por SLEV CbaAr-4005 induce la maduración y activación del monocito hacia un fenotipo inflamatorio M1 que no logra limitar la infección y promueve su muerte por un mecanismo apoptótico mediado por caspasa-3 inducida por vía intrínseca y posiblemente extrínseca. En cambio, la infección por SLEV 78V-6507, induce al monocito hacia un fenotipo regulador M2 que modula su activación y con ello limita su muerte junto con la replicación viral y la infección. Las diferencias halladas en la interacción entre las cepas de SLEV y el monocito, podrían justificar, en parte, el comportamiento epidemiológico y las diferencias de virulencia en modelo murino y aviario manifestado por estas cepas.

Palabras clave: SLEV, monocitos, apoptosis, fenotipo

SUMMARY

In this work we investigated the interaction between SLEV and cells from the innate immune system in an *in vitro* infection model of human monocytes (U937 cells) and strains of different virulence: Cba-Ar 4005 and 78V-6507, isolated from mosquitoes.

We demonstrated the susceptibility of cells from monocytic lineage to infection and replication by both strains of SLEV. The phenotypic and functional profile of these cells was characterized by the determination of maturation and activation markers (CD14, HLA-DR), TLR expression (Toll-like receptor) and secreted biological mediators (TNF, IL-6, IL-10).

Infection with SLEV CbaAr-4005 has been identified as inducing monocyte maturation and activation towards an M1 inflammatory phenotype that fails to limit infection and promotes its death by an intrinsically and possibly extrinsically induced caspase-3-mediated apoptotic mechanism. In contrast, SLEV 78V-6507 infection induces the monocyte to an M2 regulatory phenotype that modulates its activation and thereby limits its death along with viral replication and infection.

The differences found in the interaction between both SLEV strains and monocytes could partially justify the epidemiological behavior and differences in virulence in murine and avian models showed by these strains.

Keywords: SLEV, monocytes, apoptosis, phenotype.

1. INTRODUCCIÓN

El SLEV pertenece al género *Flavivirus* (familia *Flaviviridae*). Este género se encuentra incluido en los denominados arbovirus (del inglés *arthropod borne viruses*: virus transmitidos por artrópodos). Diversas especies virales de este género son responsables, cada año, de causar enfermedades severas y alta mortalidad en humanos (1). En Argentina se conoce que circulan los flavivirus SLEV (2), WNV (3), DENV (4) y recientemente introducido el virus Zika (ZIKV) (5). Desde el año 2002, el SLEV experimenta una re-emergencia como agente etiológico de encefalitis humana en Sudamérica (2, 6)

Los factores que intervienen en la aparición de la enfermedad neurológica y su gravedad no están completamente dilucidados. Las células de linaje mieloide juegan un papel importante en la patogénesis de los flavivirus. El reclutamiento de monocitos y macrófagos es un componente clave para el control de la replicación del virus en ganglios linfáticos y sangre antes de su invasión al sistema nervioso central (SNC) (7,8). Estas células interactúan con el virus a través de receptores específicos e inducen un estado antiviral que promueve la erradicación del microorganismo (9). Sin embargo, la co-evolución de los flavivirus con el huésped vertebrado ha resultado en una serie de mecanismos que permiten la evasión viral e incluso la muerte por apoptosis de células de la inmunidad innata (10). Así la apoptosis de la célula huésped puede ser manipulada a fin de favorecer la supervivencia y diseminación del virus, cuya llegada a SNC se posibilita por la disrupción de la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) causada por las citoquinas inflamatorias liberadas por monocitos infectados (11).

El objetivo de esta tesis doctoral es estudiar la respuesta del monocito, célula de la inmunidad innata, frente a la infección con SLEV. Dicho estudio permitirá conocer la capacidad del virus para infectar y replicar en esta célula, el fenotipo funcional de activación que desarrollan los monocitos durante la infección y evaluar posibles mecanismos de evasión viral.

La comprensión detallada de las consecuencias de la interacción entre SLEV y estas células de la inmunidad es fundamental para identificar mecanismos de virulencia, factores de susceptibilidad del huésped y posibles focos de intervención terapéutica que puedan disminuir el daño a nivel de SNC.

1.1 Virus encephalitis Saint Louis

1.1.1 Clasificación Taxonómica

El Comité Internacional en la Taxonomía de Virus (traducción del inglés: International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/lctv/index.htm>) clasifica a SLEV dentro de la familia *Flaviviridae* género *Flavivirus*. La familia *Flaviviridae* (nombre que hace alusión al virus prototipo del grupo, el virus de la fiebre amarilla (YFV: del latín *flavu*, amarillo) está conformada por cuatro géneros, el género *Pestivirus* (del latín *pestis*, plaga), el género *Hepacivirus* (del griego *hepatos*, hígado), el género *Pegivirus* y el género *Flavivirus*.

El género *Flavivirus* contiene 53 especies virales, la mayoría de ellos son transmitidos por mosquitos (<http://www.ICTVonline.org/index.asp>). El 65% de los virus transmitidos por mosquitos causan enfermedad en humanos (1).

1.1.2 Organización estructural y genómica

Análisis estructurales han revelado que los viriones maduros de flavivirus son partículas esféricas, de aproximadamente 40 a 60 nanómetros (nm) de diámetro envueltos por una bicapa lipídica, que constituye aproximadamente el 17 % del peso seco del virión y que deriva de la propia capa lipídica de la célula hospedadora (12) (Figura 1). SLEV, al igual que los demás flavivirus, presenta un core o nucleocápside icosaédrica de 30 nm que protege al genoma viral compuesto por ARN (13). El core posee tres proteínas estructurales que cumplen diversas funciones. La proteína de la cápside (C), de 12 kilo-Dalton (KDa), se une en múltiples copias de ARN para encapsular al genoma viral, formar la nucleocápside y ensamblar las partículas virales. La proteína de membrana (M), de 8 KDa, forma la envoltura del virión maduro y proviene de la ruptura de la proteína preM (prM). La proteína de envoltura (E), de 53KDa, usualmente glicosilada, es la más grande y es la principal proteína presente en la envoltura del virión, participa en el reconocimiento y fusión virus-

célula. La proteína E induce la respuesta de anticuerpos neutralizantes (AcNT) en el huésped y mutaciones en el gen que la codifica, pueden afectar la virulencia (14).

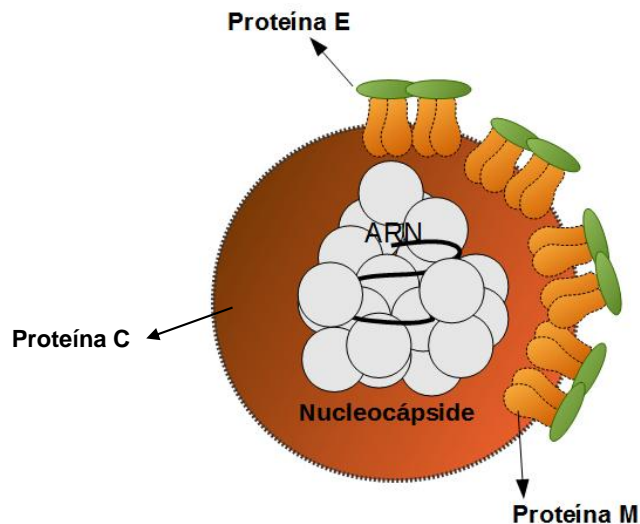


Figura 1. Esquema de un flavivirus donde puede visualizarse la nucleocápside icosaédrica formada por la proteína C. Rodeando esta estructura se encuentra la envoltura viral derivada de la membrana de la célula hospedadora, donde están asociadas las proteínas de membrana (M) y la proteína de envoltura (E).

El genoma de SLEV consiste en una molécula de ARN de simple cadena con polaridad positiva de 11 Kb de longitud y con 10.963 nucleótidos (nts) (Figura 2). Esta molécula en su extremo 5' presenta una 5'cap (m⁷G5'ppp5'A) y carece de cola de poliadenina (poli-A) en su extremo 3' (15). Durante la replicación viral, el ARN actúa como un único ARN mensajero que posee un sólo marco de lectura (ORF: del inglés *open reading frame*) que codifica para una poliproteína de 3.429 aa que se traduce en 3 proteínas estructurales (C, E y M) y 8 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B y NS5). Flanqueando al ORF se encuentran dos regiones no codificantes (NCR: del inglés *non-coding region*) de 100 nts (extremo 5') y de 400 a 700 nts (extremo 3'). Estas NCR forman estructuras secundarias del ARN que intervendrían dirigiendo los procesos de amplificación, translación y empaquetamiento del genoma.

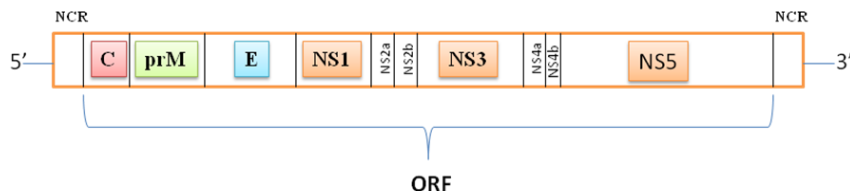


Figura 2. Representación esquemática de la organización del genoma de flavivirus donde se visualiza el marco de lectura abierta y la región no-codificante (NCR).

Kuno y col (1998)(16), han determinado que SLEV comparte aproximadamente el 72% de su genoma con JEV, WNV y el virus del valle de Murray (MVV, del inglés *Murray Valley virus*).

Estudios filogenéticos basados en la secuenciación completa del gen de la proteína E del SLEV han demostrado la existencia de ocho genotipos virales (I-VIII) (17).

1.1.3 Ciclo de Replicación

El virus ingresa a la célula por el mecanismo conocido como endocitosis mediada por receptor, donde el receptor viral de reconocimiento y adsorción a la célula es la proteína E (15). Una vez formada la vesícula endocítica, el pH ácido del endosoma genera alteraciones estructurales en la proteína E provocando la fusión de las membranas endosoma-virión, liberando la nucleocápside al citoplasma, aunque también se ha observado fusión directa de la envoltura viral con la membrana celular. Luego del desnudamiento viral, comienza la replicación. La replicación del ARN viral ocurre en focos perinucleares e implica la síntesis de una cadena complementaria negativa que sirve como templado para la síntesis de moléculas de cadena positiva. El ARN viral genómico sirve directamente como mensajero y es traducido completamente desde su extremo 5' para producir una gran poliproteína precursora que luego es clivada para dar las proteínas virales individuales. Las partículas virales se ensamblan mediante invaginaciones del retículo endoplasmático y se transportan a lo largo de la ruta secretora, a través del complejo de Golgi, donde se produce su maduración (18). Ésta incluye el procesamiento de la glicoproteína prM por una proteasa celular del tipo furina, dando lugar a la forma madura (M). El corte se produce dentro de los compartimentos

ácidos de la red que constituyen el *trans*-Golgi y permite la reorganización de la glicoproteína E para generar partículas maduras infecciosas que se liberan al medio extracelular (1) (Figura 3).

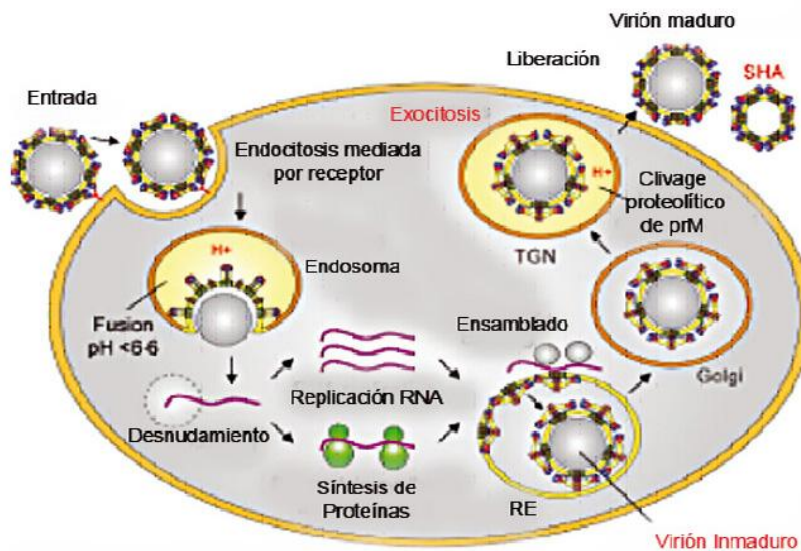


Figura 3. Mecanismos de ingreso / salida y replicación viral de flavivirus en la célula hospedadora. Obtenido de Stiasny y Heinz (2006) (19).

1.1.4 Ciclos de mantenimiento

SLEV, al igual que los flavivirus en general, necesita de la presencia de un organismo que actúe como vector y otro como hospedador, de manera que se genere un ciclo que permita mantener al virus en la naturaleza. El vector, un artrópodo hematófago, debe ingerir sangre o fluidos corporales que contienen el virus y después de un período de replicación dentro de su organismo poder transferirlo a otro hospedador por la misma vía. El hospedador en cambio, debe ser capaz de desarrollar viremias elevadas y duraderas y compartir con el vector la misma distribución en el espacio y en el tiempo (20).

En Argentina varias especies de mosquitos *Culex* y *Aedes* han sido postuladas como posibles vectores y las palomas Torcazas (*Zenaida auriculata*) y *Columbina picui* y *Zenaida auriculata* como hospedadores amplificadores (21,22).

El hombre y otros mamíferos no participan en la transmisión primaria del ciclo y son considerados hospedadores terminales (23).

1.1.5 Epidemiología de SLEV en Argentina

SLEV, circula desde el sur de Canadá hasta Argentina. Fue aislado por primera vez del cerebro de monos Rhesus que habían sido inoculados por vía intracerebral con sobrenadantes de extractos cerebrales de pacientes fallecidos (24) en una epidemia de encefalitis ocurrida en la localidad de St. Louis, Missouri (EE.UU.) (25).

El SLEV es endémico en Argentina y su distribución geográfica es muy amplia (26). Desde el año 2002 el SLEV experimenta una re-emergencia como agente etiológico de encefalitis humana en el cono sur de Sudamérica, con la ocurrencia en la provincia de Córdoba del primer brote notificado en Sudamérica (2). En los siguientes años, y como resultado de una vigilancia más intensa, se notificaron brotes de distinta magnitud y casos aislados en otras provincias como Entre Ríos, Santa Fe, Buenos Aires, y San Juan (27). Las causas de esta emergencia en la zona central de Argentina podrían estar asociadas con la introducción y circulación de una nueva cepa con mayor potencial virémico y patogénico (28) como así también a los aumentos en las poblaciones de la paloma torcaza, hospedadora del SLEV (29).

1.1.6 Aislamientos de SLEV y caracterización de cepas en Argentina

En Argentina han sido aisladas cepas de SLEV a partir de humanos, roedores y mosquitos, en períodos separados de tiempo. Las cepas Bel y Vil fueron aisladas en 1963 de pacientes febriles agudos, durante un brote de Fiebre Hemorrágica Argentina en la provincia de Buenos Aires (30). Entre 1978 y 1983, seis cepas de SLEV fueron aisladas de mosquitos colectados en la provincia de Santa Fe. La cepa 78V-6507 (genotipo V) fue aislada de *Culex quinquefasciatus* en la localidad de Esperanza en 1978 (31,32). Otras dos cepas fueron aisladas de roedores capturados en el sur de la provincia de Córdoba, cepa CbaAN 9124 y cepa CbaAN 9275, pertenecientes al genotipo VII (33).

Durante el brote de encefalitis por SLEV en Córdoba en 2005, lograron aislarse dos cepas (CbaAr-4005 y CbaAr4006) de mosquitos *Culex quinquefasciatus* recolectados en la casa de un paciente con encefalitis con diagnóstico positivo para SLEV (6).

Rivarola y col (2014) (28) realizaron la caracterización biológica en un modelo murino de dos cepas no epidémicas (78V-6507 y CorAn-9275) y de la cepa epidémica CbaAr-4005. Estos investigadores observaron que la cepa CbaAr-4005 fue la más infecciosa y letal de las tres variantes, produciendo los mayores porcentajes de morbilidad, signos de enfermedad en todos los animales inoculados y mostrando intervalos más estrechos de aparición de los síntomas respecto a las otras cepas. En función de esto se considera que la cepa epidémica CbaAr-4005 posee mayor virulencia que las endémicas 78V-6507 y CorAn-9275.

1.2 Monocitos

1.2.1 Origen y Función de los Monocitos

Generalidades

Los monocitos son una población conservada de leucocitos definida según su ubicación, fenotipo, morfología y expresión génica (34-36). En los seres humanos, los monocitos representan el 10% de las células nucleadas de sangre periférica, también se encuentran en bazo y pulmones, como monocitos marginales que pueden movilizarse a demanda (37). El hecho que los monocitos de sangre tengan una vida media corta, combinado con la observación de que dan origen a las células residentes de tejido en condiciones inflamatorias, condujo a la hipótesis de que los monocitos constituyen un depósito de precursores de fagocitos de tejido residente. Si bien estudios recientes han establecido firmemente que tanto las células dendríticas clásicas (CDC) como la mayoría de los macrófagos de tejido se originan y se mantienen independientemente de monocitos circulantes (38), éstos pueden complementar a estos subgrupos. Así los monocitos y sus descendientes forman un

conjunto de células de gran plasticidad y dinamismo que junto a los fagocitos mononucleares residentes en tejido (39), contribuyen en procesos fisiológicos teniendo actividad similar a CD (CD-like) o a macrófago (macrófago-like).

Ontogenia

Los monocitos junto a los macrófagos, CD y granulocitos representan un subgrupo de leucocitos, llamados células mieloides. Durante el desarrollo embrionario de los mamíferos, la mielopoyesis comienza en el saco vitelino y termina en la médula ósea (MO)(40). Investigaciones recientes en modelos murinos (41) han ayudado a entender las vías de desarrollo y las relaciones de linaje en este sistema (42), con intrincados caminos en su ontogenia que conducen a la heterogeneidad en el fenotipo, la funcionalidad y su diferenciación. Así en MO las células madres hematopoyéticas (HSCs, del inglés *haematopoietic stem cells*) se diferencian en un progenitor de macrófagos y CD (MDP, del inglés *macrophage and dendritic cell precursor*) que expresa CD117 (también llamado KIT), CSF1R y CD135. La pérdida de este último marcador da origen a una población intermedia conocida recientemente como progenitor de monocitos común (cMoP, del inglés *common monocyte progenitor intermediates*) que termina su diferenciación a monocitos en la MO. Estos monocitos emigran hacia la circulación sanguínea en respuesta a la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) (43).

1.2.2 Subgrupos de Monocitos

En seres humanos se han identificado, tres poblaciones de monocitos circulantes en sangre periférica, según la intensidad de expresión alta (hi, del inglés *high*), media (mid, del inglés *middle*) o baja (low, del inglés *low*) de los marcadores CD14 y CD16. Así como se muestra en la Figura 4 podemos diferenciar a los monocitos clásicos CD14^{hi}/CD16⁻, los no clásicos CD14^{-low}/CD16^{hi} (44) y una población intermedia CD14^{hi}/CD16^{mid} (45). A su vez en ratones se identificaron dos subgrupos en sangre, los monocitos LY6C^{hi} CX₃CR1^{mid}CCR2⁺CD62L⁺CD43^{low} y los LY6C^{low}CX₃CR1^{hi}CCR2⁻CD62L⁻CD43^{hi} (46). A través de perfiles de expresión génica, la población de monocitos humanos CD14^{hi}/CD16⁻ se equipara con LY6C^{hi} de ratón y

la de CD14^{-/low} / CD16^{hi} con LY6C^{low} (35). Existe evidencia que los monocitos LY6C^{low} y su contraparte en humanos CD14^{-/low} / CD16^{hi} pueden diferenciarse a macrófagos en vasos sanguíneos cuya función es mantener la integridad endotelial (47). Estudios de microscopia intravital han permitido observar que los LY6C^{low} y CD14^{-/low} / CD16^{hi} patrullan la superficie luminal del endotelio y responden a través de Toll-like receptor 7 (TLR7) a las señales de daño locales, induciendo el reclutamiento de neutrófilos y regenerando el epitelio (48). Por el contrario los monocitos LY6C^{hi} y CD14^{hi}/CD16⁻ son reclutados a sitios de inflamación. Así, luego de una estimulación antigénica estas células dejan la circulación emigrando a través de la pared de los vasos sanguíneos hacia el tejido periférico, donde se diferencian a macrófagos y CD. El rápido reclutamiento de los monocitos clásicos a sitios de inflamación y lesión, hacen de estas células versátiles un componente clave de la respuesta del huésped frente a la injuria del patógenos (42). Sin embargo, esto también puede tener efecto perjudicial en el huésped, ya que estas células pueden contribuir a la difusión de patógenos y actuar como 'caballos de Troya' introduciendo microorganismos a los diferentes tejidos (46).

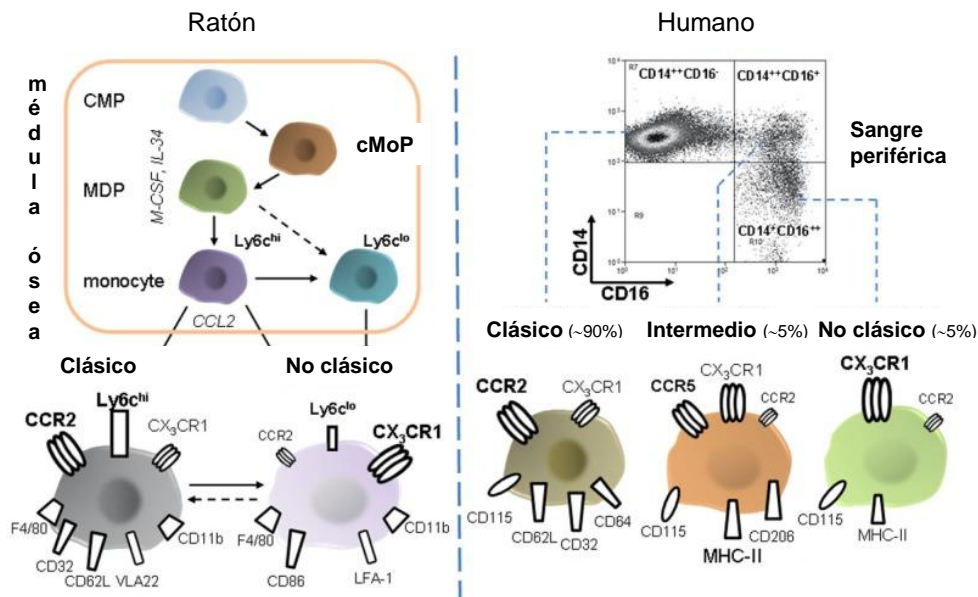


Figura 4. Desarrollo y expresión de marcadores de superficie de los subgrupos de monocitos murinos y humanos. Obtenido de Zimmermann y col (2012) (49). El desarrollo de monocitos a partir de un progenitor mieloide común (CMP) ocurre en la médula ósea bajo el control de M-CSF e IL-34. Un progenitor de macrófagos y CD (MDP, del inglés *macrophage and dendritic cell precursor*) da lugar a monocitos Ly6c^{hi} y probablemente también a monocitos Ly6c^{lo}. La salida de médula ósea está dirigida por CCR2. Los Ly6c^{hi} periféricos pueden transferirse de nuevo a la médula ósea y posiblemente transdiferenciarse en monocitos Ly6c^{lo}, proceso que también podría ocurrir en la periferia. Los subconjuntos de monocitos murinos expresan constantemente F4 / 80 y CD11b. Los Ly6c^{hi} clásicos se caracterizan por una alta expresión de CCR2 pero sólo con niveles moderados del receptor de CX3CR1. Además, expresan varios receptores de captura (por ejemplo, CD32), ligando de selectina CD62L y la integrina VLA - 2. Ly6c^{lo} son menos abundantes en la periferia y expresan de manera elevada CX3CR1, CD86 y LFA-1 mientras que CCR2 está casi ausente. La gráfica de puntos FACS en la esquina superior derecha ilustra la distribución característica de subconjuntos de monocitos humanos en sangre periférica. Los monocitos denominados clásicos poseen alta expresión de CCR2, CD14 y no expresan CD16 (identificados como CCR2⁺ CD14⁺⁺ CD16⁻). A su vez, los monocitos intermedios y no clásicos se definen porque expresan CD16, también CX3CR1 y una densidad variable de expresión de CD14 y son mucho menos abundantes. Abreviaturas: CPM, progenitor mieloide común; GMP, progenitor granulocitos-monocitos; LFA - 1, antígeno 1 de función de linfocitos; M - CSF, factor estimulante de colonias de macrófagos; MDP, progenitor de macrófagos y células dendríticas; VLA-2, antígeno muy tardío 2.

1.2.3 Polarización de la función de los Monocitos

Los monocitos son células de gran plasticidad en cuanto pueden adquirir distintos fenotipos funcionales influenciados por el microambiente tisular y el

estímulo externo que reciban, proceso este conocido como polarización de monocitos/macrófagos (50). Fue un desafío para los inmunólogos llegar a un consenso sobre la clasificación de los monocitos/macrófagos debido a la gran variedad de estímulos de activación, la dependencia de los resultados según la configuración experimental en particular y las diferencias de los perfiles de activación de los macrófagos entre los seres humanos y los modelos animales. Recientemente, un grupo de líderes inmunólogos han resumido los conocimientos sobre el tema y las recomendaciones para la realización de informes y experimentos (51). Inicialmente, se habían definido dos fenotipos extremos de polarización, los M1 o “monocitos o macrófagos activados clásicamente” cuando son estimulados por el interferón gama ($IFN\gamma$) o lipopolisacárido (LPS) y los M2 o “monocitos o macrófagos activados alternativamente” por IL-4 (52) (Figura 5). Los M1 secretan citoquinas proinflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés *tumor necrosis factor*), interleuquinas (IL) -6, IL-1 β , IL-12, IL-18 y expresan sobre superficie las moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II y moléculas coestimuladoras. Por ello son células con elevada capacidad microbicida e involucradas en la respuesta inflamatoria contra patógenos. Los monocitos/macrófagos M2, a su vez, presentan varios subtipos denominados M2a, b, c, dependiendo de los estímulos de activación. Así como observamos en la Figura 5, los M2a son activados por IL-4, los M2b son activados por complejos inmunes y los M2c por IL-10. Cada uno de estos subtipos posee un patrón de secreción característico, expresan distintos marcadores de superficie y tienen funciones biológicas definidas. Así los M2a tienen fuertes propiedades antiinflamatorias y son consideradas células reparadoras de tejidos (53). Los M2a tienen escasa capacidad fagocítica y participan en la formación de la matriz extracelular mediante la estimulación de la producción de colágeno. Los M2a expresan antagonista del receptor IL-1 (IL-1ra) y secretan CCL18, factor transformante del crecimiento beta (TGF β , del inglés: *transforming growth factor β*) y enzimas remodeladoras. Los macrófagos M2b y M2c producen IL-10, expresan el receptor de manosa (CD206) y diferentes receptores de quimiocinas. En cuanto a su función, ambos subtipos se consideran reguladores, ya que poseen actividad antiinflamatoria y supresora (54).

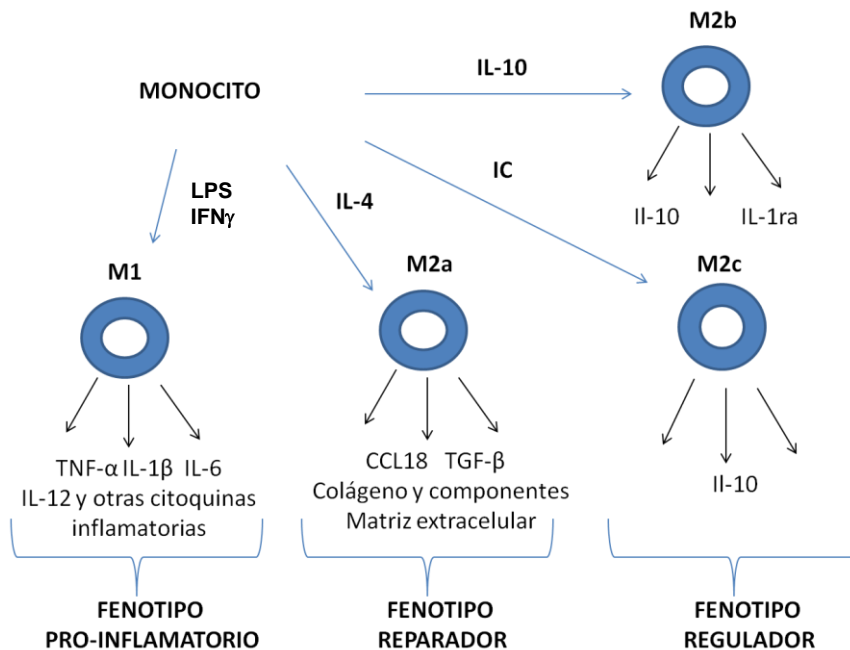


Figura 5. Esquema simplificado de polarización de activación de monocitos. LPS: lipopolisacáridos bacterianos; IC: inmunocomplejos; IFN γ : interferón gamma; IL: interleuquina; TNF α : factor de necrosis tumoral-alfa; TGF- β : factor de crecimiento transformante beta; CCL18: CC ligando quimiocina 18. Adaptado de Ivanova y col. (2016) (55).

A nivel experimental *in vitro* se puede inducir la polarización hacia el fenotipo M1 mediante ligandos de receptores tipo Toll (TLRs, del inglés *toll-like receptor*), incluyendo el TNF, LPS, y el IFN γ (56) y también hacia el perfil M2, usando los estímulos adecuados. Hay consenso entre los inmunólogos en considerar que los monocitos/macrófagos más que conformar subpoblaciones estancas, están programados para desarrollar cualquier fenotipo funcional, son células que poseen flexibilidad funcional pudiendo adoptar diferentes fenotipos dependiendo del contexto en el que se activen y las señales microambientales que reciban (57).

1.2.4 Receptores de reconocimiento y activación de Monocitos.

El primer evento en la infección del monocito por el virus es el reconocimiento de moléculas dianas que permiten la endocitosis mediada por receptor. La glicoproteína de envoltura E de los flavivirus, es crítica para su infectividad, ya que media la unión del virus a receptores celulares (9). La gran variedad de tipos de células susceptibles de ser infectadas por flavivirus, sugiere que la glicoproteína E reconoce diferentes dianas moleculares (58). Se han propuesto varias moléculas de superficie sobre el monocito que facilitarían el ingreso de los flavivirus, incluyendo glicosaminoglicanos, tales como lectinas, el receptor de manosa (RM), el receptor de LPS CD14(59) y de las proteínas inducidas por el estrés, tales como las proteínas de choque térmico (HSP) 70 y 90 (60).

Uno de los receptores más estudiados en la interacción con los flavivirus es la lectina tipo C, DC-SIGN (*del inglés dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-Integrin* (58). Esta molécula se expresa en altos niveles en CD derivada de monocitos (CDmo) *in vitro*, y a niveles más bajos en los macrófagos. Está demostrado para cepas de WNV linaje I, que DC-SIGN interacciona con la glicoproteína E glicosilada, permitiendo el ingreso del virus (61).

El RM es otro receptor de lectina que se expresa esencialmente en los monocitos y macrófagos, pero también en ganglios linfáticos, células endoteliales del hígado, células del riñón y en algunas poblaciones de CD, todos relevantes para la infección por flavivirus (58). Tanto el RM como DC-SIGN luego de unirse a los viriones, los internalizan por endocitosis dependiente de clatrina (62).

La importancia de la interacción con el DC-SIGN en el tropismo de los flavivirus y su patogénesis se demostró recientemente con la identificación de un polimorfismo de nucleótido en el promotor de DC-SIGN asociado con una predisposición a las formas graves de dengue hemorrágico (DH) (63) y encefalitis transmitida por garrapatas (64). Se ha demostrado que el RM se une a la glicoproteína E de los cuatro serotipos de DENV y que el bloqueo de este receptor inhibe la infección (65). Todavía no se ha dilucidado el rol del RM en la patogénesis de la infección por flavivirus, como se ha hecho con el DC-SIGN, ya que no hay evidencias *in vivo*, tales como asociaciones de polimorfismos genéticos humanos de RM implicadas en la gravedad de la enfermedad por flavivirus.

Otro receptor que se expresa en monocitos, es el CLEC5A (*del inglés: C-type lectin domain family 5 member A*). En modelo murino, se demostró que la interacción

de CLEC5A con JEV no promueve la infección, pero desencadena la liberación de citoquinas proinflamatorias de los macrófagos y microglia, causando inflamación, fuga vascular y muerte celular (66). Estos efectos pueden prevenirse mediante el bloqueo de las interacciones virus-receptor con anticuerpos neutralizantes contra CLEC5A, lo que sugiere que esta molécula juega un papel crucial en la patogénesis de este virus, en particular en la progresión hacia las formas graves de la enfermedad.

Las consecuencias de la unión de los flavivirus con los receptores mencionados se resumen en la Figura 6. En células de mamíferos (Figura 6-A) DC-SIGN y el RM se unen a los viriones y facilitan su entrada por endocitosis, en cambio la unión de un flavivirus a CLEC5A (Figura 6-B) desencadena la fosforilación de la proteína DAP12 y la activación de vías de señalización que conducen a la liberación de citoquinas proinflamatorias e incrementan la gravedad de la enfermedad (58).

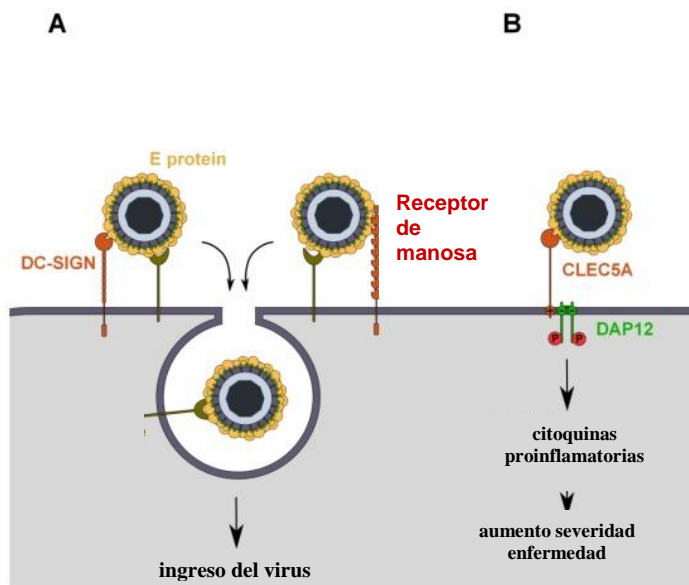


Figura 6. Esquema de la interacción e implicancias de la unión de los flavivirus a los receptores de lectina tipo C en células de mamíferos. (A) Receptores DC-SIGN y RM. (B) Receptor CLEC5A. Obtenido de Perera-Lecoin y col. (2014) (58).

La importancia del CD14 como receptor se observó comprobando que LPS bacterianos bloqueaban el ingreso de DENV en monocitos humanos a través de su receptor CD14 y que la integridad en la estructura de este antígeno celular era esencial para el inicio de una infección por dicho virus (59).

Recientemente un nuevo grupo de receptores transmembrana, denominados TIM (del inglés *T-cell immunoglobulin and mucin domain*) y TAM (involucra a las proteinquinasas TYRO3, AXL y MER) fueron identificados como responsables para la infección celular por distintos flavivirus (67). Se ha demostrado que estas moléculas, que se unen a la fosfatidilserina promoviendo la fagocitosis de células apoptóticas (68), también participan en el ingreso del DENV y WNV al monocito (58).

Otros receptores cuya participación en la infección por flavivirus se ha estudiado ampliamente son los TLR (Figura 7). Estos receptores al interactuar con un ligando PAMP del virus inducen la producción de IFN α/β (69) y de citoquinas proinflamatorias TNF, IL-1, 6, 8 y 18 con importantes funciones antivirales (70). También se comprobó que las señales que dependen de TLR median efectos inmunopatogénicos, como la apoptosis (71), por lo que TLR determinan la patogénesis del virus. En función de lo mencionado, algunas estrategias terapéuticas o profilácticas antivirales se basan en la estimulación o inhibición de los TLR mediante los agonistas o antagonistas respectivos (72).

Los estudios *in vivo* con distintos flavivirus han demostrado que los TLR son importantes no sólo para promover la inmunidad y el control de la replicación del virus sino también por estar involucrados en la fisiopatogénesis de la infección. Con WNV se observó que la desregulación de TLR-7 contribuye a una pobre respuesta de la inmunidad innata y adaptativa y aumenta la vulnerabilidad a la infección en ratones ancianos (73). TLR-3 está señalado como un mediador clave de la encefalitis letal en ratones infectados con WNV, ya que media la producción de citoquinas proinflamatorias que alteran la BHE permitiendo el ingreso de viriones y células infectadas a SNC (74). La evidencia experimental también sugiere la participación de distintos TLR en respuesta a la infección con DENV. En este sentido, se relacionó la expresión de TLR-2 y TLR-4 en monocitos infectados con el perfil de citoquinas producidas y la severidad de la infección (75). Además se observó que la estimulación de TLR-3 es importante en el control de la replicación del DENV (76).

Los flavivirus poseen mecanismos para evitar la respuesta inmune innata. En este sentido las cascadas de señalización de TLR convergen en la activación de factores de transcripción, como IRF-3 y NF κ B (Figura 7), hecho fundamental para la inducción de IFN- α/β y el rápido establecimiento de un estado antiviral (77). Está demostrado que algunas cepas virulentas de WNV retardan la activación de estos factores lo que les permite replicar y diseminar viriones a células vecinas (78).

En general, las interacciones huésped- flavivirus mediante TLR, deben ser mejor dilucidadas. Son necesarias nuevas investigaciones para comprender mejor las consecuencias de la activación del monocito vía TLR, así como determinar si los flavivirus antagonizan directamente estas señales.

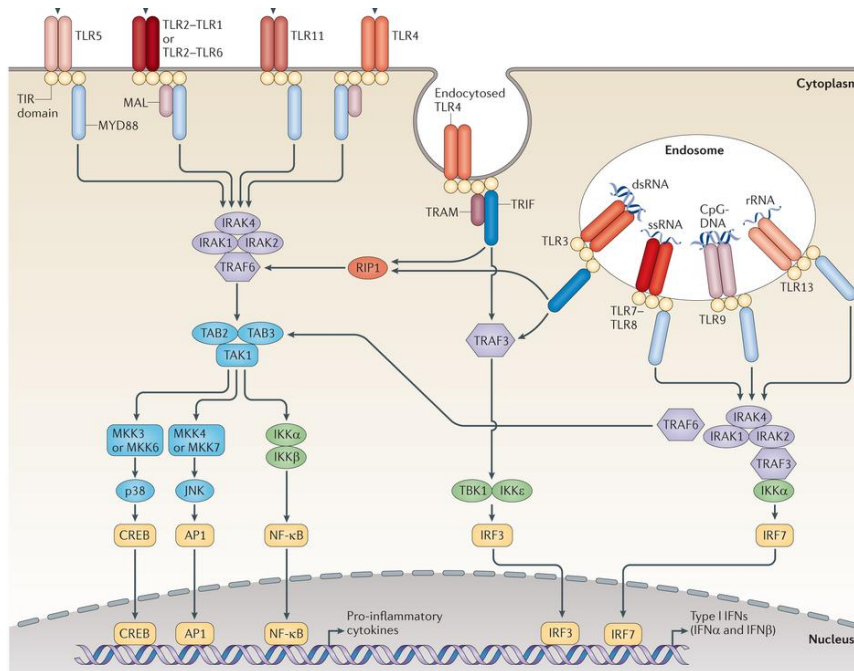


Figura 7. Expresión de TLR y vías de señalización en una célula de mamífero. Se presentan los TLRs expresados sobre superficie celular (TLR 1,2,4,5,11), los endosomales (TLR 3,7,8,13), las moléculas adaptadoras de las vías de señalización (MYD88, TRIF, TRAM) y las distintas proteinquinas que se activarán de manera secuencial para finalmente permitir la translocación nuclear de los factores de transcripción (IRF-3 y NFκB entre ellos) involucrados en la producción de IFN-α/β y citoquinas pro-inflamatorias. Obtenido de O'Neill y col. (2013) (77).

1.2.5 Producción de inmunomoduladores por monocitos activados.

En respuesta al estímulo vía interacción de PAMPs virales con los diferentes receptores de reconocimientos de PAMPs (RRP) el monocito produce un conjunto de mediadores químicos con acción inmunomoduladora que se unirán a receptores específicos regulando así la actividad de otras células (79,80). Dentro de estos se encuentran las citoquinas, proteínas pleiotrópicas, redundantes en su accionar y

multifuncionales, producidas prácticamente por todas las células en respuesta a estímulos (81). Es amplio el grupo de citoquinas liberadas por los monocitos en la infección por flavivirus, incluyendo el TNF, IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFNs α y β , TGF- β y quimiocinas como la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP del inglés *macrophage inflammatory protein*)-1 bis, MIP-1b IL-8, MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES (del inglés: *regulated upon activation normal T cell expressed and presumably secreted*), etc (82).

Estos compuestos, si bien actúan sobre los leucocitos y las células endoteliales para promover y controlar las respuestas inflamatorias tempranas, también están involucrados en la fisiopatogenia de algunos flavivirus. Así por ejemplo, en DENV se relacionan los niveles elevados de IL-6 y TNF con aumento de la permeabilidad vascular (83), mientras que TNF también está implicado en la apoptosis (84) de células inmunes y endoteliales y mayor riesgo de dengue hemorrágico (DH) (85-87). En la infección de flavivirus neurotrópicos como WNV (74) y JEV (88) se identifican a las citoquinas inflamatorias como las responsables de la ruptura de la BHE, favoreciendo la neuroinvasión viral y las manifestaciones graves por daño del SNC (89).

El rol de las citoquinas anti-inflamatorias en la fisiopatogenia de las enfermedades por flavivirus es controvertido. Así, para DENV algunos investigadores le asignan a IL-10 un rol protector, asociando elevados niveles de IL-10 con bajo riesgo de formas severas de dengue (90), otros la asocian a DH, debido a la supresión de la respuesta de células T contra DENV (91,92). Entre los flavivirus neurotrópicos se observó un rol protector de la IL-10 como inmunomoduladora de la respuesta inflamatoria en la encefalitis por JEV (79), pero no en la infección experimental con WNV, donde se vinculó a esta citoquina con el incremento de la infección (93).

Si bien es extensa la bibliografía de las implicancias de las distintas citoquinas en las consecuencias de la infección por varios flavivirus, es muy escasa en la infección por SLEV. Como antecedente está el estudio realizado por Barros y col. (2009)(94) utilizando una cepa brasilera de SLEV que determinó la producción temprana de IFN- α por macrófagos murinos infectados *in vitro*.

El monocito adquiere relevancia no sólo por su participación en la inmunidad natural contra el virus sino porque su interacción con células de la inmunidad adaptativa como los linfocitos, traerá consecuencias sobre el desarrollo de las respuestas antiviral específica y por lo tanto en la severidad de la enfermedad (54).

Así, el IFN- γ producido por células Th CD4⁺ induce la activación clásica de los monocitos a un perfil M1 (95) que se traduce en un incremento en el reconocimiento y la fagocitosis de patógenos, la liberación de citoquinas inflamatorias (TNF e IL-6) y especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) a fin de eliminar el microorganismo (79). Uno de los cambios típicos asociados con la activación del monocito es el aumento en la expresión de CMH-II, que no se expresa en general en los monocitos o macrófagos en reposo, lo que los hace más eficiente como célula presentadora de antígeno (CPA) (96). Como CPA, los monocitos activados pueden estimular a las células T y amplificar la respuesta inmune específica frente al virus condicionando el perfil de respuesta adaptativa, convirtiéndose así no sólo en células fundamentales de la respuesta inmune innata sino también siendo el nexo para el desarrollo de la inmunidad adaptativa frente al virus (9).

En síntesis, los monocitos tienen un papel protector en la inmunidad contra los patógenos, intervienen en el desarrollo de tejidos, la homeostasis y la reparación del daño tisular. A pesar de una riqueza histórica de conocimiento sobre estas células, los avances recientes han revelado aspectos desconocidos de su desarrollo, activación y diversidad funcional (57).

1.3 Apoptosis en la Infección viral

1.3.1 Mecanismo de Muerte celular por Apoptosis

El término apoptosis fue utilizado por primera vez por el grupo de Kerr y col. (1972) (97), para describir un proceso altamente controlado, orquestado por una cascada de eventos bioquímicos que conducen a cambios morfológicos que terminan en la muerte de la célula. Como se observa en la Figura 8, los cambios morfológicos se caracterizan por encogimiento celular (picnocitosis), condensación, marginación y fragmentación nuclear, ondulación (en inglés *budding*) de la membrana plasmática, y formación de cuerpos apoptóticos (organelas celulares y/o material nuclear rodeado de membrana plasmática) (98).

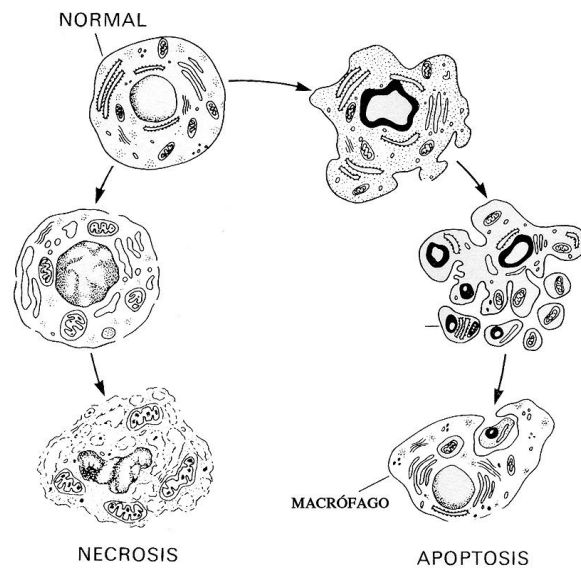


Figura 8. Ilustración de los cambios morfológicos que sufren las células en un proceso de Apoptosis (derecha) o en Necrosis (izquierda). Obtenida de Kerr y col. (1995) (99).

Los cuerpos apoptóticos rápidamente son fagocitados *in vivo* por las células vecinas y fagocitos residentes (Figura 8). Como consecuencia de ello, la apoptosis por lo general no provoca una respuesta inflamatoria ya que el contenido citoplásmico no se derrama en el medio extracelular. Además, la fagocitosis de cuerpos apoptóticos no genera activación del macrófago ni provoca liberación de citoquinas inflamatorias. En cambio, en la muerte por necrosis (Figura 8) la célula se agranda, se rompe la membrana celular, liberando su contenido al medio y generando respuesta inflamatoria (100).

Los eventos bioquímicos de la apoptosis incluyen disminución en el potencial de la membrana interna mitocondrial, activación de proteasas selectivas, fragmentación del ADN, escisión selectiva de varias proteínas celulares y la translocación de la fosfatidilserina (PS) desde el interior hacia el exterior de la membrana plasmática (101). Estos cambios son manifestaciones de una maquinaria de muerte celular conservada evolutivamente que comprende en su núcleo una familia de cisteinil-aspartato proteasas específicas denominadas caspasas (102). Frente a un estímulo apoptogénico las caspasas iniciadoras (caspasas -2, -8, -9, y -10) son reclutadas en grandes complejos de proteínas donde se oligomerizan y autoclivan (103) (Figura 9). El complejo de señalización de inducción de muerte

(DISC del inglés *death-inducing signaling complex*) y el complejo apoptosoma son los principales andamios en donde las caspasas iniciadoras se autoactivan. El ensamblaje de estos complejos de proteínas están involucrados en la señalización de la apoptosis por vía extrínseca e intrínseca, respectivamente. Las vías intrínsecas y extrínsecas comunican a través de la activación de la proteína Bid (del inglés *Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-interacting domain death agonist*) (104). La vía extrínseca se activa por la unión extracelular de ligandos tales como el TNF, Fas (FasL) y el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL del inglés *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) a sus respectivos receptores de muerte, como TNF receptor (TNF-R), Fas (CD95 /APO-1) y TRAIL-RI / II (105). Luego de la interacción con el ligando, el receptor de muerte se agrega iniciándose la formación del DISC, donde la molécula adaptadora FADD (del inglés *Fas-associated death domain*) sirve como plataforma para el reclutamiento y la activación de las caspasas-8 y -10. Por otro lado, la vía intrínseca se inicia cuando las proteínas apoptogénicas tales como citocromo C, SMAC / Diablo, y HtrA2 / Omi se liberan desde el espacio intermembrana mitocondrial al citosol en respuesta a una variedad de injurias, que actúan sobre la familia de genes Bcl-2 (genes reguladores intracelulares de la apoptosis, entre ellos gen pro-apoptótico Bax y el gen anti-apoptótico Bcl-2) (104). El citocromo C se une a la proteína adaptadora Apaf-1 (del inglés *Apoptosis protease activating factor-1*) para formar el complejo apoptosoma, que activa la caspasa-9. Una vez activadas, las caspasas iniciadoras activan proteolíticamente las caspasas ejecutoras (caspasas-3, -6 y -7). Para lograr su plena actividad, las caspasas ejecutoras deben ser liberadas de su inhibidor endógeno, la molécula XIAP (del inglés *X-linked inhibitor of apoptosis*). Esta tarea es realizada por las proteínas mitocondriales de muerte HtrA2 / Omi y SMAC /Diablo. La acción de las caspasas ejecutoras sobre un gran conjunto de sustratos se traduce en las características morfológicas y bioquímicas características del proceso apoptótico (106).

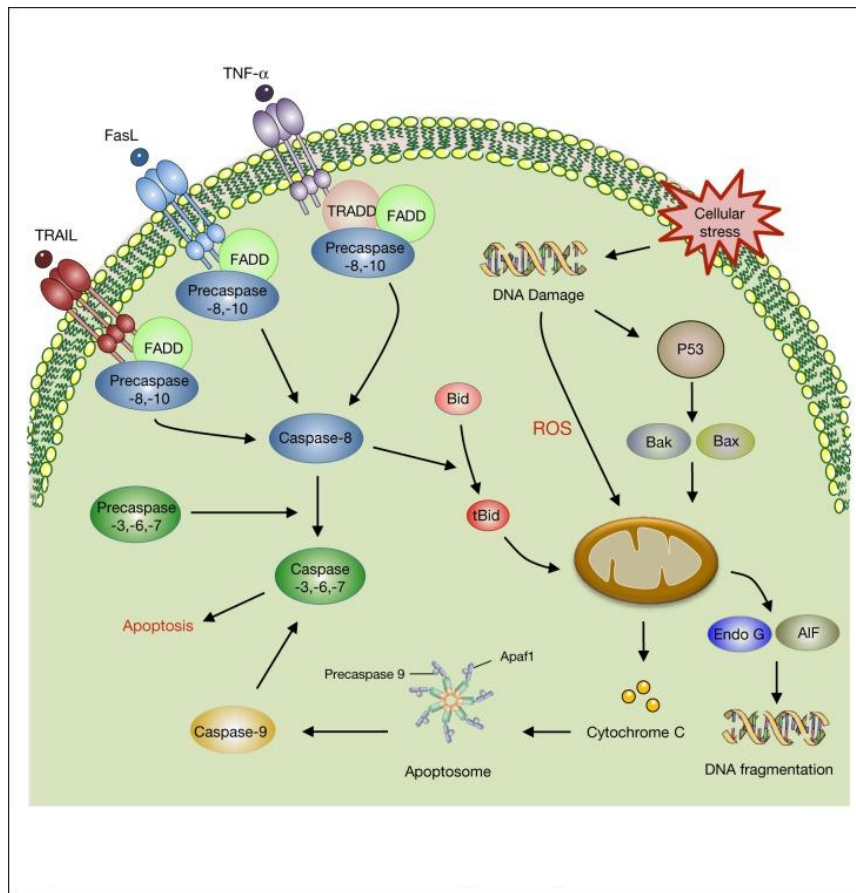


Figura 9. Representación gráfica de las vías de señalización de la apoptosis. Obtenido de Iranpour y col. (2016) (107). La apoptosis se inicia a través de dos rutas diferentes, que incluyen las vías apoptóticas extrínseca e intrínseca. Las señales extrínsecas son iniciadas por ligandos de muerte celular (por ejemplo, FasL, APO-2L, TRAIL, TNF) y activan FADD y posteriormente escinden pro-caspasa-8. La escisión de pro-caspasas-8 y -10 inicia la activación de caspasas efectoras incluyendo caspasas-3, -6 y -7. La vía intrínseca se estimula a través del daño del ADN que activa p53 e induce la apoptosis de una manera dependiente de la mitocondria. En este contexto se genera un desbalance entre las proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas de la familia de las Bcl-2 lo que lleva a la liberación de citocromo C. El citocromo C liberado puede activar la caspasa-9 que a su vez activa la caspasa-3. También existe una vía de apoptosis mitocondrial independiente de caspasa-3, mediada por AIF y endo G que hidrolizan el ADN. Abreviaturas: FasL: Ligando de Fas (Apo - 1 / CD95), TRAIL: ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (del inglés *TNF-related apoptosis-inducing ligand*); FADD: del inglés *Fas-associated death domain*; Apaf-1: del inglés *Apoptosis protease activating factor-1*; AIF: del inglés *apoptosis inductor factor*; endo G: endonucleasa G.

1.3.2 Apoptosis de la célula huésped en la infección por Flavivirus

Es importante destacar que los virus, al ser patógenos intracelulares obligados, pueden inhibir o retardar la apoptosis de la célula hospedadora, para garantizar su replicación y supervivencia. En los flavivirus, la apoptosis constituye un factor importante en la patogénesis de la infección ya que está relacionada con la severidad de las manifestaciones clínicas y la progresión de la enfermedad (108).

La apoptosis puede ser inducida por el virus vivo o proteínas virales y, tal como se muestra en la Figura 10, lo hacen interviniendo a diferentes niveles de señalización de las vías extrínseca e intrínseca. Se ha demostrado que uno de los mecanismos involucrados en la apoptosis de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) infectadas por DENV, sería a través de la interacción de los ligandos de muerte y sus receptores, ya que se hallaron niveles elevados TNF en sobrenadante de cultivo y aumento en la expresión del receptor Fas (CD95 /APO-1) en las CMSP infectadas *in vitro* (109) e *in vivo* (110). Además se observó que proteínas virales del DENV serían las responsables de aumentar la expresión de los receptores de muerte y de caspasa-3 (111). Se demostró también que durante esta infección se incrementan los niveles de ROS y NO que inducen apoptosis por vía intrínseca de células endoteliales (112). Se ha relacionado la apoptosis de CMSP en niños con DENV con la severidad de la enfermedad (110). El WNV, al igual que DENV, induce apoptosis por ambas vías. Se han identificado mecanismos mediados por Bax (113) y caspasa-3 (114). Además, la observación de que mediante antimicrobianos se inhibían de manera conjunta la replicación viral de WNV y la apoptosis, hace pensar que compartirían una vía común de señalización (115). Para JEV se ha visto que induce apoptosis por vía mitocondrial a través de la producción de ROS por retículo endoplásmico (116) y activación de caspasa- 9 (117) y caspasa- 3 (118) y por vía extrínseca por activación de caspasa- 8 (119). En la infección por SLEV son muy escasos los conocimientos que se tienen al respecto. Parquet y col. (2002)(120) observaron que SLEV-cepa Parton induce apoptosis por vía intrínseca en células mieloides y neuronales mediante el aumento de la expresión del gen pro-apoptótico Bax.

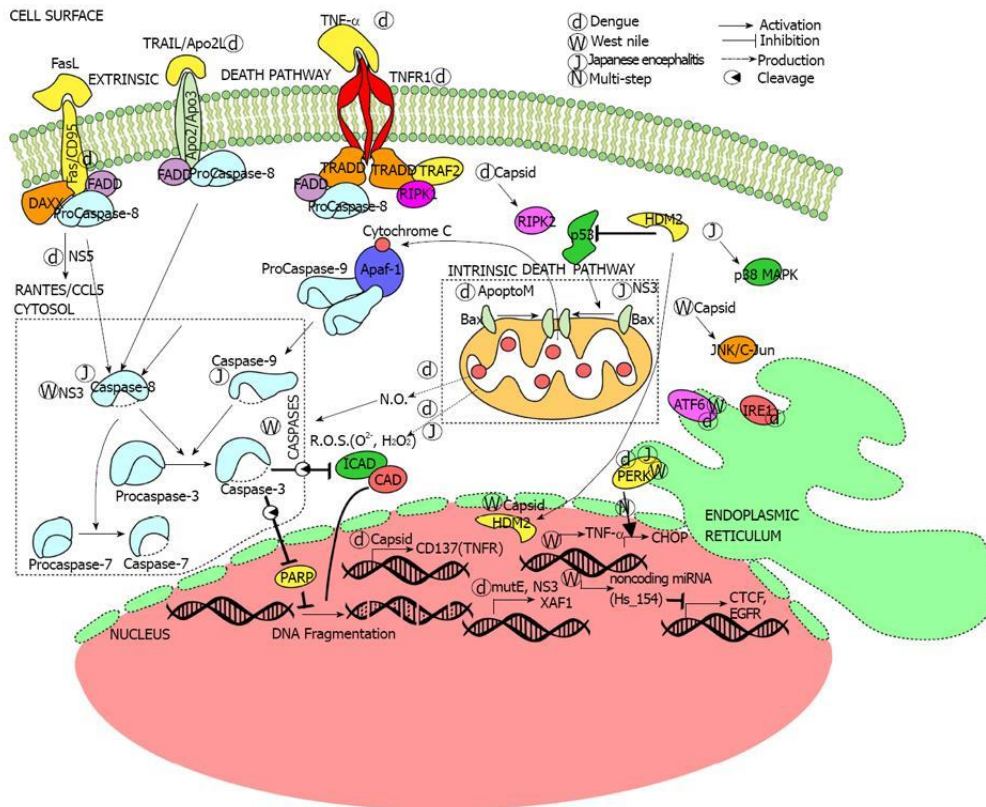


Figura 10. Vías de muerte o supervivencia en la infección por Flavivirus. Obtenido de Ghosh y col (2014)(108). Las vías de muerte celular extrínseca e intrínseca se activan durante la infección viral (d, w y j identifican al virus vivo o proteína viral correspondiente al virus dengue, del Nilo occidental (o west Nile) y de la encefalitis japonesa, respectivamente). Los Flavivirus también pueden activar la apoptosis mediante la señalización vía retículo endoplásmico y aumentar los productos relacionados con el metabolismo celular (ROS y RNS).

Numerosos estudios reflejan que la inducción o inhibición de la apoptosis de la célula hospedadora infectada depende de un delicado balance entre las estrategias pro-apoptóticas y antiapoptóticas desarrolladas durante la interacción hospedador-patógeno (100). La patogenicidad de los flavivirus radica en su habilidad para infectar diferentes tipos de células, replicar en ellas y causarles la muerte por apoptosis (107,108). Además, si la célula infectada es un monocito, la inducción o no de la apoptosis tendrá consecuencias sobre el desarrollo de la respuesta inmune

frente al agente invasor, reforzando su importancia en la fisiopatogenia de la infección por SLEV y nuestro interés en estudiar este proceso.

1.4 Patogénesis de la enfermedad neuroinvasiva por Flavivirus: compromiso de los monocitos y la apoptosis.

Luego de que un flavivirus se inocula en dermis mediante la picadura de un mosquito infectado, se reclutan monocitos desde MO al sitio de la infección, iniciándose la respuesta inflamatoria (Figura 11). El reclutamiento de los monocitos es clave en la primera línea de defensa y en el control de la propagación viral (8). La diferenciación de estos monocitos en células inflamatorias M1 en piel y nódulos linfáticos (NL) satélites, puede limitar la difusión viral temprana ya que inducen un estado antiviral que promueve la erradicación del virus (121). Así las células M1 pueden limitar la infección por la depuración viral directa (*clearence viral*) mediante la producción de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y demás compuestos antivirales e intervenir en la generación de la respuesta adaptativa, comportándose como CPA. Si el virus logra evadir la respuesta primaria de protección se produce su diseminación a NL y sangre, generándose una viremia primaria y la infección de otros tejidos. Tras el establecimiento de la infección inicial, la diseminación del virus a través del torrente sanguíneo se asocia temporalmente con enfermedad febril e infección sistémica. En la mayoría de los casos la curva de viremia presenta un pico de corta duración (2 a 3 días) seguido de una rápida declinación (23). Los monocitos y macrófagos son las células principales que facilitan la replicación viral durante esta fase de la enfermedad. Los sitios de replicación se ubican en distintos tejidos extra neurales como bazo, corazón, pulmón, riñón, músculo esquelético, duodeno, páncreas y timo. Esto genera la activación de monocitos y macrófagos en los órganos infectados y la producción exacerbada de citoquinas proinflamatorias, con consecuencias devastadoras para el cerebro (122). Está postulado, para WNV, que por la vía del TNF se induce la producción de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) que alteran la integridad de la BHE y permiten la neuroinvasión viral. Otro mecanismo sugerido es el generado por la respuesta inflamatoria que permitiría la infiltración de monocitos infectados a SNC vía interacción de quimioquinas (CCL2, CCL5, CXCL10) con sus receptores respectivos (11,123,124). Este mecanismo de llegada de virus a cerebro se conoce como hipótesis de "caballo de Troya" (125). De

esta manera se establece una respuesta inmune inflamatoria en SNC y apoptosis de células nerviosas con efectos deletéreos y manifestaciones clínicas severas, como meningitis, encefalitis o meningoencefalitis (8,89).

Aún no está completamente esclarecido cuánto daño cerebral es debido a la muerte celular inducida por el virus, cuánto a la apoptosis y cuánto al proceso inflamatorio en SNC.

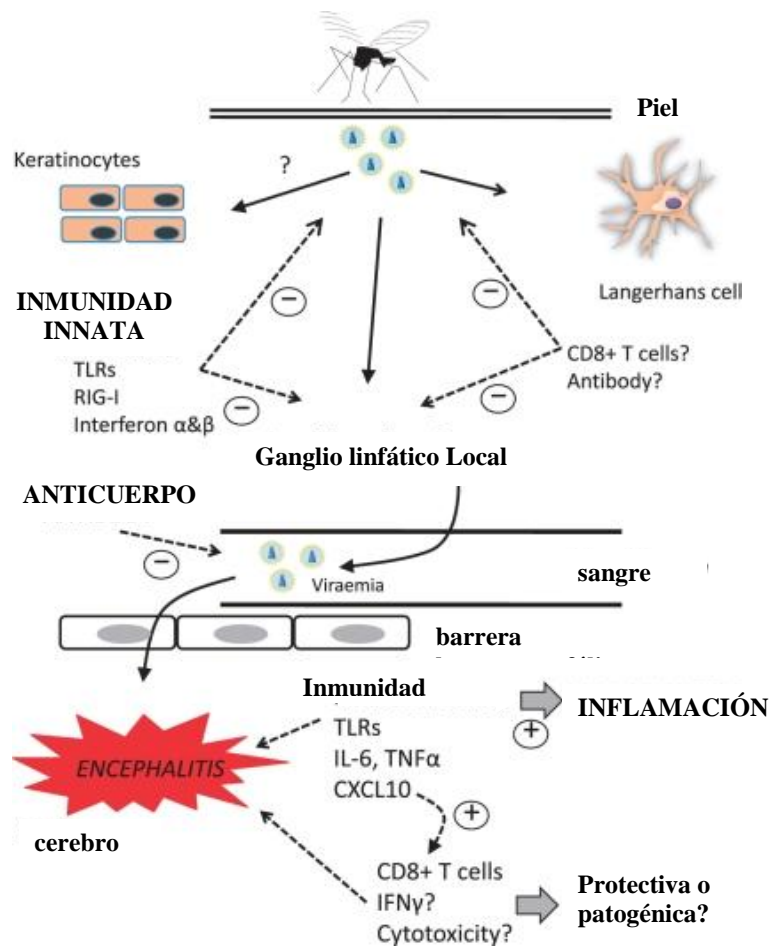


Figura 11. Patogénesis de la encefalitis por flavivirus. Los mecanismos claves en el control inmunológico de la infección por flavivirus se muestran en mayúsculas. Obtenido y adaptado de Turtle y col (2012)(7).

1.5 Bibliografía

1. Gubler D, Kuno G, Markoff L. Flaviviruses. In: Eds. Lippincott Williams & Wilkins., editor. In *Fields Virology*. New York, USA.; 2007. p. 1155–97.
2. Spinsanti LI, Díaz LA, Glatstein N, Arselán S, Morales MA, Farías AA, et al. Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005. *J Clin Virol*. 2008;42(1):27–33.
3. Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, Garcia JB, Vissani A, Trono K, et al. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(10):1559–61.
4. Avilés G, Rangeón G, Vorndam V, Briones A, Baroni P. Dengue Reemergence in Argentina. 1999;5(4):575–8.
5. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación Argentina. N° 327 – SE 37 – Septiembre de 2016. *Boletín Integrado de Vigilancia*. 2016.
6. Diaz LA, Ré V, Almirón WR, Farías A, Vázquez A, Sanchez-Seco MP, et al. Genotype III Saint Louis encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(11):1752–4.
7. Turtle L, Griffiths MJ, Solomon T. Encephalitis caused by flaviviruses. *Qjm*. 2012;105(3):219–23.
8. Dahm TA-O, Rudolph HA-O, Schwerk CA-O, Schrotten H, Tenenbaum TA-O, Mediators I. Neuroinvasion and Inflammation in Viral Central Nervous System Infections. *Mediators Inflamm*. Hindawi Publishing Corporation; 2016;2016:1466–1861 (Electronic).
9. Ashhurst TM, Vreden C Van, Munoz-Erazo L, Niewold P, Watabe K, Terry RL, et al. Antiviral macrophage responses in flavivirus encephalitis. *Indian J Med Res*. 2013;138:632–47.
10. Ye J, Zhu B, Fu ZF, Chen H, Cao S. Immune evasion strategies of flaviviruses. *Vaccine*. 2013;31(3):461–71.
11. Terry RL, Getts DR, Deffrasnes C, van Vreden C, Campbell IL, King NJC. Inflammatory monocytes and the pathogenesis of viral encephalitis. *J Neuroinflammation*. *Journal of Neuroinflammation*. 2012;9(1):270
12. Mukhopadhyay S, Kim BS, Chipman PR, Rossmann MG, Kuhn RJ. Structure

- of West Nile Virus. *Science*. 2003;302(5643):248.
13. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev S V, Corver J, Lenches E, et al. Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization , Maturation , and Fusion. *Cell*. 2002;108:717–25.
 14. Nybakken GE, Nelson CA, Chen BR, Diamond MS, Fremont DH. Crystal Structure of the West Nile Virus Envelope Glycoprotein. *J Virol*. 2006;80(23):11467–74.
 15. Brinton MA. Replication Cycle and Molecular Biology of the West Nile Virus. *Viruses*. 2013;6(1):13–53.
 16. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the Genus *Flavivirus*. *J Virol*. 1998;72(1):73–83.
 17. Rodrigues SG, Nunes MR, Casseb SM, Prazeres AS, Rodrigues DS, Silva MO, et al. 2010. Molecular epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon: genetic divergence and dispersal. *J Gen Virol*. 2010;91:2420–7.
 18. Paul D, Bartenschlager R. Flaviviridae Replication Organelles: Oh , What a Tangled Web We Weave. *Annu Rev Virol*. 2015;2:289–310.
 19. Stiasny K, Heinz FX. Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol*. 2006;87:2755–66.
 20. McLean R., Bowen GS. Vertebrate hosts. In: St. Louis encephalitis. Ed. Monath, T.P. American Public Health Association, Washington, DC. 381-450. In 1980. p. 381–450.
 21. Diaz LA. Patrones de Actividad y Estacionalitis en Córdoba, Argentina. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. 2009.
 22. Batallán PG. Bionomía de *Culex* interfor Dyar (Culicidae) en Córdoba, Argentina. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. 2013.
 23. Lindenbach BD, Rice CM. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 2007th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2007. p. 1101–51.
 24. Muckenfuss, R. S., Armstrong C, Webster LT. Etiology of the 1933 epidemic of encephalitis. *Jama*. 1934;103:731–3.
 25. Lumsden L. St. Louis encephalitis in 1933. *Obs Epidemiol Featur Public Heal Rep*. 1958;73:340–353.

26. Sabattini MS, Avilés G, Monath TP. Historical epidemiological and ecological aspects of arbovirus in Argentina: Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae. Ed. Travassos da Rosa, APA, Vasconcelos P and T, editor. In: An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. 1998. 135-153 p.
27. Seijo A, Morales A, Poustis G, Romer Y, Efron E, Vilora G, et al. Outbreak of St. Louis encephalitis in the Metropolitan Buenos Aires Area. *Medicina (B Aires)*. 2011;71(3):211–7.
28. Rivarola ME, Tauro LB, Llinás GA, Contigiani MS. Virulence variation among epidemic and non-epidemic strains of Saint Louis encephalitis virus circulating in Argentina. *Memórias do Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(2):197–201.
29. Diaz LA, Nemeth NM, Bowen RA, Almiron WR, Contigiani MS. Comparison of Argentinean Saint Louis encephalitis virus non-epidemic and epidemic strain infections in an avian model. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(5):1–7.
30. Mettler N, Casals J. Isolation of St. Louis encephalitis virus from man in Argentina. *Acta Virol*. 15:148-154. *Acta Virol*. 1971;15:148–54.
31. Mitchell C, Darsie RJ, Monath T, Sabattini M, Daffner J. The use of an animal-baited net trap for collecting mosquitoes during western equine encephalitis investigations in Argentina. *J Am Mosq Control Assoc*. 1985;1:43–7.
32. Mitchell CJ, Monath TP, Sabattini MS, Daffner JF, Cropp CB, Calisher CH, et al. Arbovirus isolations from mosquitoes collected during and after the 1982-1983 epizootic of western equine encephalitis in Argentina. *Am J Trop Med Hyg*. 1987;36(1):107–13.
33. Sabattini MS. Arbovirus del grupo B en la República Argentina. Su estudio en aves y roedores. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Rosario, Argentina. 1969.
34. Etzrodt M, Cortez-Retamozo V, Newton A, Zhao J, Ng A, Wildgruber M, et al. Regulation of monocyte functional heterogeneity by miR-146a and Relb. *Cell Rep*. 2012;1(4):317–24.
35. Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, et al. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood*. 2010;115(3):10–20.
36. Mildner A, Chapnik E, Manor O, Yona S, Kim K, Aychek T, et al. Mononuclear phagocyte miRNome analysis identifies miR-142 as critical regulator of murine dendritic cell homeostasis. *Blood*. 2013;121(6):1016–28.

37. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Panizzi P, Figueiredo J, et al. Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science*. 2010;325(5940):612–6.
38. Yona S, Kim K-W, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*. 2012;38(1):79–91.
39. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beth M, Leboeuf M, et al. Tissue resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2014;38(4):1-25.
40. Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*. 2016;44(3):439–49.
41. Kleer I De, Willems F, Lambrecht B, Goriely S. Ontogeny of myeloid cells. *Front Immunol*. 2014;5:1–11.
42. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Ley K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science*. 2010;327(5966):656–61.
43. Reynolds G, Haniffa M. Human and mouse mononuclear phagocyte networks: a tale of two species? *Front Immunol*. 2015;6(June):1–15.
44. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock H. Identification and Characterization of a Novel Monocyte Subpopulation in Human Peripheral Blood. *J Exp Med*. 1989;74: 2527-34.
45. Ziegler-Heitbrock L, Thomas P, Hofer J. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front Immunol*. 2013;4(February):1–5.
46. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity*. 2003;19:71–82.
47. Auffray C, Fogg DK, Narni-Mancinelli E, Senechal B, Trouillet C, Saederup N, et al. CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med*. 2009;206(3):595–606.
48. Carlin LM, Stamatziades EG, Auffray C, Hanna RN, Glover L, Vizcay-barrena G, et al. Monitor Endothelial Cells and Orchestrate Their Disposal. *Cell*. 2013;153(2):362–75.
49. Zimmermann HW, Trautwein C, Tacke F. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Front Physiol*. 2012;3(October):1–18.

50. Mantovani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol.* 2007;37(1):14–6.
51. Murray PJ, Allen JE, Fisher EA, Lawrence T. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity.* 2014;41(1):14–20.
52. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 2009;27(December 2008):451–83.
53. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: The role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med.* 2013;16(2008):19–25.
54. Fleming BD, Mosser DM. Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy. *Eur J Immunol.* 2015;41(9):2498–502.
55. Ivanova EA, Orekhov AN. Monocyte Activation in Immunopathology: Cellular Test for Development of Diagnostics and Therapy. *J Immunol Res.* Hindawi Publishing Corporation; 2016;1–9.
56. Paoli F De, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. Macrophage Phenotypes and Their Modulation in Atherosclerosis. *Circ J.* 2014;78(August):1775–81.
57. Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, Ochando J, Biswas SK. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol.* 2016;17:34–40.
58. Perera-Lecoin M, Meertens L, Carnec X, Amara A. Flavivirus Entry Receptors: An Update. *Viruses.* 2014;6:69–88.
59. Chen YC, Wang SY, King CC. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol.* 1999;73(4):2650–7.
60. Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceicao TM, Higa LM, Castanho MARB, Da Poian AT. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol Rev.* 2015;39(November 2014):155–70.
61. Martina BE, Koraka P, Van den Doel P, Rimmelzwaan GF, Haagmans BL, Osterhaus ADME. DC-SIGN enhances infection of cells with glycosylated West Nile virus in vitro and virus replication in human dendritic cells induces production of IFN- α and TNF- α . *Virus Res.* 2008;135(1):64–71.
62. Schweizer A, Stahl PD, Rohrer J. A di-aromatic motif in the cytosolic tail of the mannose receptor mediates endosomal sorting. *J Biol Chem.* 2000;275(38):29694–700.

63. Wang L, Chen RF, Liu JW, Lee IK, Lee CP, Kuo HC, et al. DC-SIGN (CD209) promoter -336 A/G polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN expression and immune augmentation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(1):1-10.
64. Barkhash AV, Perelygin AA, Babenko VN, Brinton MA, Voevoda MI. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of the CD209 gene is associated with human predisposition to severe forms of tick-borne encephalitis. *Antiviral Res*. 2012;93(1):64–8.
65. Dejnirattisai W, Webb AI, Chan V, Jumnainsong A, Davidson A, Mongkolsapaya J, et al. Lectin switching during dengue virus infection. *J Infect Dis*. 2011;203(12):1775–83.
66. Chen ST, Liu RS, Wu MF, Lin YL, Chen SY, Tan DTW, et al. CLEC5A regulates Japanese encephalitis virus-induced neuroinflammation and lethality. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):1-18.
67. Moller-Tank S, Kondratowicz AS, Davey RA, Rennert PD, Maury W. Role of the phosphatidylserine receptor TIM-1 in enveloped-virus entry. *J Virol*. 2013;87(15):8327–41.
68. Carnec X, Meertens L, Dejarnac O, Perera-lecoin M, Hafirassou L. The Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine Receptor CD300a Binds Dengue Virus and Enhances Infection. *J Virol*. 2016;90(1):92–102.
69. Muñoz-Jordán JL, Fredericksen BL. How flaviviruses activate and suppress the interferon response. *Viruses*. 2010;2(2):676–91.
70. Suthar MS, Aguirre S, Fernandez-Sesma A. Innate Immune Sensing of Flaviviruses. *PLoS Pathog*. 2013;9(9):5–8.
71. Vercammen E, Staal J, Beyaert R. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(1):13–25.
72. Crook KR, Miller-Kittrell M, Morrison CR, Scholle F. Modulation of innate immune signaling by the secreted form of the West Nile virus NS1 glycoprotein. *Virology*. 2014;172–82.
73. Xie G, Luo H, Pang L, Peng B-H, Winkelmann E, McGruder B, et al. Dysregulation of Toll-Like Receptor 7 Compromises Innate and Adaptive T Cell Responses and Host Resistance to an Attenuated West Nile Virus Infection in Old Mice. *J Virol*. 2016;90(3):1333–44.
74. Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal

- encephalitis. *Nat Med.* 2004;10(12):1366–73.
75. Azeredo EL, Neves-Souza PC, Alvarenga AR, Reis SRNI, Torrentes-Carvalho A, Zagne SMO, et al. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology.* 2010;130(2):202–16.
 76. Tsai YT, Chang SY, Lee CN, Kao CL. Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. *Cell Microbiol.* 2009;11(4):604–15.
 77. O'Neill LAJ, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:453–460.
 78. Fredericksen BL, Keller BC, Fornek J, Katze MG, Jr MG, Establishment and Maintenance of the Innate Antiviral Response to West Nile Virus Involves both RIG-I and MDA5 Signaling through IPS-1. *J. Virol.* 2008, 82(2):609-616.
 79. Biswas Sm, Kar S, Singh R, Chakraborty D, Vipat V, Cg R, et al. Immunomodulatory cytokines determine the outcome of Japanese encephalitis virus infection in mice . *J Med Virol.* 2010;82(2):304–10.
 80. Shi C, Pamer EG. Monocyte Recruitment During Infection and Inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2014;11(11):762–74.
 81. Khan MM. Role of Cytokines. In: Springer, editor. *Immunopharmacology.* 2008. p. 33–60.
 82. Cheng Y, Lin Y, Chen C, Wan S, Ou Y, Yu C, et al. Dengue Virus Infection Causes the Activation of Distinct NF- κ B Pathways for Inducible Nitric Oxide Synthase and TNF- α Expression in RAW264 . 7 Cells. *Mediators Inflamm.* Hindawi Publishing Corporation; 2015;2015:1–13.
 83. Puerta-Guardo H, Raya-sandino A, González-mariscal L, Rosales VH, Ayala-dávila J. The Cytokine Response of U937-Derived Macrophages Infected through Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Disrupts Cell Apical-Junction Complexes and Increases Vascular Permeability. *J Virol.* 2013;87(13):7486–501.
 84. Arias J, Valero N, Mosquera J, Montiel M, Reyes E. Increased expression of cytokines , soluble cytokine receptors , soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. *Virology.* 2014;452–453:42–51.
 85. Chen H, Hofman FM, Kung JT, Lin Y, Wu-hsieh BA. Both Virus and Tumor Necrosis Factor Alpha Are Critical for Endothelium Damage in a Mouse Model of Dengue. *J Trop Med.* 2007;81(11):5518–26.

86. Wang L, Chen R, Liu J, Yu H, Kuo H, Yang KD. Implications of Dynamic Changes among Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Membrane TNF Receptor , and Soluble TNF Receptor Levels in Regard to the Severity of Dengue Infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(2):297–302.
87. Yen Y, Chen H, Lin Y, Shieh C, Wu-hsieh BA. Enhancement by Tumor Necrosis Factor Alpha of Dengue Virus-Induced Endothelial Cell Production of Reactive Nitrogen and Oxygen Species Is Key to Hemorrhage Development. *J Virol.* 2008;82(24):12312–24.
88. Saxena V, Mathur A, Krishnani N, Dhole TN. Kinetics of cytokine profile during intraperitoneal inoculation of Japanese encephalitis virus in BALB / c mice model. *Microbes Infect.* 2008;10(10–11):1210–7.
89. Sips GJ, Wilschut J, Smit JM. Neuroinvasive flavivirus infections. *Rev Med Virol.* 2012;22:69–87.
90. Tsai T, Chuang Y, Lin Y, Wan S, Chen C, Lin C. An emerging role for the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in dengue virus infection. *J Biomed Sci. Journal of Biomedical Science;* 2013;20(1):1.
91. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Elevated Plasma Interleukin-10 Levels in Acute Dengue Correlate With Disease Severity. *J Med Virol.* 1999;59(April):329–34.
92. Malavige GN, Gomes L, Alles L, Chang T, Salimi M, Fernando S, et al. Serum IL-10 as a marker of severe dengue infection. *BMC Infect Dis.* 2013;13(341):1–7.
93. Bai F, Town T, Qian F, Wang P, Kamanaka M, Tarah M, et al. IL-10 Signaling Blockade Controls Murine West Nile Virus Infection. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):1–13.
94. Barros VED, Ferreira BR, Livonesi M, Figueiredo LTM. Cytokine and nitric oxide production by mouse macrophages infected with Brazilian flaviviruses. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 2009;51(3):141–7.
95. Ambarus CA, Krausz S, van Eijk M, Hamann J, Radstake TRDJ, Reedquist KA, et al. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J Immunol Methods.* 2012;375(1–2):196–206.
96. Hume DA. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol.* 2008;181:5829–35.
97. Kerr JFR, Wyllie AH, Curriet AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Br J Cancer.* 1972;26:239–

- 57.
98. Van Cruchten S, Van den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol.* 2002;31(4):214–23.
 99. Kerr J, Gobé G, Winterford C, Harmon B. Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol.* 1995;46:1–27.
 100. Lamkanfi M, Dixit VM. Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host Microbe.* 2010;8(1):44–54.
 101. Birge RB, Boeltz S, Kumar S, Carlson J, Wanderley J, Calianese D, et al. Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death Differ.* 2016;23(6):1–17.
 102. Salvesen G, Riedl S. Caspase mechanisms. *Adv Exp Med Biol.* 2008;615:13–23.
 103. Oberst A, Pop C, Tremblay AG, Blais V, Denault JB, Salvesen GS, et al. Inducible dimerization and inducible cleavage reveal a requirement for both processes in caspase-8 activation. *J Biol Chem.* 2010;285(22):16632–42.
 104. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenamee P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 2004;23(16):2861–74.
 105. Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 2003;10(1):26–35.
 106. Timmer JC, Salvesen GS. Caspase substrates. *Cell Death Differ.* 2007;14(1):66–72.
 107. Iranpour M, Moghadam AR, Yazdi M, Ande SR, Alizadeh J, Wiechec E, et al. Apoptosis, autophagy and unfolded protein response pathways in Arbovirus replication and pathogenesis. *Expert Rev Mol Med.* 2016;18:e1.
 108. Ghosh Roy S, Sadigh B, Datan E, Lockshin R a, Zakeri Z. Regulation of cell survival and death during Flavivirus infections. *World J Biol Chem.* 2014;5(2):93–105.
 109. Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Reis SRI, Miranda AS, Gandini M, Barbosa LS, et al. Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(8):1091–9.
 110. Jaiyen Y, Masrinoul P, Kalayanarooj S, Pulmanausahakul R, Ubol S. Characteristics of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cell death that correlates with the severity of illness. *Microbiol Immunol.* 2009;53(8):442–50.

111. Long X, Li Y, Qi Y, Xu J, Wang Z, Zhang X, et al. XAF1 contributes to dengue virus-induced apoptosis in vascular endothelial cells. *FASEB J.* 2013;27(3):1062–73.
112. Chen C-LL, Lin C-FF, Wan S-WW, Wei L-SS, Chen M-CC, Yeh T-MM, et al. Anti-Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Antibodies Cause NO-Mediated Endothelial Cell Apoptosis via Ceramide-Regulated Glycogen Synthase Kinase-3 beta and NF-kappa B Activation. *J Immunol.* 2013;191(4):1744–52.
113. Parquet M del C, Kumatori A, Hasebe F, Morita K, Igarashi A. West Nile virus-induced bax-dependent apoptosis. *FEBS Lett.* 2001;500(1–2):17–24.
114. Samuel MA, Morrey JD, Diamond MS. Caspase 3-dependent cell death of neurons contributes to the pathogenesis of West Nile virus encephalitis. *J Virol.* 2007;81(6):2614–23.
115. Michaelis M, Kleinschmidt MC, Doerr HW and Cinatl DJ Jr. Minocycline inhibits West Nile virus replication and apoptosis in human neuronal cells. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2007); 60: 981–986.
116. Su H-L, Liao C-L, Lin Y-L. Japanese Encephalitis Virus Infection Initiates Endoplasmic Reticulum Stress and an Unfolded Protein Response. *J Virol.* 2002;76(9):4162–71.
117. Tsao CH, Su HL, Lin YL, Yu HP, Kuo SM, Shen CI, et al. Japanese encephalitis virus infection activates caspase-8 and -9 in a FADD-independent and mitochondrion-dependent manner. *J Gen Virol.* 2008;89(8):1930–41.
118. Yanga T-C, Shiua S-L, Chuanga P-H, Linb Y-J, Wanb L, Lanc Y-C, et al. Japanese encephalitis virus NS2B-NS3 protease induces caspase 3 activation and mitochondria-mediated apoptosis in human medulloblastoma cells. *Virus Res.* 2008;143(1):77–85.
119. Yiang GT, Chen YH, Chou PL, Chang WJ, Wei CW, Yu YL. The NS3 protease and helicase domains of Japanese encephalitis virus trigger cell death via caspase-dependent and -independent pathways. *Mol Med Rep.* 2013;7(3):826–30.
120. Parquet MC, Kumatori A, Hasebe F, Mathenge EGM, Morita K. St. Louis encephalitis virus induced pathology in cultured cells. *Arch Virol.* 2002;147(6):1105–19.
121. Suthar MS, Ma DY, Thomas S, Lund JM, Zhang N, Daffis S, et al. IPS-1 is essential for the control of west nile virus infection and immunity. *PLoS Pathog.* 2010;6(2):1-15.

122. Cho H, Diamond MS. Immune responses to west nile virus infection in the central nervous system. *Viruses*. 2012;4(12):3812–30.
123. Getts DR, Terry RL, Getts MT, Müller M, Rana S, Deffrasnes C, et al. Targeted blockade in lethal West Nile virus encephalitis indicates a crucial role for very late antigen (VLA) -4-dependent recruitment of nitric oxide-producing macrophages. 2012;9(246):1–9.
124. Li J, Huang R, Liao W, Chen Z, Zhang S, Huang R. Dengue virus utilizes calcium modulating cyclophilin-binding ligand to subvert apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;418(4):622–7.
125. Getts DR, Terry RL, Getts MT, Müller M, Rana S, Shrestha B, et al. Ly6c+ “inflammatory monocytes” are microglial precursors recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis. *J Exp Med*. 2008;205(10):2319–37.

2. OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar el impacto de la infección por SLEV sobre la funcionalidad de monocitos humanos.

Objetivos Específicos

- Determinar la capacidad de infección y replicación de SLEV en monocitos humanos.
- Conocer las consecuencias de la infección con SLEV en la sobrevivencia de los monocitos.
- Evaluar la expresión de moléculas de superficie, receptores y la producción de inmunomoduladores en monocitos infectados con SLEV.
- Relacionar los hallazgos inmunológicos con las características biológicas de cada cepa de SLEV estudiada.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas de virus y stock viral

3.1.1 Preparación de los stocks virales

Se trabajó con las cepas SLEV 78V-6507 (genotipo V) (1) y CbaAr-4005 (genotipo III) (2), aisladas de mosquitos *Cx. quinquefasciatus* y almacenadas en el laboratorio de Arbovirus del Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella”, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Se prepararon los stock virales inoculando por vía intracerebral ratones albino suizos (RAS) cepa Rockefeller W-1 de 1-2 días de vida, con 0.02 mL de cada una de las cepas antes mencionadas. Al cabo de tres o cuatro días (en función de síntomas de enfermedad o muerte animal), se extrajo el cerebro y se preparó una suspensión al 10 % P/V en Medio Esencial Mínimo (MEM) modificado con sales Earle y L-Glutamina y suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y gentamicina al 1%. La suspensión se centrifugó a 10.000 r.p.m. durante 30 min. en centrífuga refrigerada, posteriormente el sobrenadante se separó y se fraccionó en alícuotas que se conservaron a -80° C hasta su utilización.

Los animales fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Virología. Todos los procedimientos se llevaron a cabo utilizando la guía del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de animales de laboratorio de la Escuela de Medicina de la Universidad Nacional de Córdoba, en concordancia con la Guía para el Uso y Cuidado de animales de laboratorio y la directiva EC 86/609, NIH-USA (1996). Los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Médicas, UNC, bajo el número de identificación: 02/13-674/09.

3.1.2 Titulación de los stocks virales

Se realizó mediante el método de formación de placas de lisis bajo agar en células Vero (riñón de mono verde africano). Una monocapa confluyente de células

Vero se infectó con 100 uL de cada dilución seriada (factor 10) del stock viral (por triplicado) y se incubó durante 1h a 37°C con atmósfera húmeda conteniendo 5% CO₂, para permitir la adsorción del virus. Transcurrida esta etapa, se cubrió la monocapa con una solución semi-sólida constituida por partes iguales de agarosa al 1% y MEM de doble concentración (2X). Cuando esta capa se solidificó, las células se mantuvieron en estufa con atmósfera húmeda conteniendo 5% CO₂ a 37°C. El cultivo fue observado diariamente al microscopio óptico invertido para detectar la aparición de unidades formadoras de placas (u.f.p). La lectura final se realizó el día en el cual no aparecen nuevas u.f.p., que para SLEV es, 7 días. El título viral se expresa como el número de u.f.p. para el volumen de inóculo de la última dilución de virus en la que se observa u.f.p.

3.2 Línea Celular U937

3.2.1 Generalidades

Se utilizó la línea celular U937 (*American Type Culture Collection ATCC N° CRL-1593.2TM*) como modelo *in vitro* de infección viral en células de la inmunidad innata. Estas células fueron obtenidas a partir de un linfoma histiocítico humano (3). Poseen morfología monocítica, crecen en suspensión y luego de estimulación con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) producen lisozima, α₂-microglobulina y TNF (4). Las U937 poseen fenotipo de células monocíticas detenidas en un estado inmaduro de la diferenciación del linaje monocítico.

3.2.2 Condiciones de cultivo

Las células U937 se mantuvieron en suspensión en frascos de Roux (de 25 mL o 75 mL de capacidad según el experimento a realizar), con medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma) suplementado con 10% V/V de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) y 1 % V/V de gentamicina. Se incubaron a 37°C y en atmósfera al 5% V/V de CO₂ y

semanalmente se realizaron subcultivos diluyendo la suspensión de células 1:3 en medio de cultivo fresco.

Para realizar cada subcultivo se trasvasó la suspensión desde el frasco de Roux a un tubo cónico de polipropileno, luego de centrifugar, se descartó el sobrenadante y se realizó el recuento de células y la determinación de la viabilidad celular por azul trypan. Finalmente, se resuspendió el *pellet* en un volumen determinado de medio de cultivo de acuerdo al tamaño del nuevo contenedor y del número del recuento celular.

3.3 Infección de células U937

Se realizaron ensayos de infección con cada cepa de SLEV analizada. Para realizar cada uno se tomó, de botellas de cultivos de las U937 con una viabilidad superior al 95%, el volumen que contenía el número de células requerido para las determinaciones posteriores. Se trasvasó dicho volumen a un tubo cónico de polipropileno, se centrifugó 3 minutos a 1500 r.p.m, se descartó sobrenadante y las células se resuspendieron en 200 uL de RPMI 1640. Las células fueron infectadas con un inóculo viral de 200 uL con un índice de multiplicidad de infección (MOI) cercano a 1. Este índice se define como la relación entre el virus absorbido y el número total de células en cultivo, es decir el número real de virus que recibe cada célula, y se calcula en base a los resultados obtenidos en la titulación de los stocks por u.f.p. (MOI=1 equivale a 1u.f.p. por célula). Después de 1 h de incubación en atmósfera húmeda conteniendo 5% V/V de CO₂ a 37°C, se recolectó el sobrenadante para descartar el virus no absorbido y se realizaron dos lavados con PBS. Como control negativo (-) se utilizaron células incubadas sólo con RPMI.

Las células U937 infectadas y los controles negativos se cultivaron en placas de seis pocillos a una densidad de 2×10^5 cel/mL en RPMI 1640 suplementado con SFB al 5% V/V. Se incubaron en estufa con atmósfera húmeda al 5% V/V de CO₂ y 37°C durante 5 días. En cada pocillo se colocaron portaobjetos redondos a fin de que parte de las células se adhieran a ellos y obtener improntas para la detección de antígeno viral y apoptosis.

Durante los cinco días de duración del ensayo de infección se retiraron a diario desde el primer día post infección (pi)(24 hs) hasta 5 días pi (120hs), células, sobrenadantes y portaobjetos a fin de realizar las diferentes determinaciones.

3. 4 Detección de antígeno viral

La detección de antígeno viral (Ag) se realizó por Inmunofluorescencia Indirecta sobre las células adheridas a portaobjetos.

3.4.1 Obtención de las improntas

De los experimentos de infección realizados según punto 3.3, se retiraron los portaobjetos cada 24 h durante 5 días pi y se sumergieron en acetona pura durante 20 min a 4°C, luego se lavaron 2 veces con 100 uL de PBS filtrado, se secaron y se conservaron en freezer -20 °C.

3.4.2 Procedimiento de Inmunofluorescencia

Se retiraron los portaobjetos del freezer y se los dejó pocos minutos a T° ambiente (TA). En cada vidrio, se colocó 100 uL de solución de PBS con albúmina bovina al 5% V/V, durante 30 min a 4°C, para bloquear los sitios de uniones inespecíficas. Luego se agregó 50 uL de anticuerpo murino anti-SLEV (SIGMA Chemical Co, St.Louis, Mo) en una dilución 1/ 100, en albúmina bovina al 1% V/V, y se incubó durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, se lavó 3 veces con una solución de PBS al 1% de albúmina bovina y se agregó 50 uL de anticuerpo de cabra anti cadena γ de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína FITC (SIGMA Chemical Co, St.Louis, Mo) en una dilución 1/300 (en PBS con albúmina sérica bovina al 1%). Se incubó 30 min a TA en oscuridad y seguidamente se lavó 3 veces con una solución de azul de Evans al 1% en PBS. Finalmente se montó cada vidrio con Fluor-Save (SIGMA Chemical Co, St.Louis, Mo) y se analizaron utilizando un microscopio de epi-fluorescencia Olympus Motorized Inverted Research, Modelo

IX81. Imaging Software: Cell M. Se utilizó el filtro de FITC verde 43IF550-W45 y filtros de balance azul-día 45-LBD-IF.

3.5 Curva de replicación viral

De los ensayos de infección de las células U937 del punto 3.3, se procedió a recolectar los sobrenadantes con la carga viral acumulada desde el momento de la infección, a las 24, 48, 72, 96 y 120 hs post inoculación y se los conservó a -80°C . Posteriormente se cuantificó la carga viral (como una medida para estimar la replicación) mediante PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) utilizando sondas específicas para SLEV.

3.5.1 Extracción del ARN viral

Para extraer el ARN viral se utilizó el kit de extracción de ADN/ARN de Axigen (AxyPrep viral DNA/RNA MiniPrep Kit, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.5.2 PCR en tiempo real

Para realizar la cuantificación de la carga viral presente en los sobrenadantes se realizó una PCR en tiempo real (qRT-PCR) desarrollada en nuestro laboratorio en colaboración con el Instituto de Salud Carlos III de España. Para ello se utilizaron cebadores (en inglés, *primers*) que amplifican un fragmento de la región 3' no codificante de SLEV (Tabla I). En paralelo se diseñó una sonda tipo Taq Man marcada con colorante VIC que hibrida con el fragmento amplificado (Tabla I). Se determinó la cantidad de virus mediante la realización de una curva de calibración utilizando plásmido con un número de entre $10-10^9$ copias del virus. Además, se utilizó un control interno (ci) de 1000 copias y una sonda que hibrida con el mismo, marcada con colorante NED. Para la reacción se utilizaron 25 uL de una mezcla

conteniendo: 12,5 uL de Buffer Tampón (2X) (Applied Biosystem), 0,2 uL de Primer SLE +1 (100uM), 0,3 uL de Primer SLE -1 (100uM), 1 uL de sonda Taq Man VIC (5uM), 1 uL de sonda Taq Man NED (5 uM), 0,5 uL del ci (1000 copias) y 9,5 uL de agua libre de ARNasas, a la cual se le agregó 5 uL de cDNA. El ensayo fue realizado utilizando un equipo Applied Biosystems 7500.

Tabla I. Lista de cebadores y sondas utilizados para la qRT-PCR

Nombre	Secuencia
SLE +1	5'GTCTCCTCTAACCTCTAGTCCTTCCC 3'
SLE -1	5'GAGGTTAGAGGAGACCCCGC 3'
Sonda SLEV	VIC-AACTTGGCAAGGCC
Sonda CI	NED-CCAGCACACATGTGTCTA

3.6 Detección de Apoptosis

3.6.1 Marcación con Anexina V y 7-Amino-actinomicina

El proceso de apoptosis se caracteriza por ciertos cambios morfológicos, entre los que se incluyen la pérdida de asimetría de la membrana plasmática. Este es un evento temprano en el que el fosfolípido de membrana PS, se transloca desde el interior hacia el exterior de la membrana celular, exponiéndose al entorno celular.

La anexina V es una proteína de 35-36 kDa que tiene una alta afinidad por la PS y se fija a las células con PS expuesta (unión dependiente de la presencia de Ca^{+2}). La anexina V se puede conjugar con fluorocromos, incluyendo a la Ficoeritrina (PE), y este conjugado conserva su alta afinidad por la PS. Por lo tanto, sirve como una sonda sensible para el análisis por citometría de células en apoptosis. Ya que la externalización de la PS se produce en las primeras etapas de la apoptosis, la tinción de anexina V- PE puede identificar la apoptosis en una etapa anterior que los ensayos basados en los cambios nucleares tales como la fragmentación del ADN.

La marcación con anexina V-PE precede a la pérdida de integridad de la membrana que acompaña a las últimas etapas de la muerte celular resultante de un proceso apoptótico o necrótico. Por lo tanto, la tinción con anexina V-PE se utiliza en conjunción con un colorante vital tal como 7-amino-actinomicina (7-AAD) que es excluido por células viables. Así, se pueden identificar distintas subpoblaciones: a) células viables no apoptóticas (7-AAD negativo, Anexina V-PE negativo), b) células en apoptosis temprana (7-AAD negativo, Anexina V-PE positivo), c) células en apoptosis tardía (7-AAD positivo, Anexina V-PE positivo) y d) células necróticas (7-AAD negativo, Anexina V-PE positivo).

Cuando la apoptosis se mide en relación al tiempo, las células pueden pasar de ser Anexina V-PE negativo y 7-AAD negativo (viables no apoptóticas) a Anexina V-PE positivo y 7-AAD negativo (apoptosis temprana con presencia de la integridad de la membrana plasmática) y finalmente a Anexina V-PE positivo y 7-AAD positivo (etapa final de la apoptosis o apoptosis tardía). El movimiento en la expresión de los diferentes ligandos de Anexina y 7-AAD a través de estas tres etapas sugiere apoptosis.

Para la determinación se utilizó el equipo comercial PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™) para citometría de flujo. Para ello se tomaron las células procedentes de los cultivos infectados con SLEV a diferentes días pi, se lavaron dos veces con PBS frío y se resuspendieron en *Binding Buffer 1X* a una concentración final de 1×10^6 cells/mL. Se transfirió 100 uL de la suspensión (conteniendo 1×10^5 células) a un tubo de 5 mL y se agregó 5 uL de Anexina V-PE y 5 uL de 7-AAD. Se homogeneizó suavemente en vortex e incubó 15 min a TA en oscuridad. Finalmente se agregó 400 uL de *Binding Buffer 1X* a cada tubo. Las determinaciones fueron leídas en un citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson), adquiriéndose como mínimo 50.000 eventos por tubo. Los resultados fueron analizados utilizando el software FlowJo versión 5.7.2

3.6.2 Detección *in situ* de la muerte celular

Otro método que utilizamos para evaluar apoptosis fue la detección de fragmentos de simple o doble cadena de ADN generados durante la fase tardía del proceso apoptótico. Para ello, se utilizó la técnica de detección *in situ* del ADN

fragmentado o técnica de TUNEL (del inglés transferase-mediated dUTP nick end labeling) utilizando equipo comercial In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche). Para la detección de apoptosis, se trabajó con los portaobjetos extraídos de los experimentos de infección (punto 3.3) y tratados según punto 3.4.1. Luego de ser retirados del freezer, a cada portaobjeto se lo hidrató con PBS durante 30 min, se le agregó una solución permeabilizadora con Tritón 0,1% en 0,1% de citrato de sodio, según recomendaciones del fabricante, y se incubó a TA durante 2 min. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS de 5 min cada uno y se preparó el Mix Tunel en la siguiente relación: 50 uL de la solución con la enzima (*terminal deoxinucleotidyl transferase* dUTP) más 450 uL de la solución de tinte. Se agregaron 20 uL del Mix Tunel a cada portaobjeto y 20 uL de la solución de tinte sola como control negativo de reacción. Las muestras se incubaron en cámara húmeda a 37°C en oscuridad. Finalmente se realizaron tres lavados de 5 min con PBS y se montaron con Fluor-Save (SIGMA Chemical Co, St.Louis, Mo).

Los portaobjetos fueron analizados utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus Motorized Inverted Research, Modelo IX81. Imaging Software: Cell M. Se utilizó el filtro de rodamina (653nm) (Filtros de balance azul-día 45-LBD-IF y verde 43IF550-W45).

3.6.3 Determinación de caspasa 3-activa

Para la determinación de caspasa-3 activa se utilizó el equipo comercial PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit (BD Pharmingen™) para citometría de flujo siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células de los ensayos de infección y control negativo obtenidas a distintos días pi se lavaron dos veces con PBS frío. Para fijar y permeabilizar las células fueron resuspendidas a una densidad de 1×10^6 en 500uL de BDcytofix/cytoperm e incubadas 20 min a 4 °C. Luego fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 5 min, se descartó sobrenadante y se lavaron 2 veces con BD perm/wash buffer. Seguidamente, se agregaron 20 uL de anticuerpo monoclonal con especificidad para fragmento de caspasa- 3 humana, marcado con ficoeritrina-PE (animal de procedencia del anticuerpo: conejo, clon C92-605, isotipo IgG) y 100 uL de BD perm/wash buffer (1x) cada 1×10^6 cél. y se incubó 30 min en TA. Luego de lavar con 1mL BD perm/wash buffer (1x) las células fueron

resuspendidas en 200 uL de buffer y fueron leídas en un citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson) adquiriéndose como mínimo 50.000 eventos por tubo. Los resultados fueron analizados utilizando el software FlowJo versión 5.7.2.

3.6.4 Determinación del cambio de potencial de membrana mitocondrial

Se utilizó el colorante tetrametilrodamina, etil éster perclorato (TMRE) (Sigma-Aldrich). El TMRE posee carga positiva y es captado por mitocondrias de células viables, debido a su carga negativa relativa de potencial de membrana. En la apoptosis, la membrana mitocondrial se despolariza con lo que disminuye dicho potencial y deja de secuestrar TMRE.

Para determinar el cambio de potencial de membrana mitocondrial se tomaron células de los ensayos de infección y controles negativos a distintos días pi y se lavaron con PBS a 1500 rpm durante 2 min. Se colocaron 1×10^5 células por tubo y se les agregó el 5 uL (dil 1/10) de TMRE y 5 uL de 7-AAD (para discriminar células viables de no viables). Luego se incubaron a T° ambiente, durante 30 min a oscuridad y se agregó a cada tubo 100 uL de buffer PBS y se leyó en citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson) adquiriéndose como mínimo 50.000 eventos por tubo. Los resultados fueron analizados utilizando el software FlowJo 5.7.2.

3.7 Evaluación de la expresión de moléculas de superficie y receptores

La expresión de CD14, HLA-DR, Fas (CD95), TLR-2 ubicados en la membrana plasmática, y de TLR-3 intracelular fue evaluada por citometría de flujo.

3.7.1 Marcación de moléculas y receptores de superficie

Para la marcación de receptores ubicados sobre la membrana celular se tomaron células de los ensayos de infección y controles negativos a distintos días pi

y se lavaron con PBS a 1500 rpm durante 2 min. Luego se colocaron 1×10^5 células por tubo, se agregó el anticuerpo monoclonal (BD Pharmingen™) correspondiente a dilución y volumen establecido en Tabla II y se incubaron a TA durante 30 min a oscuridad. Posteriormente, se agregó a cada tubo 100 uL de buffer y se leyó en un citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson), adquiriéndose como mínimo 50.000 eventos por tubo. Los resultados fueron analizados utilizando el software FlowJo versión 5.7.2

Tabla II. Anticuerpos monoclonales utilizados

Especificidad del Ac-fluorocromo de marcación	Clon	Huésped/Isotipo	Cantidad (uL) colocada por tubo (dilución realizada del reactivo puro en PBS)
Anti human CD14-APC-Cy™ 7	MφP9	Mouse IgG _{2a} κ	3uL (1:2)
Anti human CD 95-FITC	DX2	Mouse C ₃ H/Bi IgG ₁ κ	5uL (puro)
Anti human HLA DR-FITC	1243	Mouse IgG _{2a} κ	5uL (puro)
Anti human CD 282 (TLR-2)-Alexa Flúor ⁴⁸⁸	11G7	Mouse IgG ₁ κ	5uL (puro)

3.7.2 Marcación de receptores intracelulares

Para la marcación del receptor intracelular TLR-3 se tomaron células de los ensayos de infección y controles negativos a distintos días pi y se siguió el mismo procedimiento de fijación y permeabilización descrito en 3.6.3. Para la marcación a cada tubo se agregó 5 uL del anticuerpo anti-humano CD283 (TLR-3), clon TLR 3.7, huésped /isotipo: mouse/IgG, κ (Bioscience)(diluído 1:2 en PBS) a una suspensión de 1×10^5 células en 100 uL de buffer PBS. Luego de incubar 1h a TA en oscuridad, se realizaron las lecturas en un citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson), adquiriéndose como mínimo 50.000 eventos por tubo. Los resultados fueron analizados utilizando el software FlowJo versión 5.7.2.

3.8 Cuantificación de citoquinas

Las citoquinas TNF, IL-6 e IL-10 fueron dosadas en los sobrenadantes de infección a distintos días pi y en los controles negativos, los que fueron alicuotados y almacenados a -70°C hasta el momento del ensayo. Para su cuantificación se utilizaron los siguientes equipos comerciales: Human TNF α ELISA Kit II, Human IL-6 ELISA Kit II y Human IL-10 ELISA Kit II (BD OptEIA[™]). En todas las determinaciones se siguieron las instrucciones del fabricante. Se colocó 50 μL de diluyente en cada pocillo, se agregó 100 μL de cada testigo o muestra e incubó 2 hs a TA. Luego de lavar 5 veces con solución de lavado, se agregó 100 μL de conjugado enzimático e incubó 1 hs a TA. Se realizó un nuevo ciclo de lavado, se colocó 100 μL del sustrato TMB (tetrametilbencidina) y se incubó 30 min a TA en oscuridad. Por último se frenó la reacción con 50 μL de ácido sulfúrico 1N. Las lecturas se obtuvieron a 450 nm, dentro de los 30 min de finalizado el ensayo, en un lector de ELISA (Microplate Reader, BioRad) y la concentración de la citoquina fue calculada utilizando una curva de referencia realizada con los testigos correspondientes de concentraciones conocidas.

3.9 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el valor medio de tres ensayos independientes \pm desviación estándar (DE) y se analizaron por análisis de varianza (ANOVA) seguido por un test de a posteriori de "Tuckey". El criterio para la significancia estadística fue $p < 0,05$. Para todos los análisis se utilizó el programa InfoStat versión 2014 e.

3.10 Bibliografía

1. Mitchell C, Darsie RJ, Monath T, Sabbatini M, Daffner J. The use of an animal-baited net trap for collecting mosquitoes during western equine encephalitis investigations in Argentina. *J Am Mosq Control Assoc.* 1985;1:43–7.
2. Diaz LA, Ré V, Almirón WR, Farías A, Vázquez A, Sanchez-Seco MP, et al. Genotype III Saint Louis encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(11):1752–4.
3. Sundstrom C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U937). *Int. J. Cancer.* 1976;17:565–77.
4. García A, Serrano A, Abril E, Jimenez P, Real LM, Cantón J, et al. Differential effect on U937 cell differentiation by targeting transcriptional factors implicated in tissue- or stage-specific induced integrin expression. *Experimental Hematology.* 1999;27(2):353-64.

4. RESULTADOS

4.1 Infección y replicación del SLEV en células U937

En el modelo de infección experimental *in vitro* de células U937 con SLEV, se detectó la presencia de antígeno viral (Ag SLEV⁺) identificado por Inmunofluorescencia (Fig 12).

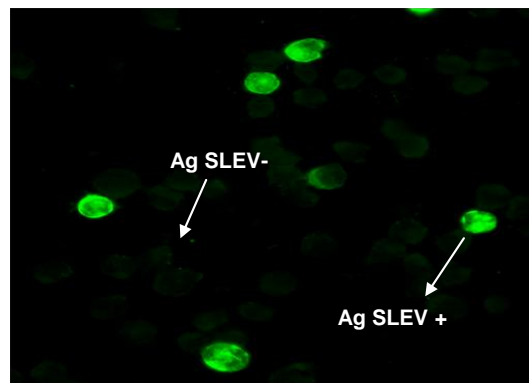


Figura 12. Detección de antígeno viral de SLEV (Ag SLEV⁺) mediante inmunofluorescencia. Imágenes obtenidas con microscopio Olympus Motorized Inverted Research, Modelo IX81. Imaging Software: Cell M. Objetivo 60X.

Se observaron células U937 Ag SLEV⁺ desde el primer día pi con ambas cepas, registrándose variaciones en la cantidad de células que expresaron el Ag SLEV⁺ según la cepa infectante. El porcentaje de células infectadas (Ag SLEV⁺) a los distintos días pi con cada cepa se tomó como una medida de la tasa de infección. En la incubación con 78V-6507 se alcanzó el máximo nivel de infección en el día 3 pi, donde el $30,0 \pm 6,4$ % de las células expresaron Ag SLEV⁺. En los días posteriores a esta infección se observó la disminución gradual en el porcentaje de células infectadas (día 4 pi: $17,3 \pm 1,4$ % y día 5 pi: $10,0 \pm 1,7$ %). En la infección con CbaAr-4005, se observó una tasa de infección más baja durante los tres primeros

días, obteniéndose los siguientes porcentajes de células infectadas, para el día 1 pi: $4,0 \pm 0,6$ %; día 2 pi: $6,3 \pm 0,9$ % y día 3 pi: $10,0 \pm 1,8$ %. En los dos últimos días del ensayo de infección con esta cepa se observó un aumento significativo del porcentaje de células infectadas respecto al día 3 pi, así se obtuvo para el día 4 pi: $84,0 \pm 7,8$ % y día 5 pi: $93,3 \pm 1,8$ % vs día 3 pi $10,5 \pm 1,5$ %; $p < 0,05$) (Figura 13).

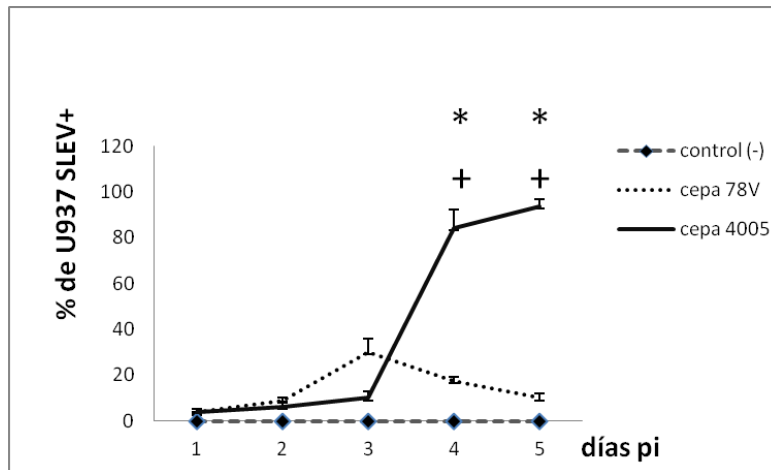


Figura 13. Porcentajes de células U937 Ag SLEV+ determinados a distintos días pi por inmunofluorescencia, luego de incubar las células con cada una de las cepas (78V-6507 y CbaAr-4005) de SLEV. (*) Indica aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en el porcentaje de células Ag SLEV+ con CbaAr-4005 en los días 4 y 5 pi respecto al día 3 pi. (+) Indica aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en el porcentaje de células Ag SLEV+ con CbaAr-4005 en los días 4 y 5 pi respecto a los mismos días con cepa 78V-6507.

Los resultados cuantitativos de la carga viral en sobrenadantes de cultivo también difirieron según la cepa infectante. En el primer día pi, 78V-6507 mostró mayor número de copias que CbaAr-4005 (51.500 ± 3.535 vs 29.500 ± 2.121 copias de DNA viral, $p < 0,05$). Siguiendo con el análisis de 78V-6507, entre el día 2 y 3 pi se produjo el máximo número de copias (día 2 pi: 51.500 ± 1.500 , día 3 pi: 262.000 ± 13.000 copias de DNA viral). En los días 4 y 5 pi no hubo variaciones en el número de copias virales obtenidas, lo que indica que 78V-6507 no replicó en esos días (día 4 pi: 260.000 ± 12.583 copias de DNA viral, día 5 pi: 224.500 ± 6.500 copias de DNA viral).

Distintos fueron los resultados observados con la cepa CbaAr- 4005 ya que el mayor número de copias se observó en los días 4 (827.000 ± 18.000 copias de DNA viral) y 5 pi ($1.525.000 \pm 25.000$ copias de DNA viral) (Figura 14).

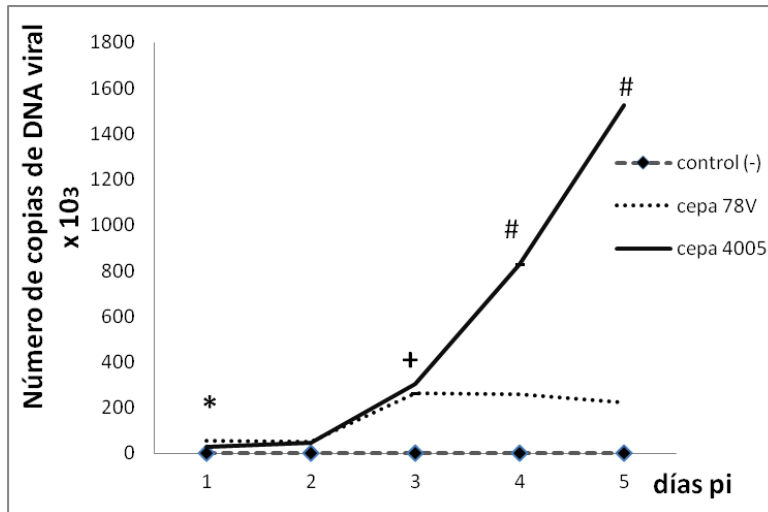


Figura 14. Carga viral de sobrenadantes de cultivos de células U937 infectadas con SLEV cepa 78V-6507 y CbaAr-4005, obtenidos por qRT-PCR. Los valores se expresan como número de copias de DNA viral $\times 10^3$. + Indica valores de copias significativamente mayores respecto al día anterior para la misma cepa infectante ($p < 0,05$). * Indica valores de copias significativamente mayores para la cepa 78V-6507 respecto a CbaAr-4005 ($p < 0,05$). # Indica valores de copias significativamente mayores para CbaAr-4005 respecto 78V-6508 ($p < 0,005$).

Estos resultados muestran diferencias en la infección de U937 por SLEV según la cepa infectante. El alto porcentaje de células infectadas por CbaAr-4005 respecto a 78V-6507, en los últimos días pi reflejan que CbaAr-4005 tiene mayor capacidad para infectar y replicar en las U937.

4.2 Cambios morfológicos de las células U937 por la infección con SLEV

La observación de las U937 al microscopio reveló que poseían homogeneidad morfológica, se visualizaban pequeñas, redondeadas y dispersas (Figura 15-A). Cuando estas células se infectaron con SLEV se observó un efecto

citopático representado por pérdida de la homogeneidad morfológica, granularidad citoplasmática, adhesión y agrupación celular. Las alteraciones mencionadas fueron más notorias con la cepa CbaAr- 4005 en los días 4 (Figura 15-B) y 5 (datos no mostrados) pi. Estos cambios fueron similares a los registrados en experimentos preliminares utilizando acetato forbol miristato (PMA) para inducir la maduración de las U937 a monocitos/macrófago, proceso que fue dependiente de la concentración del agente (Figura 15- C, D) y el tiempo de exposición al mismo (datos no mostrados).

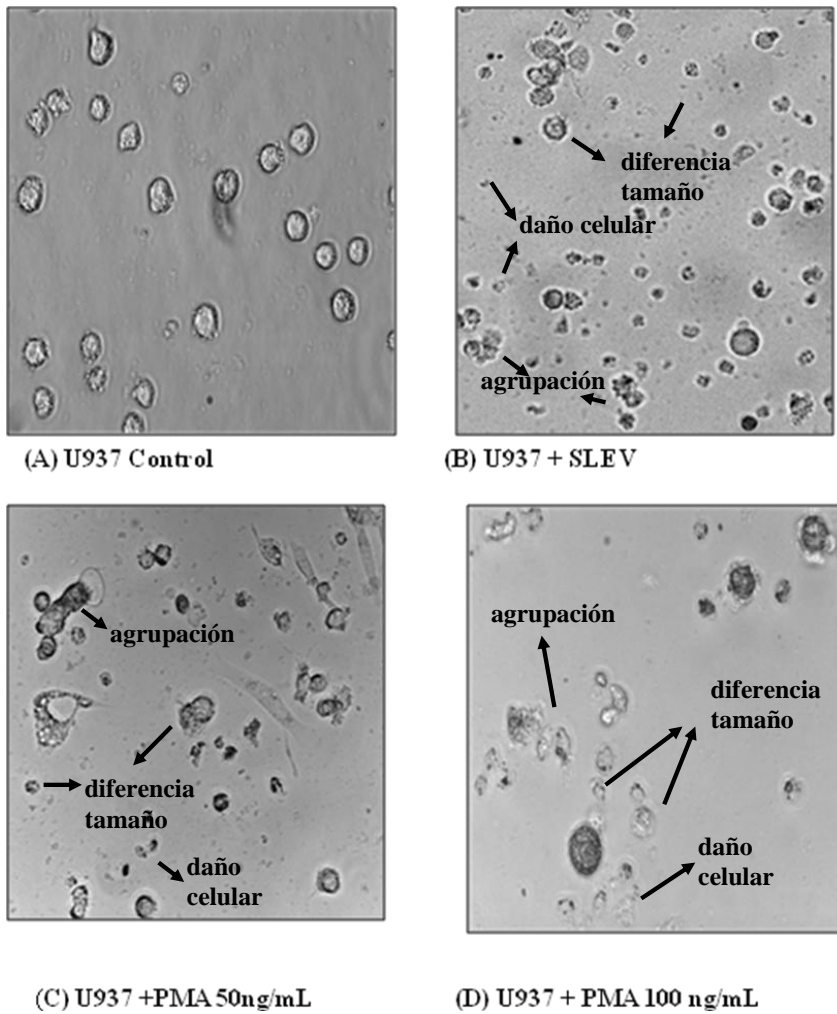


Figura 15. (A) Células U937 control, (B) Células U937 infectadas con SLEV cepa CbaAr- 4005 a MOI=1, 4d pi., (C, D) Células U937 tratadas durante 4 días con PMA a dosis 50ng/mL y 100ng/mL respectivamente. Imágenes obtenidas con microscopio Olympus Motorized Inverted Research, Modelo IX81. Imaging Software: Cell M. Objetivo 60X.

Cuando se analizó por CF la distribución de las U937 según su tamaño (*forward scatter-FSC*) y su complejidad citoplasmática (*side scatter-SSC*) (Figura 16), en los tres primeros días pi se observó una sub-población 1 predominante con alto FSC y bajo SSC que correspondían a células de alta viabilidad (más del 90% no colorearon 7-AAD) y en menor proporción una sub-población 2 con bajo FSC y alto

SSC de escasa viabilidad (más del 90% fueron (+) 7-AAD). A medida que transcurrieron los días pi, se observó disminución de tamaño y aumento en la complejidad citoplasmática de las células, lo que se reflejó en los cambios en la proporción de las subpoblaciones. En las células infectadas por SLEV en los días 4 y 5 pi se observó un aumento significativo de la subpoblación 2 (más del 90% de las U937) y una disminución de la subpoblación 1. Esto fue más evidente con la cepa CbaAr- 4005.

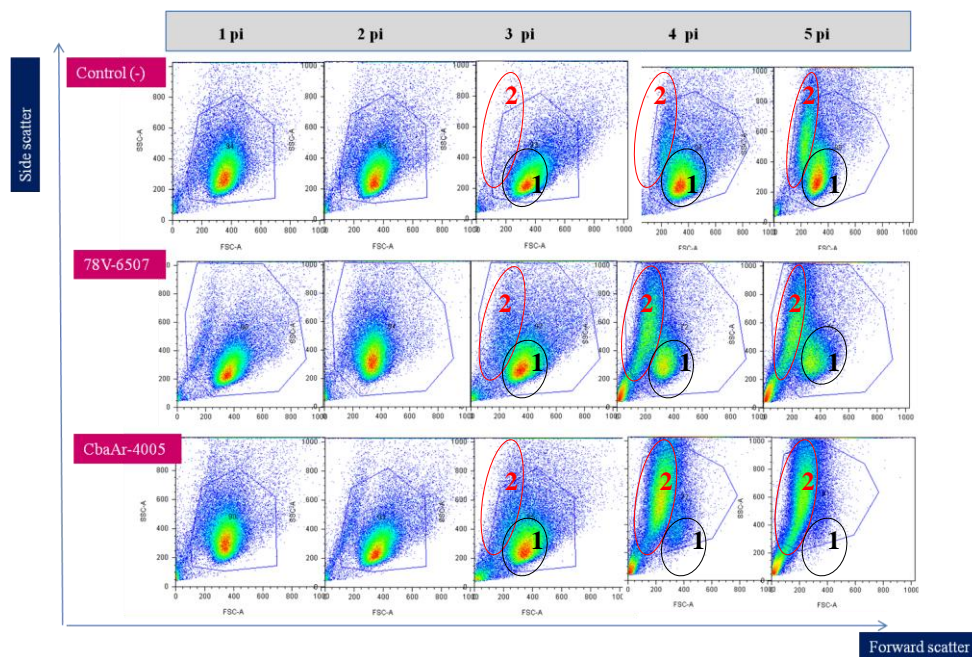


Figura 16. Distribución de side scatter (SSC) vs forward scatter (FSC) de células U937 controles o infectadas con SLEV cepa 78V-6507 y CbaAr-4005 desde día 1 a 5 pi. En círculo negro, 1- subpoblación de células con alto FSC y bajo SSC. En elíptico rojo, 2- subpoblación de células con bajo FSC y alto SSC.

4.3 Impacto de la infección viral sobre la viabilidad de las U937.

La cinética de la viabilidad de las células U937 infectadas con SLEV se evaluó a distintos días pi. por CF midiendo de la ventana (*gate*) en los gráficos SSC vs FSC (Figura 17-A) el porcentaje de células que no colorearon con 7-AAD (Figura 17-B).

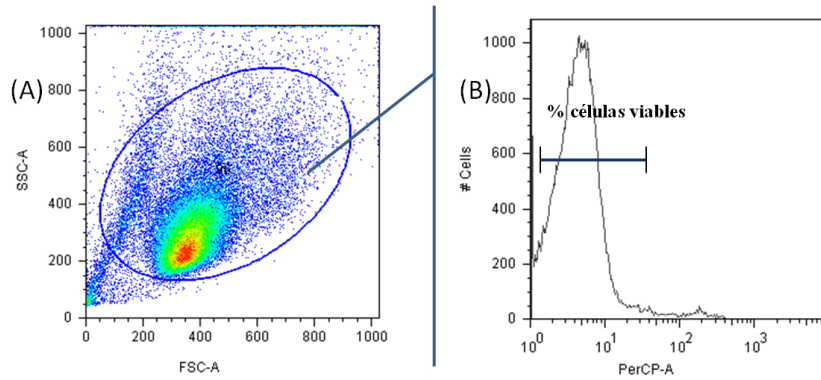


Figura 17. Gráfico que señala la estrategia empleada para medir viabilidad celular en las células infectadas con SLEV o controles. (A) Distribución de side satter (SSC) vs forward scatter (FSC) de células U937 infectadas con SLEV cepa CbaAr-4005 a 3 días pi. (B) Gráfico de histograma de frecuencia que muestra el porcentaje de células negativas para 7-AAD (PerCP) del gate realizado en (A).

Así, se demostró que la infección por SLEV provoca una importante caída en la viabilidad de las U937 en los dos últimos días de los ensayos. La cepa CbaAr-4005 produjo una disminución significativa ($p < 0,05$) en el porcentaje de células viables respecto a la cepa 78V-6507 y al control (-) en el día 4pi ($48 \pm 10\%$ vs $76 \pm 13\%$ y $88 \pm 12\%$; respectivamente) y 5 pi ($38 \pm 10\%$ vs $71 \pm 9\%$ y $82 \pm 13\%$; respectivamente) (Figura 18).

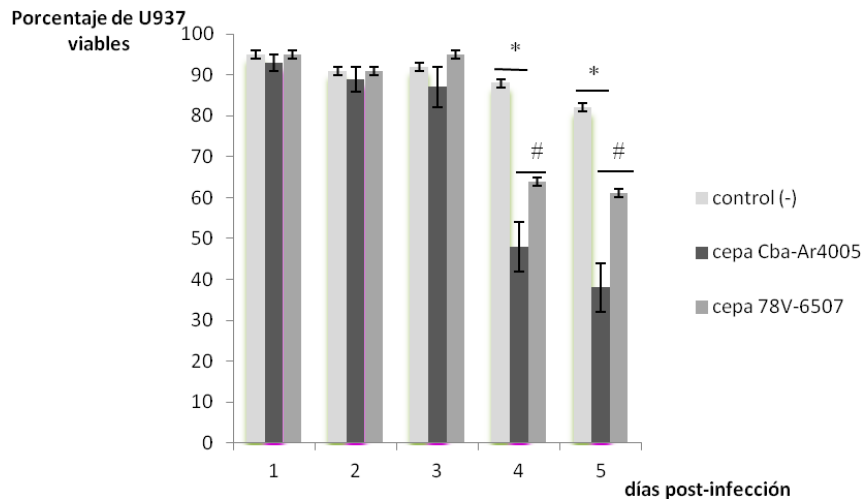


Figura 18. Cinética de la viabilidad de las células U937 infectadas con SLEV obtenida por citometría de flujo. Gráfico de barra representando porcentajes de células viables (negativas para 7-AAD) en control (-), infección por cepa Cba-Ar 4005 e infección por cepa 78V-6507. (*) Indica disminución estadísticamente significativa entre infección por cepa CbaAr-4005 respecto al control (-); $p < 0,01$. (#) Indica disminución estadísticamente significativa entre infección por CbaAr-4005 respecto a 78V-6507; $p < 0,05$.

4.4 Detección de apoptosis

4.4.1 Marcación con Anexina V/ 7-AAD

La marcación combinada de anexina V-PE (ficoeritrina)/7-AAD (7- amino-actinomicina) permitió diferenciar y cuantificar las subpoblaciones de U937 en base a la expresión de fosfolípidos y permeabilidad celular. Así, se identificaron la población V: células viables no apoptóticas (Anexina V negativo y 7-AAD negativo), la población AT: células en apoptosis temprana (Anexina V-PE positivo y 7-AAD negativo), la población AL: células en apoptosis tardía, del inglés *later* (Anexina V-

PE positivo y 7-AAD positivo) y la población N: células necróticas (Anexina V-PE negativo y 7-AAD positivo) (Figura 19)

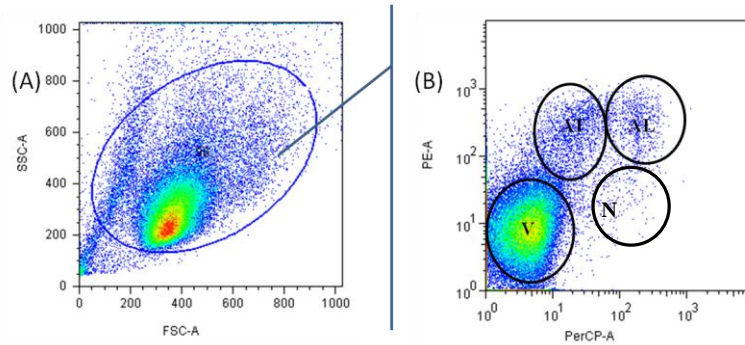


Figura 19. (A) Distribución side scatter (SSC) vs forward scatter (FSC) de células U937 infectadas con SLEV cepa CbaAr-4005 a los 3 días pi. (B) Distribución de las células del gate de A según marcación Anexina V-PE vs 7-AAD-PerCP. V: células viables no apoptóticas. AT: células en apoptosis temprana. AL: células en apoptosis tardía (del inglés *later*). N: células necróticas.

Cuando se analizaron los gráficos dot plot de la marcación anexina V-PE / 7AAD durante el transcurso del experimento de la infección, se evidenció un movimiento de las células a través de estos cuatro estadios (Figura 20). Así, en el día 1pi con ambas cepas de SLEV se evidenció la aparición de poblaciones pequeñas de células AT y AL. En los días 2 y 3 pi, la población AL aumentó y las células en AT disminuyeron. En los días 4 y 5 pi, hubo un aumento de las poblaciones en AT y N y una disminución de la población V, siendo significativo para la cepa CbaAr-4005.

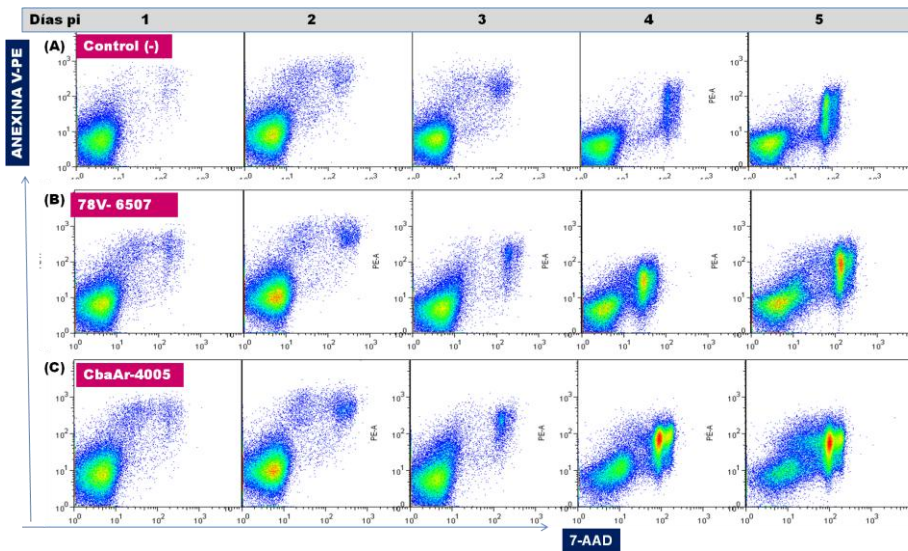


Figura 20. Cinética de la distribución de las subpoblaciones celulares según marcación Anexina PE vs 7-AAD PerCP a distintos días pi (A) células U937 control (-), (B) células U937 infectadas con SLEV cepa 78V-6507 (C) células U937 infectadas con SLEV cepa CbaAr-4005.

Las diferentes subpoblaciones celulares se cuantificaron por CF, obteniéndose el porcentaje de células que integraban cada una. En las Tablas III y IV se muestran la distribución de las tres poblaciones de interés: V, AT y AL según la cepa infectante y los días pi.

Tabla III. Viabilidad de células U937 en cultivos controles (-) e infectados con SLEV cepa 78V-6507 y CbaAr-4005, a distintos días pi.

Días pi	Células viables (V)		
	Control (-)	78V-6507	Cba Ar- 4005
1	95,0±3,8	89,0±3,0	93,0±2,0
2	91,0±3,7	92,0±3,0	89,0±3,0
3	92,0±6,0	91,0±3,5	87,0±5,5
4	88,0±11,7	76,0±13,0	48,0±10,0 *#
5	82,0±13,0	71,0± 9,5	38,0±9,7 *#

Resultados expresados como porcentaje en $\bar{X} \pm DE$.
 Porcentajes significativamente menores para la cepa CbaAr-4005 respecto al control (-) (*) $p < 0,01$ y cepa 78V-6507 (#) $p < 0,05$

Tabla IV. Apoptosis temprana y tardía de células U937 en cultivos controles e infectados con SLEV cepa 78V-6507 y CbaAr-4005, a distintos días pi.

Días pi	Células en AT			Células en AL		
	C	78V-6507	Cba Ar- 4005	C	78V-6507	Cba Ar- 4005
1	2,0±1,0	7,0±2,5	4,0±3,0	2,0±1,7	5,0±0,5	2,0±0,6
2	5,0±2,8	5,0±2,0	7,0±3,0	3,0±1,5	3,0±0,6	4,0±0,5
3	5,0±4,6	3,0±1,5	2,0±0,5	3,0±1,1	5,0±2,0	8,0±3,2
4	3,0±1,5	4,0±0,6	5,0±1,5	4,0±3,5	13,0±7,5	36,0±8,5 *
5	5,0±7,5	5,0±0,6	8,0±3,0	9,0±6,8	19,0±6,5	39,0±9,1*

Resultados expresados en porcentaje como $\bar{X} \pm DS$ (*) Porcentajes de células significativamente mayores para la cepa CbaAr-4005 ($p < 0,05$) respecto a 78V-6507 y control (-). AT: apoptosis temprana, AL: apoptosis tardía, C: control

En los primeros días de la infección, no se evidenció diferencia entre las poblaciones V de los cultivos infectados, respecto al control. Se observó un pequeño aumento de las células en apoptosis (AT y AL). Por el contrario, en los últimos días pi, se evidenció un aumento importante de las células AL, con disminución de las células V.

En los días 4 pi y 5 pi, con la cepa CbaAr-4005 se evidenció un aumento significativo en el porcentaje de células AL respecto a los controles negativos (36,0±8,5% vs 4,0±3,5% y 39,0±9,1% vs 9,0±6,8%, respectivamente) y a las células infectadas con 78V-6507 (36,0±8,5% vs 13,0±7,5% y 39,0±9,1% vs 19,0±6,5%) (Figura 21).

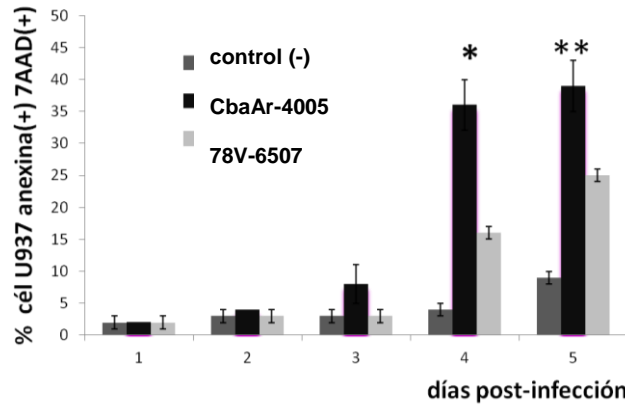


Figura 21. Porcentajes de células U937 en apoptosis tardía en cultivos controles (-) e infectados con SLEV cepa 78V-6507 y CbaAr-4005, a distintos días pi. Valores significativamente mayores para la cepa CbaAr-4005 respecto al control (-). * ($p=0,004$) ** ($p=0,02$)

4.4.2 Determinación de caspasa-3 activa

En los cultivos infectados con ambas cepas virales se detectó la presencia de células con mayor expresión de caspasa-3 activa. Las Figura 22 y 23 muestran diferentes estrategias para medir porcentaje o frecuencia de células que expresan caspasa-3 activa. La Figura 22 representa el porcentaje de células caspasa-3 activa (+) en función de FSC y en la Figura 23 el histograma de la frecuencia de distribución de las células caspasa-3 activa (+).

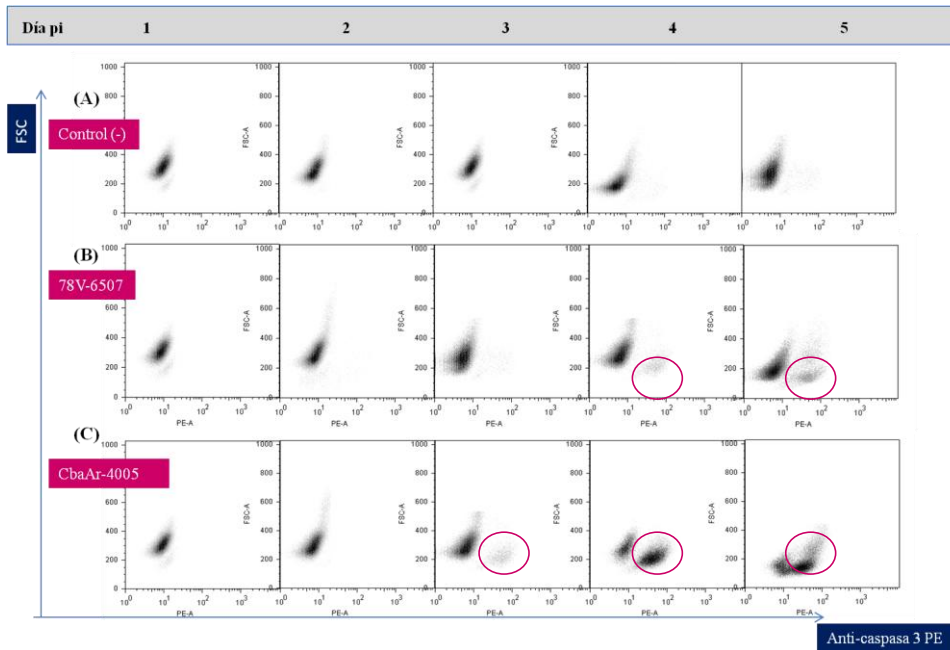


Figura 22. Determinación de caspasa-3 activa en cultivos infectados por SLEV a distintos días pi. (A) células U937 control (-), (B) células U937 infectadas con SLEV cepa 78V-6507 y (C) células U937 infectadas con SLEV cepa CbaAr-4005. El círculo fucsia determina la población de células U937 (+) caspasa-3 activa.

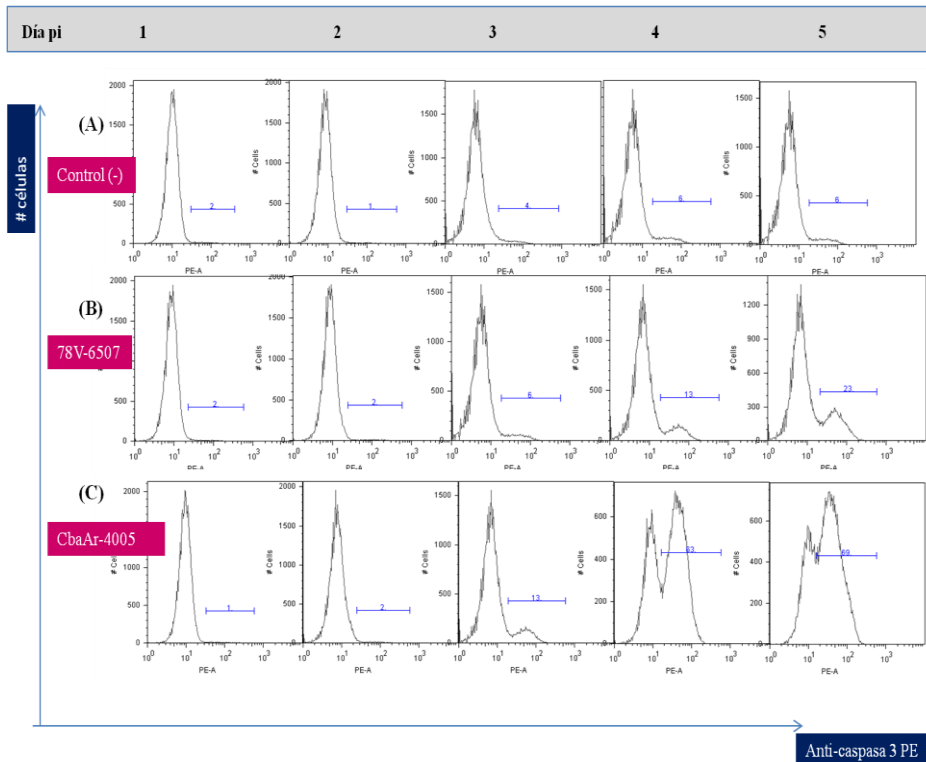


Figura 23. Determinación de caspasa-3 activa en cultivos infectados por SLEV a distintos días pi. (A) células U937 control (-), (B) células U937 infectadas con SLEV cepa 78V-6507 y (C) células U937 infectadas con SLEV cepa CbaAr-4005. La barra azul demarca el porcentaje de células U937 (+) para caspasa-3 activa.

Los porcentajes de las células positivas para caspasa-3 activa, obtenidos a diferentes días pi con SLEV se muestran en la Tabla V. Desde el día 4 pi, se evidenció un aumento en el porcentaje de células que expresaban caspasa-3 activa en la infección por ambas cepas de SLEV.

Tabla V. Porcentajes de las células positivas para caspasa-3 activa en células controles (-) y cultivos infectados con SLEV cepa 78V-6507 y CbaAr-4005, a distintos días pi.

Días pi	Control (-)	SLEV 78V-6507	SLEV Cba Ar- 4005
1	2±1,0	2±1,0	1±0,8
2	1±0,5	2±0,7	2±0,5
3	2±0,8	6±2,5	13±3,5
4	4±1,7	14±3,7 ⁺	63±6,5 [*]
5	6±2,0	23±5,3 ⁺	69±5,5 [*]

Resultados expresados en porcentaje como $\bar{X} \pm DS$.
 Porcentajes de células (+) para caspasa-3 activa significativamente mayores (*) CbaAr-4005 respecto a 78V-6507 y control. (+) 78V-6507 respecto al control.

4.4.3 Prueba de TUNEL

En la Figura 24 se muestra la presencia de células con características morfológicas propias de apoptosis, como condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y presencia de cuerpos apoptóticos, luego de la infección viral.

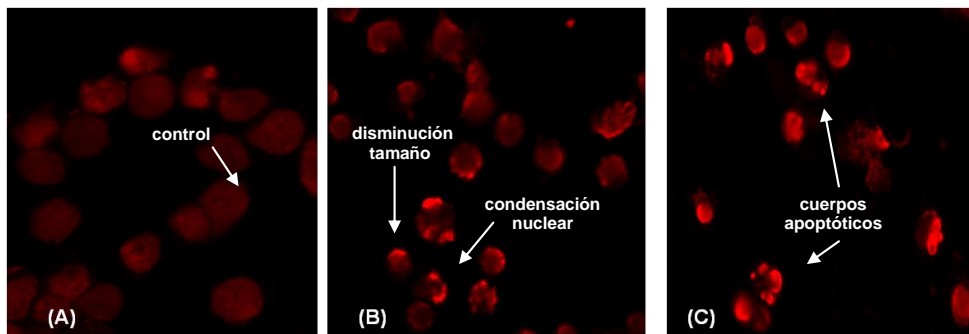


Figura 24. Prueba de TUNEL. (A) control (-). (B) células U937 infectadas con SLEV cepa 78V-6507 5d pi. (C) células U937 infectadas con SLEV cepa CbaAr-4005 5d pi. Microscopio de epi-fluorescencia Olympus Motorized Inverted Research, Modelo IX81 (Objetivo 60X). Imaging Software: Cell M.

4.4.4 Determinación de la disminución del potencial de membrana mitocondrial.

Una vez demostrado que el proceso apoptótico era el responsable de la muerte de las U937 en la infección por SLEV, se evaluó la capacidad del virus para inducir la activación de la vía mitocondrial o intrínseca de la apoptosis. Para ello, medimos la disminución del potencial de membrana mitocondrial mediante la captación del colorante TMRE, en los últimos tres días de la infección. Según los resultados de la CF, al comparar los histogramas de la captación de TMRE de las células infectadas respecto al control, se observó claramente un desplazamiento hacia la izquierda, indicando la pérdida de la captación del TMRE en los días 4 y 5 pi (Figura 25).

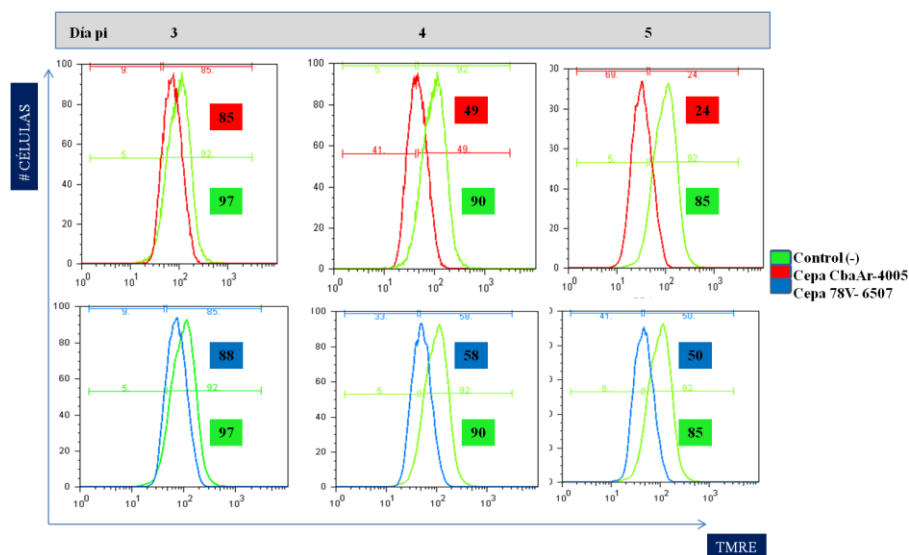


Figura 25. Captación del colorante TMRE de células viables (gate 7-AAD negativo), de cultivos infectados con SLEV a distintos días pi y controles. En verde, histograma de U937 control (-), en azul U937 infectadas con cepa 78V-6507 y en rojo U937 infectadas con cepa CbaAr-4005. Los números en el mismo color del histograma indican el % de células U937 que captaron el TMRE.

En los días 4 y 5 pi con CbaAr-4005 y 78V-6507 se evidenció una disminución significativa ($p < 0,05$) del porcentaje de células TMRE (+) (células con potencial de membrana conservado) respecto a los controles (-) (Figura 26) y un aumento significativo del porcentaje de células TMRE (-) (células con disminución del potencial de membrana mitocondrial) (Figura 27). Dado que la disminución de la captación de TMRE indica pérdida de la polaridad de la membrana interna de la mitocondria, hecho temprano en la apoptosis intrínseca, estos resultados evidencian que el SLEV activa la vía mitocondrial de muerte celular por apoptosis.

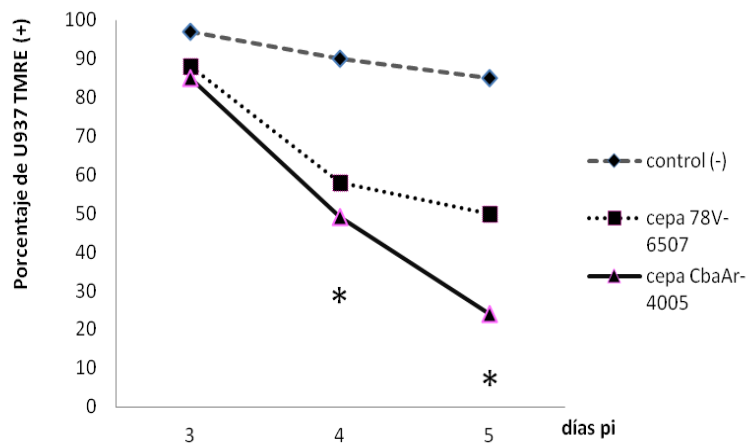


Figura 26. Porcentaje de células con polaridad de membrana conservada, según la captación de TMRE por células U937 controles y de cultivos infectados con SLEV cepa 78V-6507 y CbaAr-4005 a distintos días pi. * Indica disminución significativa para CbaAr-4005 y 78V-6507 respecto al control (-) ($p < 0,05$).

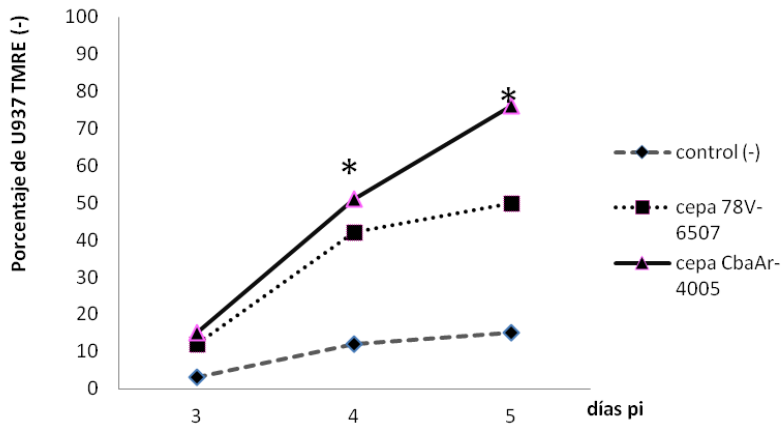


Figura 27. Porcentaje de células con disminución del potencial de membrana mitocondrial determinado por la falta de captación de TMRE por células U937 controles y de cultivos infectados con SLEV cepa 78V-6507 y CbaAr-4005 a distintos días pi. * Indica aumento significativa para CbaAr-4005 y 78V-6507 respecto al control (-) ($p < 0,05$).

4.5 Expresión de antígenos de superficie y receptores en células U937 infectadas con SLEV.

En la Tabla VI se exponen los cambios en la expresión del antígeno CD14 en células controles e infectadas con SLEV cepas 78V-6507 y CbaAr-4005. El porcentaje de células U937 que expresaron de manera basal el antígeno CD14 fue muy bajo, lo que está en consonancia con el estado de inmadurez ontogénica de la línea celular. En los primeros días pi no se evidenciaron cambios en la expresión de CD14. Sin embargo en los días 4 y 5 pi se comprobó un aumento en el porcentaje de células CD14⁺. Este aumento fue significativamente mayor en la infección con la cepa CbaAr-4005 respecto a la cepa 78V-6507 y control (-).

Tabla VI. Expresión de CD14 en la membrana de las células U937 sin infectar e infectadas con SLEV 78V6507 y CbaAr-4005 a distintos días pi.

Días pi	Porcentaje de células CD14 ⁺		
	Control (-)	SLEV 78V-6507	SLEV Cba Ar-4005
1	1,2±0,5	3,0±1,4	2,0±0,8
2	3,2±1,5	2,1±0,8	2,5±1,7
3	1,5±1,7	3,7±0,6	6,0±3,5
4	4,2±2,9	9,5±3,6	37,5±4,2*
5	11,7±3,3	15 ±4,1	41,5±8,7*

Resultados expresados como $\bar{X} \pm DS$.

*Indica porcentajes de células CD14⁺ significativamente mayores para la cepa CbaAr-4005 ($p < 0,05$) respecto a cepa 78V-6507 y al control (-).

Cuando se analizaron los gráficos de densidad de distribución de CD14 en función de SSC y FSC por CF, se evidenció que la población CD14⁺ poseía mayor SSC y menor FSC, es decir mayor complejidad citoplasmática y menor tamaño que las CD14⁻ (Figura 28 A-B).

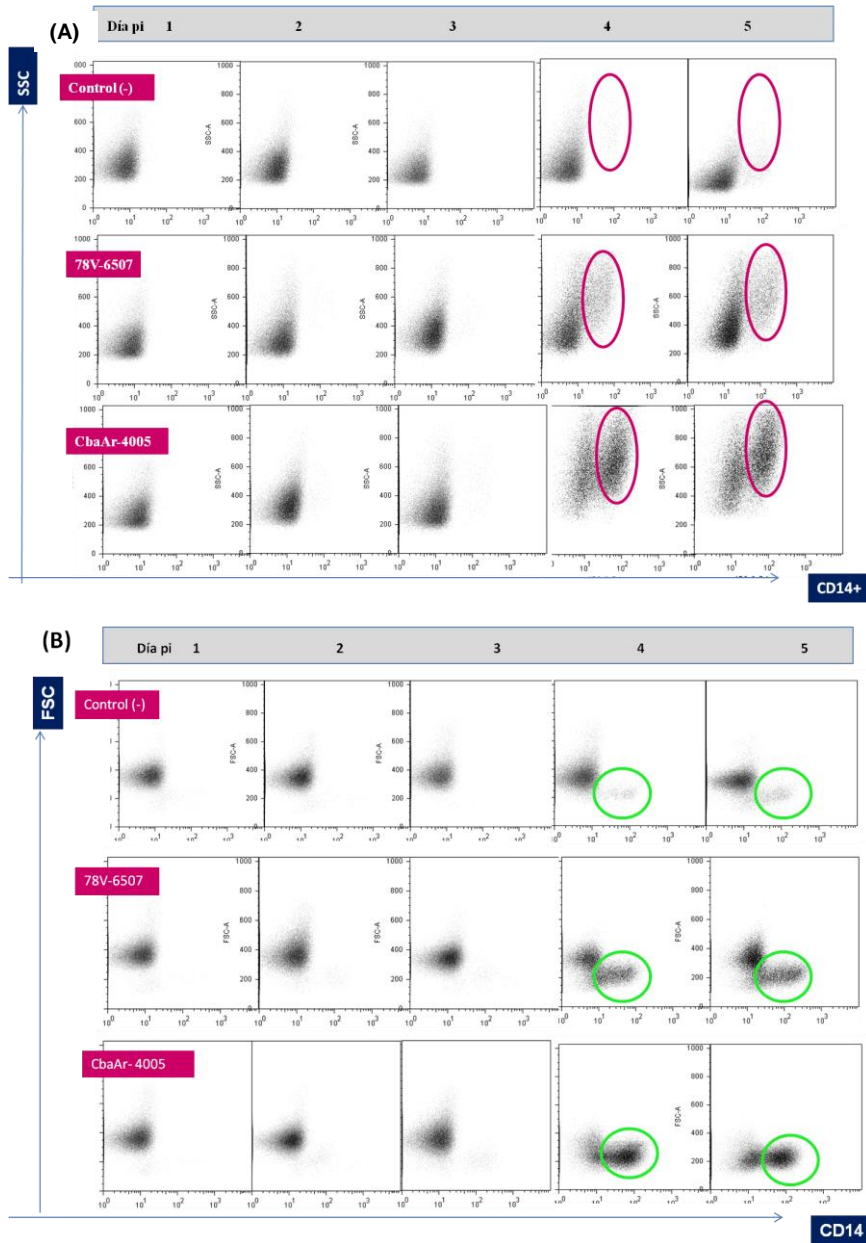


Figura 28. Gráficos de densidad de distribución de células U937 CD14⁺ (A) en función de SSC y (B) en función de FSC. Los círculos fucsias y verdes, demarcan la población de células U937 CD14⁺.

Al realizarle la marcación Anexina V-PE y 7-AAD a células infectadas con la cepa CbaAr-4005, se observó que el 85 ± 5 % de las células CD14⁺ en el día 4 pi y el 92 ± 7 % en el día 5 pi, marcaban anexina, correspondiendo entonces con células

apoptóticas. De estas sólo el $54\pm 3\%$ en el día 4 pi y $53\pm 5\%$ en el día 5 pi permanecían viables (siendo 7-AAD -). (Figura 29).

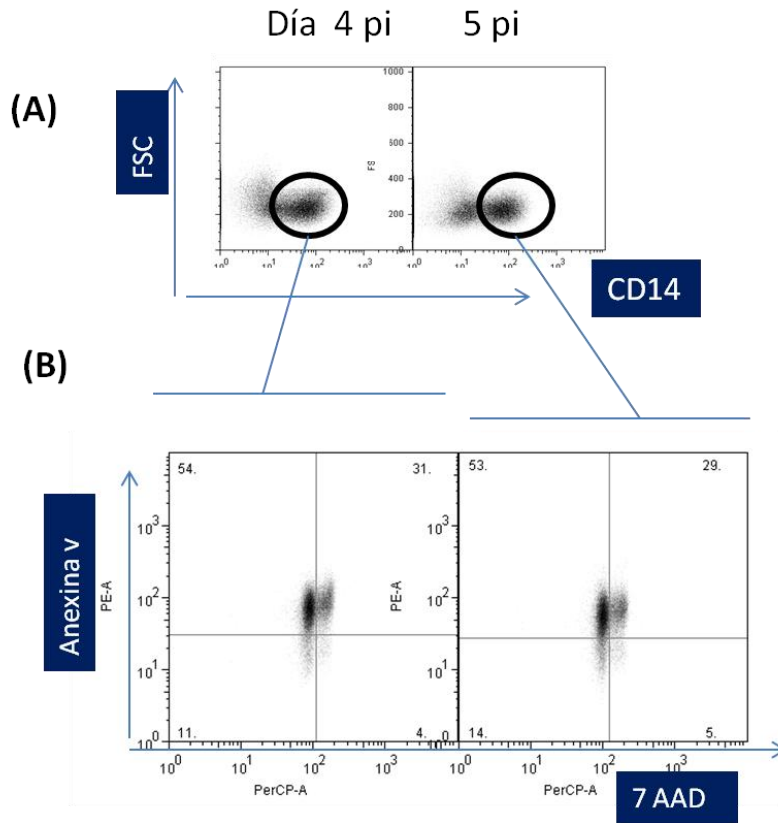


Figura 29. (A) Gráfico de densidad de distribución de células U937 CD14 vs FSC infectadas con SLEV CbaAr-4005 a los 4 y 5 días pi. (B) Gráficos de densidad de distribución anexina V-PE vs 7-AAD del gate de CD14+ de (A).

Cuando se analizó la relación entre la viabilidad celular en función de la expresión de CD14 a medida que transcurrían los días pi, se obtuvo una correlación negativa muy significativa entre ambos parámetros. Como se observa en la Figura 30, la disminución de la viabilidad celular a medida que aumenta la expresión CD14 fue significativa en la infección con CbaAr-4005 ($R=-0,97$; $p=0,01$) y con 78V-6507 ($R=-0,98$; $p=0,0001$).

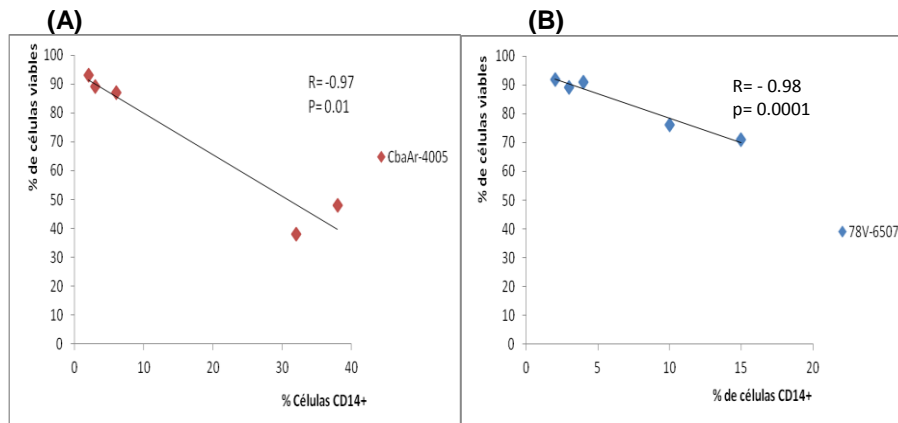


Figura 30. Correlación entre el porcentaje de células viables vs porcentaje de U937 CD14⁺ (A) en la infección por SLEV CbaAr-4005. (B) en la infección por SLEV 78V-6507.

Cuando se evaluó la expresión de HLA-DR se observó una expresión basal de este antígeno sobre la membrana de las células U937. Por ello, se decidió evaluar el número de moléculas HLA-DR sobre las células durante el transcurso de la infección con SLEV. Este parámetro se representó por la IMF para HLA-DR. Al analizar la cinética de la expresión de HLA-DR según el transcurso de la infección, se observó que en las células controles (-) hubo una disminución paulatina en el número de moléculas HLA-DR a medida que transcurrieron los días pi. En cambio en las células de los cultivos infectados se observó un descenso marcado de la expresión de HLA-DR durante los tres primeros días pi, y un aumento significativo en los dos últimos días pi en la infección con CbaAr-4005 (Figura 31).

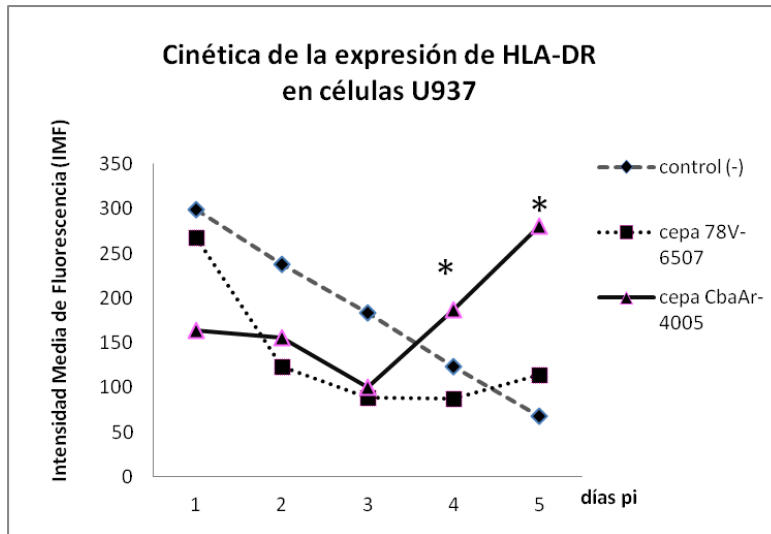


Figura 31. Cinética de la expresión de HLA-DR sobre la membrana plasmática de células U937 controles y de cultivos infectados con SLEV cepa 78V-6507 y CbaAr-4005 a distintos días pi. Resultados expresados como unidades arbitrarias de Intensidad media de fluorescencia (IMF) obtenidos por CF. * Indica aumento significativo de IMF de HLA-DR para la cepa CbaAr-4005 respecto a cepa 78V-6507 y al control (-) ($p < 0,05$).

Al observar los gráficos obtenidos por CF de la densidad de distribución de HLA-DR en función de SSC se identificó, en los dos últimos días pi de células U937 infectadas con cepa CbaAr-4005, una subpoblación de células con alta expresión de HLA-DR, que se las denominó HLA-DR⁺⁺ (Figura 32). En la infección con 78V-6507 no se visualizó esta población HLA-DR⁺⁺.

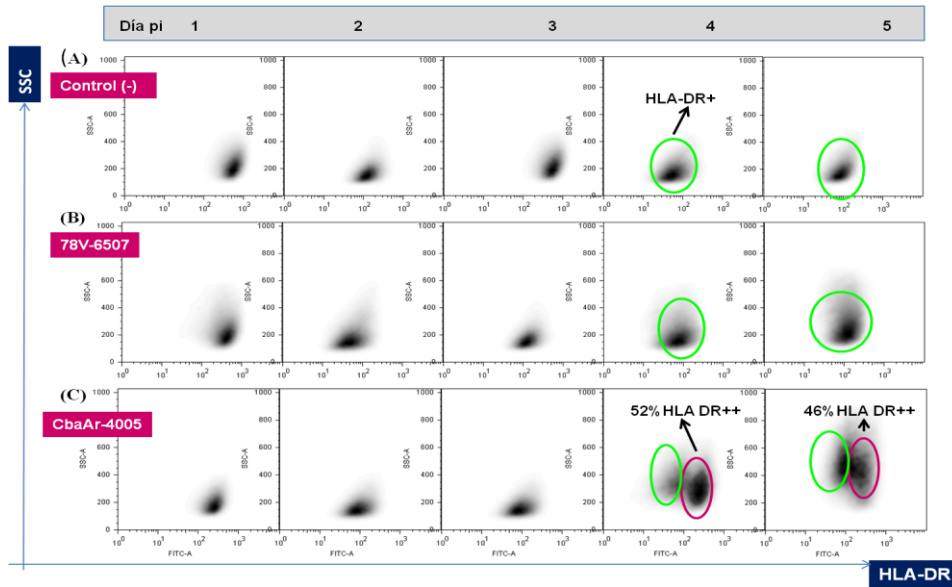


Figura 32. Gráficos de densidad de distribución de la expresión de HLA-DR en la membrana plasmática de células U937 correspondiente a un experimento representativo. (A) control (-), (B) infección con SLEV cepa 78V-6507 y (C) infección con SLEV cepa CbaAr-4005. El círculo fucsia demarca la subpoblación HLA-DR⁺⁺ y el verde la subpoblación HLA-DR⁺.

La subpoblación HLA-DR⁺⁺ presentó una alta viabilidad ya que más del 90% de las células fueron negativas para 7-AAD a diferencia de las células HLA-DR⁺ que manifestaron muerte celular en más del 90% de las mismas (positivas para 7-AAD) (Figura 33). Por otro lado se observó que las HLA-DR⁺⁺ eran CD14⁻ negativas (Figura 34).

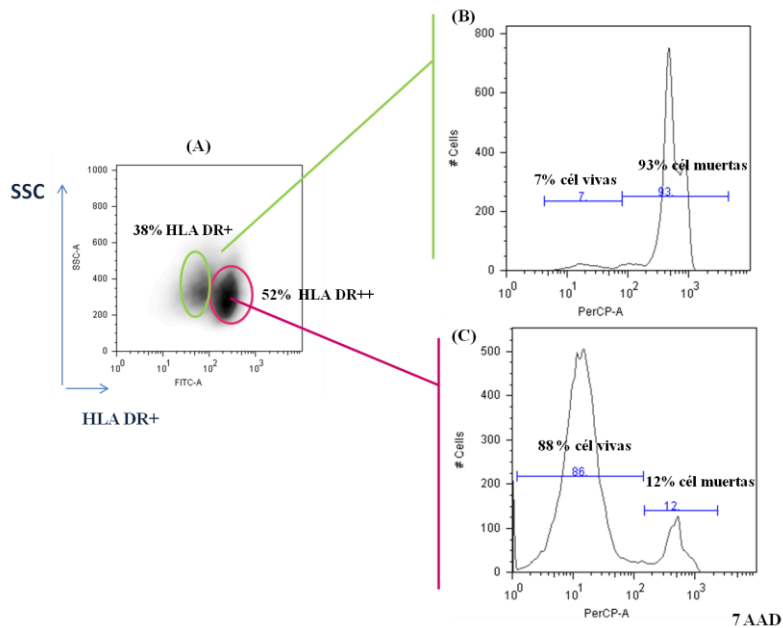


Figura 33. (A) Gráfico de densidad de distribución de HLA-DR vs SSC en células U937 infectadas con SLEV CbaAr-4005 a 4 días pi (B) Histograma de frecuencia de marcación para 7-AAD de células HLA-DR⁺ (7% de células viables, negativas para 7AAD). (C) Histograma de frecuencia de marcación para 7-AAD de células HLA-DR⁺⁺ (86% de células viables, negativas para 7AAD).

Con formato: Derecha: 1.18 cm

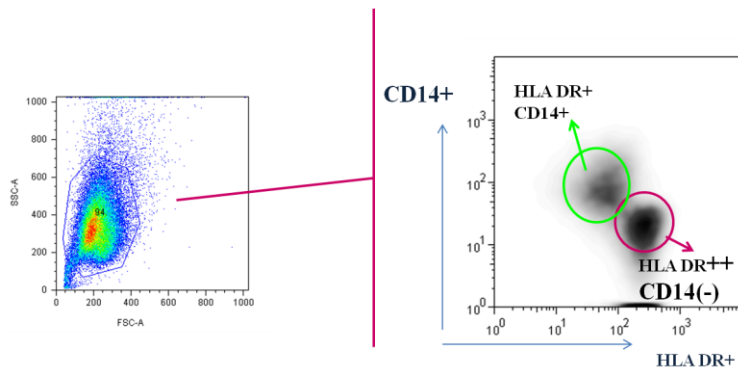


Figura 34. Gráficos de densidad de distribución de la expresión de HLA-DR vs CD14 en la membrana plasmática de células U937 infectadas con SLEV cepa CbaAr-4005 a 5 d pi. El círculo fucsia demarca la subpoblación HLA-DR⁺⁺ CD14⁻ y el verde la subpoblación HLA-DR⁺ CD14⁺.

Con formato: Sangría: Izquierda: 2.75 cm, Derecha: 1.18 cm, Punto de tabulación: 14.81 cm, Izquierda

Dentro de los receptores evaluados, se analizó la expresión en la membrana plasmática del receptor Fas o CD95 que es el receptor del ligando Fas. Para ello se compararon los histogramas de CF para la IMF de CD95 de las células infectadas con ambas cepas de SLEV respecto al control, a los distintos días pi. Si bien se observó en los días 4 y 5 pi un desplazamiento hacia la izquierda del histograma, indicando aumento de la IMF de CD95 en las células U937 procedentes de la infección con CbaAr- 4005, el análisis estadístico de los datos determinó que no hubo diferencias significativas en los resultados (Figura 35).

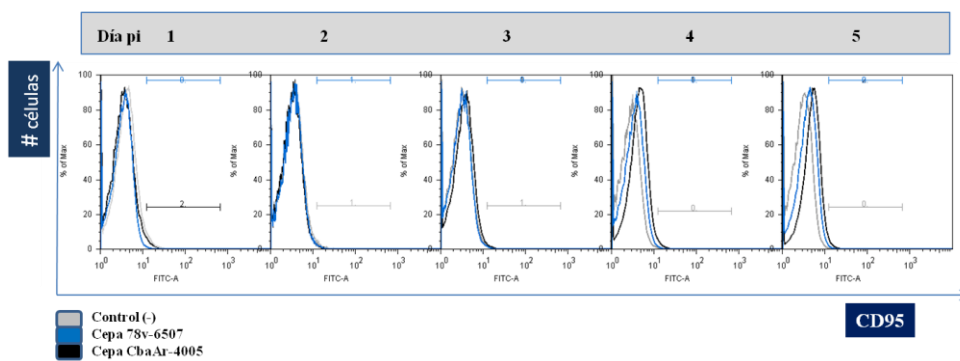


Figura 35. Frecuencia de la expresión de CD95 en la membrana plasmática de células U937 de cultivos infectados con SLEV a distintos días pi. En gris control (-), en azul SLEV cepa 78V-6507 y en negro SLEV cepa CbaAr- 4005.

Respecto a la expresión de TLR, se evaluó el nivel de expresión del TLR-3 o CD283 y del TLR-2 o CD282. La expresión de TLR-3 se observó en el primer día pi, donde un bajo porcentaje de células U937 expresaron el TLR-3 ($7 \pm 1,5\%$ CbaAr-4005, $6 \pm 0,5\%$ 78V-6507 vs 0% control). En los días pi posteriores, los niveles de expresión disminuyeron siendo similares al control (Figura 36).

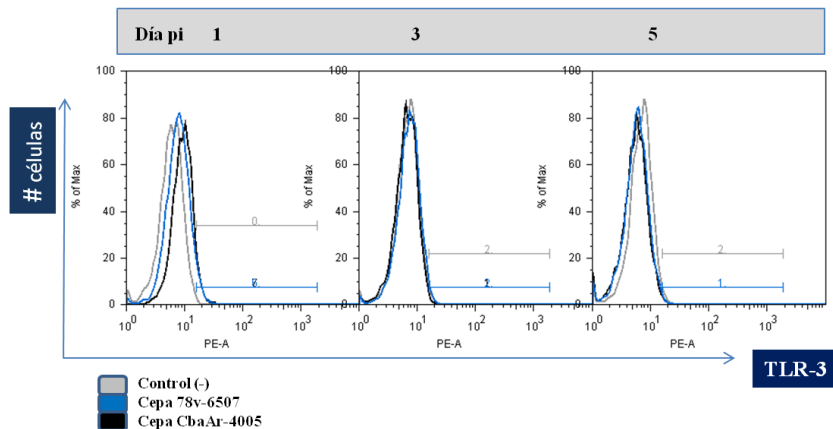


Figura 36. Frecuencia de la expresión intracelular de TLR-3 en células U937 infectadas con SLEV a distintos días pi. En gris control (-), en azul SLEV cepa 78V-6507 y en negro SLEV cepa CbaAr-4005.

Distintos fueron los resultados en la cinética de la expresión de TLR-2. En el primer día pi las células provenientes de cultivos infectados con CbaAr-4005 o 78V-6507 manifestaron una disminución de la expresión del receptor, tal como se aprecia por la corrida de sus histogramas de frecuencia hacia la izquierda del control, lo que indica menor valor de IMF para TLR-2. En los días 4 y 5 pi, en cambio, las células provenientes de la infección con CbaAr-4005 presentaron un aumento en la expresión de TLR-2, representado por un aumento en la IMF, respecto al control (-) y la infección por 78V-6507 (Figura 37).

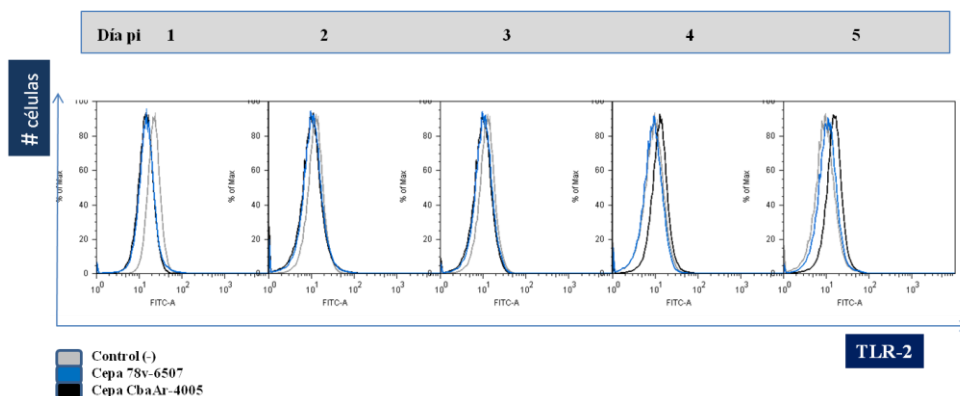


Figura 37. Frecuencia de la expresión intracelular de TLR-2 en células U937 de cultivos infectados con SLEV a distintos días pi, correspondientes a un experimento representativo. En gris control (-), en azul SLEV cepa 78V-6507 y en negro SLEV cepa CbaAr-4005.

4.6 Producción de inmunomoduladores en la infección de U937 con SLEV.

En este estudio se evaluaron los niveles de citoquinas TNF e IL-6 como representantes de las citoquinas proinflamatorias y de IL-10 como citoquina anti-inflamatorias. Los resultados se expresan a continuación en la Tablas VII-A, B y C.

Tablas VII. Concentración de citoquinas (A)- TNF, (B)- IL-6, (C)- IL-10 en sobrenadante de U937 infectadas con SLEV 78V-6507 y CbaAr-4005a distintos días pi.

(A) TNF			
Días pi	Control (-)	SLEV 78V-6507	SLEV Cba Ar- 4005
1	0±0	1,6±2	0±0
2	0±0	1,9±2,5	0±0
3	1,7±0,5	5,0±1,4	6,0±3,7
4	2,8±0,7	7,6±2,5	15,4±6*#
5	3,8±1,5	9,2±3,2	24,0±9,2*

(B) IL-6			
Días pi	Control (-)	SLEV 78V-6507	SLEV Cba Ar- 4005
1	0±0	0±0	2,0±1,7
2	0±0	0±0	4,0±2,8
3	0±0	4,7±2,2	9,0±2,1*
4	0±0	4,5±2,0	11,7±6,4
5	3,0±1,9	12,2±4,5	26,2±10

(C) IL-10			
Días pi	Control (-)	SLEV 78V-6507	SLEV Cba Ar- 4005
1	15,0±5,5	34,7±9,5*	10,0±3,2
2	12,2±3,5	15,2±5,2	6,6±2,4
3	8,6±2,9	12,5±6,0	7,8±3,5
4	8,4±5,4	18,2±4,5	16,8±7,9
5	7,6±3,7	19,7±7,5	21,0±6,7

Resultados expresados en pg/mL como $\bar{X} \pm DS$. * Indica valores de concentración significativamente mayores para la cepa CbaAr-4005 respecto al control (-) ($p < 0,05$). # Indica valores de concentración significativamente mayores para CbaAr-4005 respecto 78V-6508 ($p < 0,05$). + Indica valores de concentración significativamente mayores para 78V-6508 respecto CbaAr-4005 ($p < 0,05$).

4.7 Relación entre los diferentes parámetros medidos según la infección de las células U937 con SLEV cepa CbaAr-4005 y cepa 78V-6507.

En primer lugar, se compararon los valores del número de copias virales, apoptosis y porcentaje de U937 CD14+ determinados en la infección con cada cepa de SLEV, según lo muestra la Figura 38. Hasta el día 3 pi no hubo diferencias significativas pero en los días posteriores hubo un aumento de los tres parámetros en la infección por CbaAr-4005 respecto a 78V-6507.

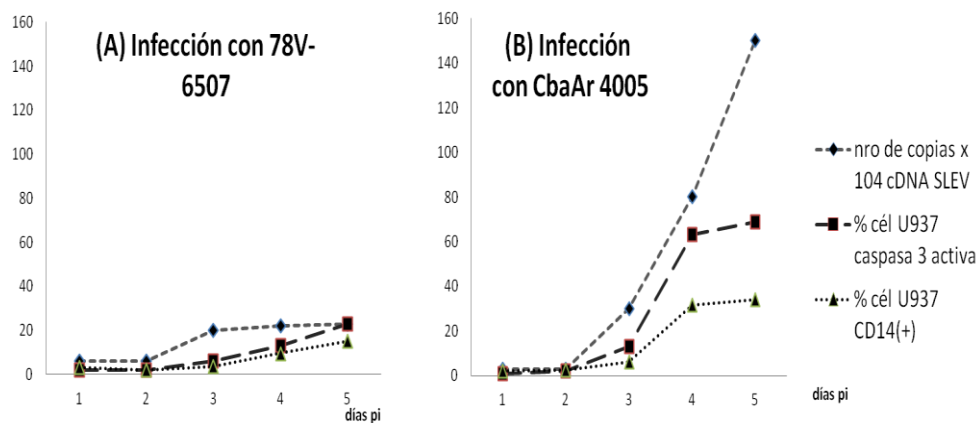
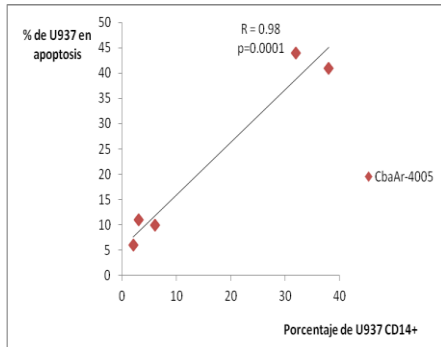


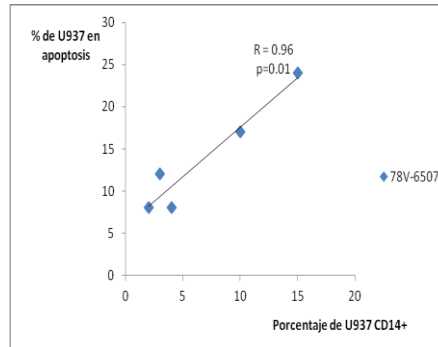
Figura 38. Representación del número de copias de ADN viral (x104), porcentaje de células en apoptosis (caspasa-3 activa) y porcentaje de U937 CD14+ a distintos días pi.

Al analizar la relación entre estos parámetros, se determinó una correlación positiva entre el nivel de apoptosis vs. el porcentaje de células CD14+ ($R=0,98$; $p=0,001$) y el nivel de apoptosis vs el número de copias virales ($R=0,93$; $p=0,02$) para la infección con CbaAr-4005 (Figura 39-A y C). Por el contrario, con la cepa 78V-6507 la correlación positiva fue sólo entre el porcentaje de células en apoptosis vs el porcentaje de células CD14+ ($R=0,96$; $p=0,01$) (Figura 39-B) no existiendo correlación significativa entre el nivel de apoptosis y el número de copias virales.

(A)



(B)



(C)

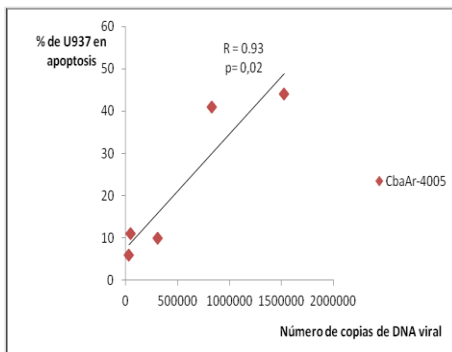


Figura 39. (A) y (B): Correlación entre el porcentaje de células en apoptosis versus porcentaje de células U937 CD14+. (C): Correlación entre el porcentaje de células en apoptosis versus número de copias de DNA viral en la infección por SLEV. En rombos rojos CbaAr-4005 y azules 78V-6507.

No hubo correlación estadísticamente significativa entre el porcentaje de células U937 CD14+ y el nivel de copias de DNA viral, para ninguna de las dos cepas estudiadas (Figura 40).

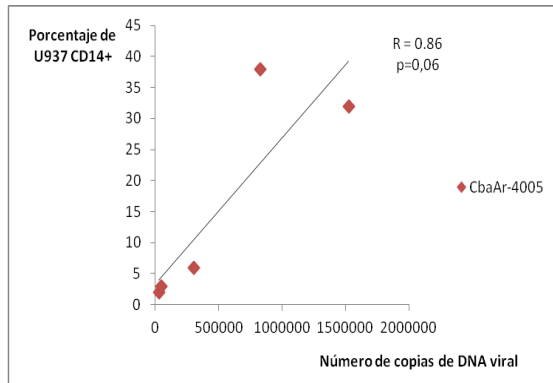
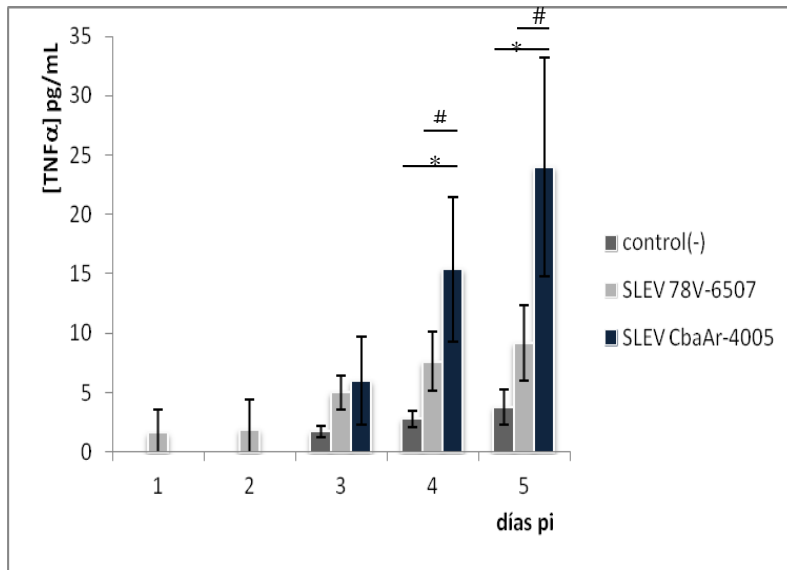


Figura 40. Correlación entre el porcentaje de células U937 CD14+ vs Número de copias de DNA viral en la infección por CbaAr-4005 SLEV.

Respecto a las citoquinas proinflamatorias liberadas por las células U937 infectadas por SLEV, con la cepa 78V-6508 hubo producción de TNF desde el día 1 pi y durante los cinco días del ensayo. Si bien los niveles aumentaron durante los últimos días, no hubo diferencia significativa respecto a los controles. Con la cepa CbaAr-4005, la producción de TNF fue más tardía, en los dos primeros días pi no se detectó esta citoquina, recién en el día 3 pi, evidenciando un aumento significativo en el día 4 (respecto a 78V-6508 y controles) y 5 pi (respecto a controles). Respecto a los niveles de IL-6, la infección por CbaAr-4005 produjo un aumento de esta citoquina desde el día 1 pi, siendo su aumento significativo respecto al control en el día 3pi. La infección por 78V-6507, en cambio, produjo IL-6 recién a partir del día 3 pi y en niveles más bajos que CbaAr-4005 (Figura 41).

(A)



(B)

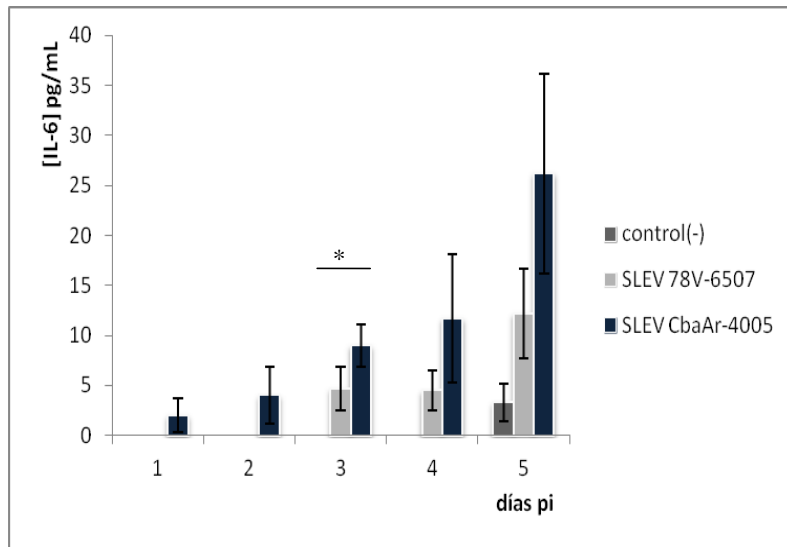


Figura 41. Diagrama de barras de concentración de citoquinas (A) TNF y (B) IL-6. Determinación por ELISA en sobrenadante de cultivos de U937 controles e infectadas con SLEV cepa 78V-6507 y CbaAr-4005, a distintos días pi. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar ($\bar{X} \pm DS$) en pg/mL. *Indica valores de concentración significativamente mayores para la cepa CbaAr-4005 respecto al control ($p < 0,05$). # Indica valores de concentración significativamente mayores para CbaAr-4005 respecto 78V-6508 ($p < 0,05$).

Al analizar la correlación entre la apoptosis de las células U937 y la concentración de las citoquinas proinflamatorias, se determinó una correlación positiva entre el porcentaje de células en apoptosis y los niveles de TNF en la infección con la cepa CbaAr-4005 ($R=0,94$; $p=0,02$) (Figura 42), no así con 78V-6507 ($R=0,78$; $p=0,12$). No existió correlación estadísticamente significativa entre el porcentaje de célula en apoptosis y la concentración de IL-6 para ninguna de las cepas ($R=0,85$; $p=0,07$ para CbaAr-4005 y $R=0,82$; $p=0,09$ para 78V-6507).

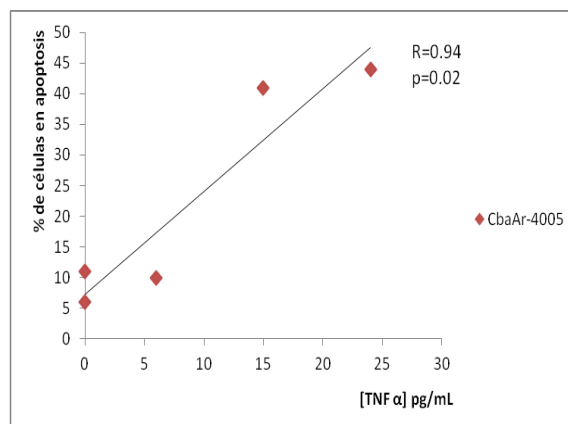


Figura 42. Correlación entre el porcentaje de células U937 en apoptosis versus [TNF] en pg/mL en la infección con la cepa CbaAr-4005

Por otro lado, al analizar la relación entre la concentración de citoquinas proinflamatorias con la cantidad de virus, se obtuvo una correlación positiva entre las concentraciones de TNF vs. número de copias virales ($R=0,99$; $p=0,0001$) e IL-6 vs el número de copias virales para la infección con CbaAr-4005 ($R=0,96$; $p=0,0001$) (Figura 43 A y B). No se obtuvo correlación estadísticamente significativa entre concentraciones de TNF vs número de copias virales ($R=0,85$; $p=0,07$) e IL-6 vs el número de copias virales ($R=0,73$; $p=0,17$) para la infección con 78V-6507.

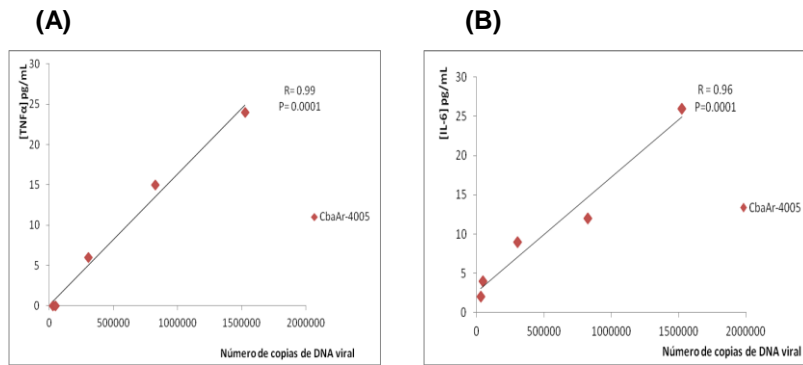


Figura 43. Correlación entre (A) [TNF- α] vs. el número de copias de DNA viral. (B) [IL-6] vs. el número de copias de DNA viral en la infección con cepa CbaAr-4005.

Respecto a la producción de citoquinas antiinflamatorias, las células U937 produjeron IL-10 de manera basal, cuya concentración se mantuvo en valores relativamente constantes a lo largo de los días post-cultivos en los controles (Figura 44). En la infección por la cepa 78V-6507, en cambio, se observó una concentración elevada en el día 1pi de IL-10 con valores significativos respecto a cepa CbaAr-4005 ($p < 0,05$); en los días posteriores pi los niveles disminuyeron siendo similares a los de la infección por la cepa CbaAr-4005 y controles. La infección con CbaAr-4005 no produjo cambios significativos respecto al control, durante los días pi estudiados.

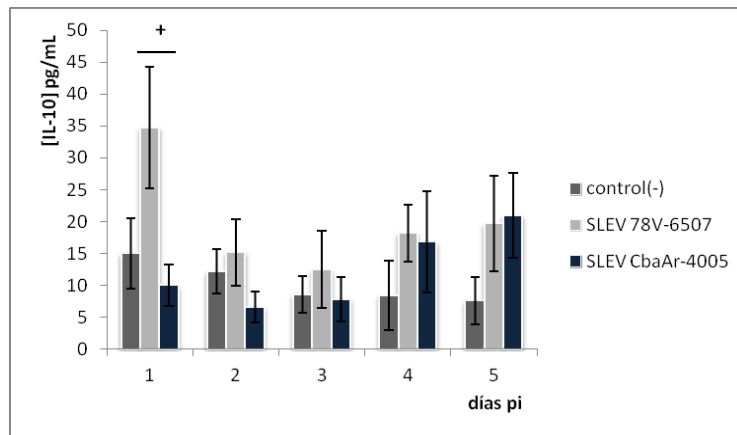


Figura 44. Niveles de IL-10 en sobrenadante de cultivos de células U937 infectadas con SLEV cepa 78V-6507 y CbaAr-4005 a distintos días pi. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar ($\bar{X} \pm DS$) en pg/mL. + Indica valores de concentración significativamente mayores para la cepa 78V-6508 respecto a CbaAr-4005 respecto ($p < 0,05$).

Cuando se relacionaron los diferentes parámetros con la concentración de IL-10, se halló correlación positiva, en la infección por la cepa CbaAr-4005, entre el número de copias de DNA viral vs la concentración de la IL-10 ($R=0,95$; $p=0,01$) (Figura 45-A) y entre el porcentaje de células en apoptosis y la concentración de la IL-10 ($R=0,95$; $p=0,02$) (Figura 45-B). Con la cepa 78V-6507 no hubo correlación significativa entre número de copias de DNA viral con el nivel de IL-10, tampoco entre el porcentaje de células en apoptosis y la concentración de la IL-10.

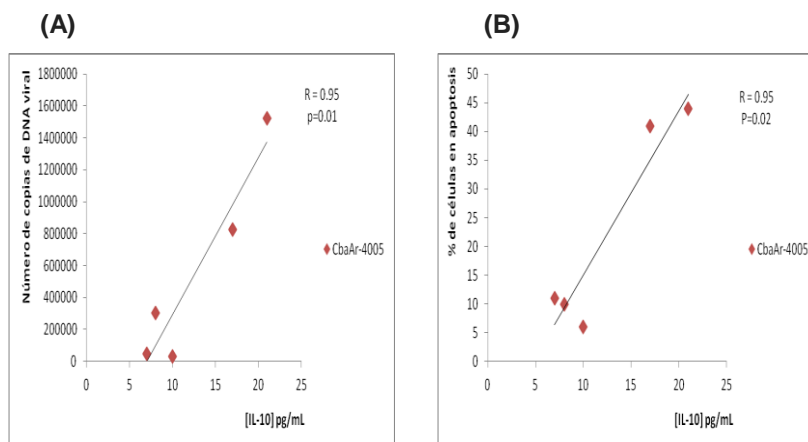


Figura 45. Correlación entre (A) número de copias de DNA viral vs [IL-10]. (B) el porcentaje de células en apoptosis vs la [IL-10] en la infección por CbaAr-4005.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha investigado la interacción entre SLEV, flavivirus endémico en Argentina, y células de la inmunidad innata, en un modelo de infección *in vitro* de monocitos humanos (células U937) con cepas de distinta virulencia y condiciones epidemiológicas de aislamiento (CbaAr- 4005 y 78V-6507). Se evaluó la capacidad de infectar y replicar del virus, se identificó el mecanismo de muerte de la célula hospedadora y se lo cuantificó, se caracterizó el perfil fenotípico y funcional de activación del monocito, según expresión de antígenos de superficie, receptores y patrón de mediadores biológicos (citoquinas) secretado. Así mismo se compararon los resultados obtenidos con cada cepa, ya que diferencias cuantitativas o cualitativas podrían estar relacionadas con la virulencia y condiciones epidemiológicas de aislamiento de las mismas.

5.1 Capacidad de infección y replicación de SLEV en monocitos humanos.

Las células U937 son una de las líneas celulares más utilizadas en modelos de investigación *in vitro* para la evaluación de la maduración del linaje monocítico y el subsecuente análisis biológico de sus características funcionales (1). Esto se debe, a que al inducir su diferenciación, desarrollan características morfológicas y funcionales de maduración similares a las descritas para las células monocíticas normales, adquiriendo un gran repertorio de sus funciones (2,3). Los monocitos junto a los macrófagos y las CD son claves en el control de la replicación viral y la propagación de la infección por un flavivirus (4). Así mismo participan en el andamiaje de la respuesta adaptativa frente al patógeno con consecuencia directa sobre el desarrollo y curso de la infección (5).

En este trabajo se demostró que células de linaje monocítico fueron susceptibles a la infección por SLEV con las dos cepas estudiadas 78V-6507 y CbaAr-4005. Sin embargo se observaron diferencias con cada una de ellas. La cepa CbaAr-4005 en el cuarto día de la infección registró un aumento significativo en la tasa de infección, llegando en el último día (día 5 pi) a infectar al 93% de los monocitos. Mientras que en la infección por 78V-6507 el pico de células infectadas

se registró antes, en el tercer día, con un porcentaje menor (30%) de monocitos infectados, respecto a CbaAr-4005.

Estudios de infección de U937 con DENV, mostraron que estas células sin diferenciación previa a macrófagos, fueron susceptibles a la infección con los cuatro serotipos de DENV sólo en presencia de anticuerpos opsonizantes y MOI altas, entre 10 y 20. DENV-3 y DENV-4 mostraron un pico de infección al día 2 pi, próximo al 90% de células infectadas, mientras que para DENV-1 y DENV-2 al día 3 pi (última medición) se alcanzó un 95% de infección (6). Estos hallazgos en DENV hacen que las U937 sean ampliamente utilizadas para evaluar el mecanismo de ADE (del inglés *drive antibody-dependent enhancement*), donde la pre-existencia de anticuerpos no neutralizantes formarían complejos inmunes con el nuevo serotipo favoreciendo la capacidad de infectar al macrófago mediante los receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulinas (7). En la actualidad con la emergencia del ZIKV en Sud y Centro América se utilizan las U937 para evaluar susceptibilidad de progenie mielomonocítica al virus y también analizar la existencia de ADE entre DENV y ZIKV (8).

Referido a SLEV son escasos los antecedentes bibliográficos que identifiquen las células blanco que infecta el virus. Se demostró que los macrófagos peritoneales murinos fueron susceptibles a la infección *in vitro* por la cepa brasilera de SLEV (SPAN 11916)(9), sin registrarse el grado de infección ni de replicación. Otros trabajos han mostrado la susceptibilidad de células mieloides humanas (K562) y de neuroblastoma murino (Neuro2a) a la infección por SLEV cepa Parton, con una alta tasa de infección (10).

En la infección de monocitos humanos aislados de CMSP con DENV-2 cepa 16681 el porcentaje máximos de infección fue del 60% y se alcanzó en el día 2 pi, observándose una disminución de las células infectadas en los días posteriores pi, hasta el 10 % de infección en el día 5 pi (11). Similares resultado se obtuvieron en macrófagos murinos de MO infectados *in vitro* con el JEV cepa Beijing-1, con un pico en la infección del 55% al día 2 pi (12).

Es importante destacar el hallazgo de esta tesis, en cuanto a la susceptibilidad de las U937 respecto a la infección por SLEV. Se demostró que las U937 fueron susceptibles a la infección por SLEV cepas CbaAr-4005 y 78V-6507 a MOI baja y sin necesidad de anticuerpos opsonizantes ni diferenciación química,

demostrando que la cepa epidémica CbaAr-4005 posee un poder de infectividad muy alto.

Además de comprobar la capacidad que poseen ambas cepas de SLEV de infectar monocitos humanos, la cepa CbaAr-4005 demostró mayor capacidad de replicación, hecho que se tradujo en el mayor número de copias genómicas halladas con respecto a 78V-6507. Esto explicaría que casi la totalidad de los monocitos se encontraron infectados en los días que se observó elevado nivel de replicación.

Rivarola 2015 (13) comprobó en modelo murino, que la cepa CbaAr-4005 replica en diferentes órganos (cerebro, bazo, pulmón y riñón), sugiriendo la existencia de algún tipo celular común en estos órganos que permita la replicación de SLEV. Trabajos previos han reportado que CD, macrófagos y neutrófilos actuarían como blancos de replicación para WNV en bazo (14,15). Así mismo, se ha visto que las células mieloides presentes en diversos tejidos linfoides como bazo, timo, médula ósea y nódulos linfáticos no drenantes son blanco de replicación del virus Encefalitis Equina del Este (arbovirus)(16). Siendo que los monocitos son células comunes a los distintos órganos en los que replicó SLEV en el modelo de infección de Rivarola (2015)(13), y en función de haber sido identificados en este trabajo de tesis como células blanco para la replicación de SLEV, se puede inferir que los monocitos serían una de las células implicadas en la replicación del SLEV durante la infección *in vivo*.

Es de destacar también que en la infección de ratones con SLEV se sugirió, en base al tiempo de aparición del virus en los diferentes órganos (en el primer día pi se lo encontró en bazo y riñón, luego en el cuarto día pi en pulmón y por último en el quinto día pi, en cerebro) que la cepa CbaAr-4005 logra ingresar a SNC debido a la existencia de una replicación extraneural previa (13). Esta hipótesis ya ha sido considerada en trabajos previos como el de Wang y col.(2003)(17) quienes utilizando como modelo viral a WNV intercalaron distintas vías de inoculación y dosis virales en ratones y concluyeron que la replicación extraneural sería necesaria para la llegada del virus al SNC. También otro grupo de investigadores vinculó la replicación viral con la neuroinvasividad, ya que observaron que la supresión temprana de la replicación viral en los macrófagos y las células dendríticas, mediante tecnología de interferencia de ARN, fue clave en la prevención del desarrollo de enfermedad neurológica fatal en roedores (18).

Así, según los resultados de este trabajo y los antecedentes bibliográficos antes descriptos se puede hipotetizar que los monocitos estarían implicados en la replicación extraneuronal de la cepa epidémica CbaAr-4005 de SLEV en bazo, riñón y pulmón, lo que generaría un alto nivel de viremia que facilitaría la neuroinvasividad viral manifestada por esta cepa en modelo murino (13). En función de ello se podría considerar que los monocitos tendrían un importante rol en la fisiopatogénesis de la infección por SLEV.

Dado que se han obtenido diferencias significativas en la capacidad de infección de las cepas de SLEV estudiadas, está demostrado que distintas cepas virales pueden replicar de manera diferente, condición probablemente regulada por mecanismos celulares que controlan la replicación y/o maduración viral (19) y este fenómeno a su vez puede constituir un factor determinante en la virulencia de una cepa (20).

Para que una cepa viral sea considerada virulenta es imprescindible tener en cuenta varios factores que involucran tanto a la población viral como a la capacidad del hospedador para responder a la invasión viral (20). Actualmente muchos investigadores coinciden en que la virulencia es un proceso adaptativo que involucra tanto a los mecanismos de transmisibilidad y patogenicidad viral como al potencial de recuperación del hospedador (21).

La virulencia también depende de la capacidad del virus para infectar las células del hospedador, multiplicarse en ellas, diseminarse y producir alteraciones que dan como resultado diferencias en la patogenicidad (22).

Las diferencias en la virulencia entre las dos cepas estudiadas (23) pueden ser causa de múltiples factores. Uno de ellos podría estar relacionado a la capacidad de cada cepa para replicar en los monocitos, teniendo en cuenta la función propuesta para estas células en la fisiopatogénesis de la infección. Esto coincide con la elevada virulencia de CbaAr-4005 en modelo murino demostrado por Rivarola y col (2014)(23), donde la infección en ratones de 21 días de edad por CbaAr-4005 provocó la mortalidad del 100% de los animales, en cambio la infección con 78V-6507 sólo del 30 %. Por otro lado, aves experimentalmente infectadas desarrollaron mayor viremia con CbaAr-4005 respecto a otra cepa no endémica. La mayor virulencia de la cepa CbaAr-4005 también se observó en aves que exhibieron una

viremia mayor con esta cepa aislada de mosquito durante un brote de encefalitis, respecto a la cepa no epidémica 79V-2533 (24).

Sumado a ello, otros autores demostraron que la capacidad de replicación del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (Tick Borne Encephalitis-TBEV) en una línea celular de macrófagos murinos se relacionaba con la virulencia de la cepa en el modelo animal *in vivo* (25).

Por otro lado es importante destacar que SLEV toma como blanco para infectar y replicar a una célula perteneciente a la inmunidad innata, como lo es el monocito. Por lo general, las células del linaje monocito-macrófago suelen tener éxito en eliminar a la mayoría de los microorganismos, sin embargo el patógeno puede evadir los mecanismos microbicidas de estas células, logrando una “convivencia” y utilizándolas para su provecho (26). Se ha comprobado la subordinación de los monocitos por los flavivirus (4). Tal es el caso de DENV que los utiliza para su replicación, aumentando la gravedad de la infección y el daño en el organismo del huésped (27). Un comportamiento similar se le podría atribuir a cepa epidémica de SLEV, CbaAr- 4005. Su alto grado de replicación, permite inferir que logra evadir la capacidad microbicida del monocito y lo utiliza como reservorio para su propio beneficio. Esto le permite generar gran cantidad de viriones posibilitando la diseminación de la infección hacia otras células y tejidos, lo que beneficiaría su invasión a SNC. En cambio, 78V-6507 no podría escapar de la acción del monocito. En la infección por esta cepa se comprobó que el monocito logró limitar para luego inhibir la replicación viral y con ello atenuar la eficacia de la infección por la cepa endémica. Esto explicaría, en parte, la menor virulencia de esta cepa hallada en modelo murino (23).

Para WNV ha sido identificada la estrategia que emplea el virus para evadir la inmunidad innata y así favorecer su replicación. WNV aumenta la biosíntesis de colesterol y genera su redistribución en la membrana plasmática de la célula huésped, lo que provoca una disrupción de los dominios *rafts* lipídicos e inhibición de la acción de los interferones antivirales IFN α/β mediante señalización Jak/Stat (28). Para SLEV no hay estudios preliminares que identifiquen los posibles mecanismos implicados en este proceso. En razón de lo expuesto y en base a los resultados de esta tesis, se podría inferir un comportamiento particular de la cepa CbaAr-4005 reflejado por su capacidad de replicar en una célula de la inmunidad innata, evadiendo la respuesta antiviral del monocito.

5.2 Consecuencias de la infección del SLEV sobre la viabilidad de monocitos humanos.

5.2.1 Identificación del mecanismo de muerte y su relación con la replicación del virus y la virulencia de la cepa.

En este trabajo de Tesis se comprobó que SLEV provoca la muerte de monocitos humanos, hecho que depende del tiempo postinfección (a partir del tercer día) y de la cepa infectante (mayor con CbaAr-4005). Esto coincide con lo reportado por Parquet y col (2002)(10), donde SLEV cepa Parton provocó la muerte celular dependiendo del tiempo pi. Sin embargo, en ese trabajo se halló un número importante de células muertas en días más tempranos pi. Las diferencias halladas respecto al tiempo en la inducción de muerte por SLEV entre este trabajo de tesis y el de Parquet y col. 2002 (10), se pueden justificar en el uso de cepas y líneas celulares diferentes. Así se obtuvo que a la misma MOI=1, la cepa epidémica CbaAr-4005 provoca aproximadamente el doble de mortalidad que la cepa endémica 78V-6507 en la misma línea celular de monocitos humanos. Por otro lado, Parquet y col. 2002 (10) utilizando la misma cepa de SLEV (Parton) a MOI=1 pero en diferentes líneas celulares, obtuvieron distintos valores de mortalidad inducidos a diferentes tiempos de la infección. A partir de esta investigación y los antecedentes descriptos, se puede agregar que la muerte de células huéspedes por SLEV depende tanto de la cepa infectante, del tiempo de transcurso de la infección y del tipo de célula infectada por SLEV.

En este trabajo se observó el efecto citopático provocado por SLEV sobre los monocitos lo que hizo que se sospeche de la apoptosis como mecanismo de muerte ligado a la infección por SLEV. De allí que se utilizaron diferentes estrategias metodológicas a fin de identificar este proceso en sus distintas etapas. De este modo, se comprobó que la infección por ambas cepas de SLEV (CbaAr-4005 y 78V-6507) provocó que los monocitos transloquen el fosfolípido PS (hecho asociado al comienzo del proceso apoptótico), activen caspasas efectoras, adquieran la morfología propia del fenotipo apoptótico (disminución del tamaño celular, condensación de la cromatina, aparición de cuerpos apoptóticos) y fragmenten el ADN (característica del proceso apoptótico en su fase final). Estos hallazgos permiten claramente que se identifique a la apoptosis como el mecanismo

responsable de la inducción de muerte de los monocitos durante la infección por SLEV.

Existen números antecedentes respecto a la muerte por apoptosis causada por Flavivirus. Se ha reportado también que la cepa Parton de SLEV provoca apoptosis en células K562 y Neuro 2a (10). Se conoce que DENV provoca apoptosis en monocitos humanos (11,29) y murinos, en mastocitos (30) y en otras células mononucleares de sangre periférica (CMSP) como CDmo (31). También en otros tipos de células de mamíferos como células del SNC (neuroblastoma humano y de ratones, neuronas corticales y del hipocampo, células cerebrales humanas)(32). Similar al DENV, el WNV induce la muerte celular apoptótica en varios tipos de células, K562, Neuro2a, Vero, A549, etc (33,34). Por su parte el JEV genera apoptosis en células neuronales (N18, NT2)(35), fibroblastos (BHK21)(36), y células Vero(37).

Se comprobó que la apoptosis de los monocitos fue inducida por ambas cepas de SLEV (CbaAr-4005 y 78V-6507) en una etapa tardía de la infección. En la infección por CbaAr-4005 a partir de las 72 hs pi se comenzaron a detectar signos de apoptosis a niveles bajos (12% de células translocaron la PS vs. 2% de los controles y 13% de células tenían caspasa-3 activa vs. 2% de los controles). El aumento importante en la apoptosis se da entre las 72 y 96 hs, ya en el cuarto día pi más 40 % de los monocitos habían translocado la PS vs. 7 % control y más del 60 % de las células presentaban la caspasa efectora -3 activa vs. 4 % de los controles. El grado de apoptosis provocado por la cepa CbaAr-4005 en monocitos es similar a lo previamente reportado con la cepa SLEV Parton, donde SLEV provocó aproximadamente un 50% de apoptosis en células K562 (a las 72 hs pi) y Neuro2a (a las 48 hs pi)(10). En la infección por la cepa endémica 78V-6507 en cambio, se comenzó a detectar apoptosis de manera más tardía, recién a las 96hs pi y a niveles más bajos que con CbaAr-4005, sólo el 17 % de monocitos translocaron la PS vs. 7 % control y el 14 % de las células presentaron caspasa-3 activa vs. 4 % de los controles.

Uno de los hechos que puede explicar la inducción tardía y la diferencia del grado de apoptosis generado por las distintas cepas de SLEV se relaciona con la cinética y la tasa de replicación viral de cada una. Para la infección con CbaAr-4005 se demostró correlación positiva entre el número de copias de ADN viral y el porcentaje de monocitos en apoptosis, aumentando la apoptosis a medida que lo hacía el número de copias virales encontradas en el sobrenadante. Por otro lado con

78V-6507 no hubo correlación entre la carga viral y la apoptosis. En este caso, el virus replica sólo hasta el tercer día, alcanzando niveles de carga viral aproximadamente diez veces menores que CbaAr-4005, lo que explicaría la inducción tardía y en menor grado de la apoptosis por la cepa endémica.

Parquet y col (2002)(10), demostraron que la inducción de apoptosis por la cepa Parton de SLEV dependía de la replicación del virus, ya que si las células se infectaban con el virus inactivado por irradiación UV, no se producía apoptosis. Si bien en esta tesis no se usó virus inactivado, en la infección por SLEV cepa CbaAr-4005 el grado de apoptosis correlacionó con la carga viral, lo que indicaría que los monocitos con alto grado de replicación morirían por apoptosis.

En la infección por DENV también se observa que la apoptosis no puede controlar la replicación del virus, existiendo una correlación positiva entre ambos parámetros y relacionándolos con la virulencia de la cepa (38,39). Algo importante para destacar, es que los diferentes brotes de DENV pueden explicarse en parte por la circulación de cepas con alto grado de replicación viral y de inducción de apoptosis (32). En este sentido se comprobó que la cepa aislada de un caso fatal de DENV (Paraguay 2007; DENV3 / 5532) generó mayor tasa de replicación viral y apoptosis en células CDmo que la provocada por cepas aisladas de casos no fatales (Brasil 2002, DENV3 / 290) (31).

Según los antecedentes expuestos para otros flavivirus, los hallazgos aportados por este trabajo en cuanto a nivel de replicación viral de SLEV y el grado de apoptosis de células de la inmunidad innata, constituyen un aporte que permitirían explicar, en parte, las diferencias de virulencia (23,24) y condiciones epidemiológicas de aislamiento de cada una de las cepas estudiadas. Así, la mayor virulencia de la cepa CbaAr-4005 en modelo murino (23) se pueda explicar por el alto grado de replicación del virus en células de la inmunidad innata y el elevado grado de apoptosis que provoca en estas células, lo que justificaría también que se haya aislado durante un brote de encefalitis (40). Por otro lado la menor virulencia en modelo murino demostrada para 78V-6507 (23) y su aislamiento en condiciones endémicas (41) se podrían justificar, en parte, por la baja tasa de replicación del virus en los monocitos y el bajo nivel de apoptosis provocado en esta célula.

5.2.2 Vías de activación de la apoptosis en monocitos humanos infectados con SLEV.

Identificada la apoptosis como mecanismo de muerte de los monocitos por la infección de SLEV es importante identificar también la vía utilizada por el virus para activar este mecanismo. En primer lugar, la apoptosis inducida por ambas cepas CbaAr-4005 y 78V-6507 de SLEV dependió de la activación de las caspasas, según se comprobó la presencia de caspasa-3 activa en los monocitos. La caspasa-3 es considerada como la principal caspasa ejecutora y su activación es esencial para los cambios morfológicos propios de la apoptosis (condensación de la cromatina, formación de *blebbing* en la membrana plasmática y fragmentación del ADN, entre ellos) (42).

La apoptosis mediada por caspasa-3 fue descrita en la infección con varios flavivirus. En la infección por WNV se demostró la importancia de la apoptosis en la patogénesis de esta infección y se identificó como clave el rol de la caspasa-3, ya que se observó apoptosis vía activación de caspasa-3 en el cerebro de ratones de tipo salvaje. En cambio los ratones caspasa 3^{-/-} eran más resistentes a la infección letal por WNV presentando disminución de la muerte neuronal en corteza, tallo cerebral y el cerebelo (34).

SLEV, al igual que WNV, es neurotrópico y se sabe que infecta neuronas *in vitro* (10) y que causa apoptosis neuronal en modelo murino de infección *in vivo* (13). El hecho de que se haya demostrado, en este trabajo, que la apoptosis depende de caspasa-3 adquiere relevancia en cuanto se podría utilizar como futura diana terapéutica para restringir la lesión neuronal del SNC provocado por este virus.

Por otro lado, se identificó a la vía mitocondrial como responsable en la activación de la caspasa-3. Se demostró que la infección por ambas cepas de SLEV induce pérdida de la polaridad de la membrana mitocondrial. Esto provoca la disrupción de la membrana mitocondrial con el aumento de su permeabilidad y la consiguiente salida de proteínas apoptóticas que activan a caspasa-3. Es interesante destacar la importancia de que se haya identificado la vía mitocondrial dependiente de caspasa implicada en la infección por SLEV, ya que está descrita una vía mitocondrial de inducción de apoptosis independiente de caspasa-3, mediada por el factor inductor de apoptosis (AIF, del inglés *apoptosis inductor factor*) y de la endonucleasa G que hidrolizan del ADN en fragmentos de alto PM (43).

La vía mitocondrial en la inducción de apoptosis por SLEV fue también propuesta por Parquet y col. en 2002 (10) a través de la sobreexpresión de la proteína proapoptótica Bax. Este grupo de investigadores reportó el mismo mecanismo de apoptosis mitocondrial dependiente de Bax en células K562 y Neuro2a en la infección con WNV (33).

Identificada la vía mitocondrial como la responsable de la inducción de apoptosis vía caspasa-3 en la infección por SLEV, la pregunta que surge es ¿qué estímulo es el responsable de la despolarización de la membrana mitocondrial en el contexto de la infección por SLEV? ¿Será alguna proteína viral específica o un factor soluble liberado por la célula infectada?

En el caso de la apoptosis reportada por Parquet y col (2002) (10) se desconoce si el responsable de la sobreexpresión de Bax fue alguna proteína viral específica o un factor intermedio soluble liberado en el contexto de la infección. Para varios flavivirus fueron identificadas proteínas estructurales y no estructurales (NS) como las responsables en la inducción de apoptosis por vía mitocondrial. Por ejemplo en la infección por WNV, en modelos *in vivo* e *in vitro*, se informó que la proteína de la cápside de WNV (WNVCP) por sí misma induce rápida condensación nuclear y muerte celular por apoptosis vía mitocondrial mediante activación de caspasa-9 y caspasa-3 (44). Se ha visto que en presencia de la WNVCP se secuestra al nucléolo un regulador negativo de p53, generando mayor estabilidad del factor de transcripción p53 que comienza a transcribir para la proteína Bax y así se induce la apoptosis en fibroblastos murinos (45). En la infección con DENV se reportó que la producción intracelular de la proteína M activa la apoptosis por vía intrínseca en células Neuro2a y células de hepatoma humano (HepG2)(46). En el mismo estudio se identificó la ApoptoM una secuencia de nueve residuos de aminoácidos (M-32 a -40) compartida por varios flavivirus, como la responsable del efecto citopático ligado a la apoptosis observado en la infección por DENV, WNV y YV (46). Ensayos de infección *in vitro* de células HepG2, Vero y C6 con la cepa vacunal de JEV (JEV-YL) demostraron que la proteína estructural E induce apoptosis en esas células (47). Referido a la participación de las proteínas NS, estudios *in vitro* en células de mamíferos (Neuro2a, HeLa y Vero) demostraron que los dominios helicasa y proteasa de la proteína no estructural NS3 de WNV eran responsables de generar apoptosis vía activación de caspasa-8 y caspasa-3 (48). También esta misma proteína se vinculó con la inducción de apoptosis vía intrínseca

dependiente de caspasa-9 y caspasa-3 en células Vero transfectadas con NS3 de JEV (49).

Por otro lado es importante destacar que también se han involucrados mediadores solubles como responsables de la inducción de apoptosis mitocondrial en la infección por flavivirus. Algunos de ellos son radicales oxidantes producidos durante el proceso de infección, como es el caso de DENV, donde se observó que el aumento de la producción mitocondrial de ROS y RNS media la apoptosis dependiente de caspasa-3 por la vía intrínseca en células endoteliales (50). Se reportó además, que la expresión diferencial de varios genes inducibles por IFN α/β , regulan positivamente caspasa-3 luego de la infección con DENV, provocando la apoptosis de células de endotelio vascular (HUVECs)(51). En la infección por JEV también se observó la participación de especies oxidantes en la apoptosis de células infectadas. Se comprobó que células neuronales (N18) infectadas por virus JEV parcialmente inactivado por UV, presentaban activación de la vía intrínseca, debido a la generación de ROS (52).

Otro mecanismo de inducción de apoptosis mitocondrial recientemente descrito en flavivirus es el mediado por señales activadas desde el retículo endoplásmico (RE). En la infección por WNV se demostró la implicancia del RE y la participación de proteínas UPR (del inglés, *unfolded proteins response*) en la producción de estímulos apoptogénicos (53). Las UPR son un grupo de proteínas antiapoptóticas encargadas de mantener la homeostasis del RE degradando proteínas mal plegadas. Sin embargo, en situaciones de estrés persistente, como el provocado en una infección viral cuando existe replicación intensa, las UPR cambian su accionar suprimiendo la actividad de las proteínas antiapoptóticas e induciendo la expresión de proteínas proapoptóticas como la proteína CHOP (del inglés *C/EBP homologous protein*) (54). Se demostró en la infección por WNV que proteínas UPR en respuesta al estrés inducen mediante la participación de CHOP, la apoptosis mitocondrial de una manera Bax dependiente en células de neuroblastoma humano (SKN-MC) y neuronas primarias del hipocampo de rata (53). El rol del RE en la apoptosis mediada por señales ligadas a UPR también fue descrita para JEV, donde la activación de la proteína CHOP vía participación de proteínas UPR fue esencial para desencadenar la apoptosis en fibroblastos (BHK-21) y células neuronales (N18, NT-2) (36).

Las vías extrínseca e intrínseca de la activación de la apoptosis están estrechamente vinculadas y ambas finalizan en la activación de caspasas efectoras,

como la caspasa-3. Igualmente la vía de los receptores de muerte es exclusiva de la activación extrínseca y ha sido ampliamente reportada en la infección por flavivirus (32). Por ejemplo en DENV se observó la participación de los ligandos de muerte y sus receptores en la apoptosis de varios tipos de células, por ejemplo en CDmo infectadas *in vitro*, se comprobó aumento de los niveles de las citocinas proinflamatorias TNF y Apo2L/TRAIL (31). En este trabajo ensayos con inhibidores de TNF y virus inactivado, demostraron que esta citoquina se relacionaba con el grado de apoptosis de las células y que era necesaria la replicación del virus tanto para la producción de TNF como para la apoptosis de las CDmo (31) .

También se relaciona la inducción de apoptosis por vía extrínseca con la gravedad de la enfermedad ocasionada por el flavivirus. Así, en pacientes infectados con DENV se observó el aumento de CD95 soluble en plasma y del número de CMSP en apoptosis en individuos que progresaron a la forma grave hemorrágica (DH) respecto a los que poseían la forma leve febril (DF)(38). Además se identificó a la proteína NS5 de DENV como inductora de la vía de receptores de muerte, al interaccionar con la proteína de muerte 6 (Daxx), que entre otras funciones interactúa con el receptor de muerte FAS, para activar RANTES (CCL5), una citoquina estrechamente asociada con DH (55).

Referido a los aportes de este trabajo, se demostró que los monocitos infectados por SLEV produjeron la citoquina proapoptótica TNF, siendo significativo el aumento de su concentración en la infección con CbaAr-4005 en los dos últimos días pi, coincidiendo este hecho con la elevada replicación viral y muerte celular por apoptosis. Se halló correlación positiva entre el nivel de monocitos en apoptosis y la concentración del TNF, por lo que se sugiere que la apoptosis evidenciada en esta infección podría también deberse a la activación de los receptores de muerte. En este sentido, se observó un aumento, si bien no significativo, en la expresión del receptor de muerte CD95 en los mismos días que se evidenciaron los elevados niveles de TNF y apoptosis, reforzando la posible participación de los ligandos de muerte y sus receptores en la muerte de estas células.

Con el fin de analizar las posibles consecuencias de la apoptosis de los monocitos en el contexto de la infección de SLEV, se debe recordar que muchos virus utilizan las respuestas de sus células blanco para su propio beneficio y utilizan mecanismos complementarios para la replicación y la infección. En este marco, algunos de los mecanismos del huésped más afectados en una infección viral suelen ser los relacionados con las vías que regulan las señales de muerte y supervivencia

de la célula (54). En ese sentido, se demostró que la infección por SLEV provoca la translocación del fosfolípido PS a la cara externa de la MP de los monocitos. La mayoría de las células eucariotas tienen una distribución asimétrica de fosfolípidos en la bicapa que conforma la MP, donde los fosfolípidos que contienen colina, fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina se mantienen predominantemente en el lado externo de la membrana y los aminofosfolípidos PS y fosfatidiletanolamina (PE) se localizan mayormente en la membrana interna. Fisiológicamente, esta disposición de la PS tiene una función estructural ya que la carga negativa neta de la PS contribuye a la curvatura y fluidez de la membrana y funciones bioquímicas proporcionando sitios de acoplamiento para las proteínas con dominios de policatiónicos (56). Muchas vías bioquímicas críticas requieren la presencia de esta asimetría en la MP que es mantenida activamente por un grupo de transportadores de lípidos dependientes de ATP. Sin embargo, esta distribución de los fosfolípidos puede colapsar bajo una variedad de condiciones fisiológicas y patológicas dando lugar a cambios dramáticos en las propiedades bioquímicas de la membrana (57). La redistribución de PS a la cara externa de la membrana plasmática es un evento temprano en la apoptosis y ha sido ampliamente demostrado en muchos tipos de células murinas y humanas, independientemente del estímulo inicial (58). Esta exposición de la PS sobre la MP tiene importantes implicancias funcionales ya que señala a la célula para ser reconocida y rápidamente fagocitada (59), sin generar inflamación. En este sentido al analizar la cinética en la expresión de PS sobre la superficie de los monocitos durante la infección por SLEV, observamos que la translocación de la PS, evento morfológico de inicio de apoptosis se daba conjuntamente con la pérdida de la viabilidad celular, hecho que se relaciona con la apoptosis tardía de la célula. En ninguno de los días del ensayo de infección se detectó un aumento significativo de los monocitos en apoptosis temprana, pero sí se evidenció una población significativa de monocitos en apoptosis tardía en la infección por CbaAr-4005 durante los dos últimos días de la infección. Por lo tanto podemos afirmar que esta cepa epidémica de SLEV regula la inducción de apoptosis, inhibiéndola en la fase temprana de la infección y estimulándola en la fase tardía.

Otros flavivirus, como JEV y DENV, han mostrado similar comportamiento, en cuanto a generar apoptosis cuando la infección está avanzada. Estos virus parecen desencadenar la apoptosis en una fase bastante tardía de la infección, lo que facilitaría la replicación viral en las células infectadas (35,60,61). Existen

evidencias de que los flavivirus, en una etapa temprana de la infección, pueden bloquear la apoptosis dependiente de caspasas, mediante la activación de la señalización mediada por fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) (62). Se ha identificado a la proteína viral WNVCP como la responsable de inhibir la apoptosis a través esta vía en células de mamíferos (A549, HEK293T, Vero-76, BHK-21) (63), iniciándose así señales de supervivencia mediadas por Bcl-2 a fin de mantener a las células en condiciones favorables para la producción de virus por más tiempo (64). La WNVCP es la primera proteína viral producida en las células infectadas, sin embargo su papel en el ensamblaje del virus no es necesario hasta después de la replicación del ARN genómico por lo tanto desde una perspectiva temporal de la infección es perfectamente adecuada para bloquear la apoptosis de la célula huésped durante la replicación del virus (32). Podría ser esta una estrategia común planteada por los flavivirus para retardar la apoptosis de la célula infectada y favorecer la producción de viriones y así permitir la diseminación de la infección (18).

De esta manera la inducción retardada de la apoptosis que se observa en el modelo experimental de este trabajo de Tesis, podría ser considerada como una estrategia planteada por la cepa CbaAr-4005 de SLEV, para utilizar al monocito en su beneficio. Así en la fase temprana de la infección inhibiría la apoptosis para favorecer la replicación y aumentar la progenie y luego en la fase tardía provocaría la apoptosis de la célula para favorecer la diseminación de los viriones y con ello de la infección. Por lo tanto también se podría considerar a la capacidad de regular la apoptosis manifestada por CbaAr-4005 como factor de virulencia asociado a esta cepa epidémica.

Debido a que los monocitos cumplen una función esencial en la inmunidad antiviral, es importante dilucidar los mecanismos involucrados en la modulación de la apoptosis de estas células por SLEV y la implicancia de la misma en la fisiopatogenia de la infección por este virus. Para ello sería necesario complementar estos hallazgos con estudios en modelos *in vitro* y murinos (*in vivo*).

5.3 Expresión de moléculas de superficie y receptores en monocitos infectados con SLEV.

5.3.1 Moléculas de superficie asociados a diferenciación celular.

La línea celular de linaje monocítico U937 posee un estado de inmadurez estacionario que puede ser inducido a la diferenciación por agentes químicos o biológicos (2). De esta forma, al ser infectadas con SLEV se observaron cambios morfológicos (agrupación celular, adherencia, disminución del tamaño) dependientes de la cepa y el tiempo de exposición al virus, ya que fueron más evidentes en los dos últimos días de la infección con la cepa CbaAr-4005. Estos cambios son similares a los producidos por agentes químicos como PMA, dimetil sulfóxido (DMSO), LPS bacterianos y la 1,25-dihidroxitamina D3 activa (1,25-OH-2D3), utilizados comúnmente para diferenciar a las U937 a monocito/macrófago, proceso que también depende de la concentración del agente y del tiempo de exposición al mismo (3,65).

Por mucho tiempo los monocitos fueron considerados, desde el punto de vista ontogénico, como células de desarrollo intermedio entre sus precursores de MO y los macrófagos tisulares. Actualmente, los resultados experimentales, permiten sostener que son células que poseen funciones específicas durante la inflamación (66). Los monocitos además de fagocitar, digerir y eliminar al virus (mecanismos efectores propios de la inmunidad innata) presentan antígenos virales a los Li Th y Li Tc. De esta manera y bajo la influencia del ambiente de citoquinas generado, colaboran a instaurar la respuesta celular y humoral propia de la inmunidad adaptativa contra el virus (67).

En este trabajo se ha demostrado en células U937 el posible rol que tendrían los monocitos como células blanco para SLEV y su compromiso en la replicación viral relacionando este hecho con la virulencia de la cepa infectante y la inducción de apoptosis. Los monocitos son células de gran plasticidad capaces de adquirir distintas características funcionales influenciadas por el microambiente tisular y el estímulo externo que reciban (68). Por eso adquiere especial relevancia describir el fenotipo de activación de las mismas, ya que su compromiso podría tener consecuencias sobre la virulencia de la cepa y la fisiopatogenia de la infección por SLEV.

Los monocitos de sangre periférica humana que expresan CD14⁺⁺CD16⁻ son considerados clásicos o inflamatorios (M1), en modelo murino se corresponden con los GR1⁺/Ly6C^{high}, que son rápidamente reclutados al sitio de la infección donde se pueden diferenciar a macrófagos o a CDmo (69). Este fenotipo de monocitos produce altas concentraciones de mediadores inflamatorios como TNF, óxido nítrico, ROS y poseen alta capacidad microbicida (5). Otro subgrupo de monocitos, CD14^{dim} CD16⁺ denominados no-clásicos o activados alternativamente (M2) poseen actividad antiinflamatoria, angiogénica y reguladora (70).

Diversos estudios demostraron la participación de los M1 en la inmunopatogénesis de los flavivirus. Durbin y col (2008) (71) caracterizaron el fenotipo de las CMSP de pacientes con infección aguda por DENV, demostrando un aumento de los M1 asociado con la replicación viral y lo relacionaron con la fisiopatología del DH ya que su número era significativamente más elevado en estos pacientes respecto a los que padecían DF. En modelo murino, se involucró a los M1 (GR1⁺/Ly6C^{high}) como los responsables en la encefalitis fatal por WNV, ya que el infiltrado de células de la microglía derivaba de monocitos periféricos inflamatorios que llegaban a SNC vía ligando de quimoquina- 2 (CCL2) (72).

En este trabajo de Tesis se demostró la aparición del fenotipo monocítico M1 luego de la infección con la cepa epidémica SLEV, coincidiendo el máximo porcentaje de células CD14⁺ (próximo al 40%) con la elevada tasa de replicación del virus. Por el contrario, en la infección por la cepa no epidémica 78V-6507, si bien se observó la aparición de monocitos CD14⁺ en la etapa tardía de la infección, el tamaño de la población no fue significativo (15%). Dada las diferencias de replicación y cantidad de células CD14⁺ generadas por estas cepas, se puede hipotetizar que el SLEV replicaría en mayor grado en las células CD14⁺. Esto fue demostrado en CMSP de niños con dengue agudo, en los cuales se observó que las células positivas para prM de DENV eran principalmente monocitos CD14⁺ y mitad de ellas poseían la proteína no estructural NS3 indicando que en esas células el virus estaba replicando. Además en ese trabajo se asoció el aumento de células CD14⁺ con DH ya que estaban aumentadas en niños con esta complicación de la enfermedad (71).

Rivarola (2015) (13) demostró que la mortalidad de ratones infectados con la cepa CbaAr- 4005 fue mayor que con 78V-6507 y que se reducía significativamente al disminuir la carga viral administrada. La relación entre la carga viral y la mortalidad también ha sido observada con WNV. Al comparar la virulencia de cepas europeas

de WNV en función de la replicación *in vitro* en células Neuro2a y la mortalidad en ratones se determinó que la cepa que generó mayor carga viral *in vitro* manifestó neuroinvasividad y mayor grado de mortalidad en ratones (21). Por lo tanto al proponer a los monocitos CD14+ como células donde SLEV replica en mayor magnitud, y al estar relacionada la carga viral con la mortalidad de ratones, podemos inferir que los monocitos CD14+ estarían involucrados en la fisiopatogenia de la enfermedad por SLEV ya que dichas células serían fuente de nuevos viriones.

Se ha demostrado la mayor capacidad de la cepa epidémica CbaAr-4005 para estimular a las células U937 a un fenotipo maduro CD14+ beneficioso para el virus, ya que en este fenotipo celular el virus replicaría en gran medida generando la posibilidad de diseminar la progenie viral. Por el contrario la cepa endémica 78V-6507, carece de este factor de virulencia, generando una baja estimulación en la maduración de los monocitos y con ello limitando la replicación viral y la posibilidad de diseminar la infección.

Un hecho interesante de destacar es la alta apoptosis y mortalidad observada en las células CD14+, donde el 80% de las células provenientes de la infección con CbaAr-4005 translocaron PS y de esta población la mitad eran células muertas. Para ambas cepas se hallaron correlación positiva entre presencia de CD14 y apoptosis y negativa entre CD14 y viabilidad celular. Esto refuerza la hipótesis de la participación de células CD14+, de un fenotipo de mayor madurez, como lugar de alta replicación para la cepa SLEV CbaAr-4005, proceso que induciría la apoptosis de las células CD14+, justificando así estos hallazgos.

Otro aspecto para considerar respecto a la presencia de la molécula CD14 es su posible rol como receptor para SLEV. La importancia de este antígeno de superficie como receptor para DENV fue demostrado por Chen y col (1999) (73) que observaron que los LPS bacterianos producían una marcada supresión en la infección de cultivos primarios de monocitos y macrófagos, al ser agregados previa o conjuntamente con el virus. Estos autores postularon que los LPS bloquearían el ingreso del DENV en estas células a través de su receptor CD14 (73). Al respecto serán necesarios futuros estudios *in vitro* para evaluar la participación de CD14 en el ingreso de SLEV al monocito.

5.3.2 Moléculas y receptores asociados a activación celular

5.3.2.1 Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad

La expresión de la molécula HLA-DR, del grupo de CMH clase II, sobre los monocitos es fundamental para la presentación de antígenos virales y así estimular a los $Li\ Th\ CD4+$ y en consecuencia desencadenar una respuesta inmune adaptativa eficaz contra el virus. Por lo tanto, muchos virus han desarrollado estrategias para evitar la función de los monocitos como CPA, en detrimento de la generación de una adecuada respuesta inmune adaptativa favoreciendo así la diseminación viral en el huésped (18).

Las células U937 expresan constitutivamente la molécula HLA-DR, sin embargo se observó que en los cultivos infectados con CbaAr-4005 aproximadamente la mitad de la población celular poseía una elevada IMF para la marcación de HLA-DR (HLA-DR $++$). La aparición de esta subpoblación de U937 HLA-DR $++$ fue coincidente en el tiempo con la presencia de las células CD14 $+$, alta tasa de replicación viral y de muerte por apoptosis. Por otro lado las células HLA-DR $++$ eran CD14 $-$ y excluían el colorante 7-AAD, por ende eran fenotípicamente más inmaduras y poseían una alta viabilidad (superior al 90%) respecto a la subpoblación U937CD14 $+$ HLA-DR $+$. Esto haría suponer que serían células no infectadas o que soportarían baja tasa de replicación y que el incremento en la expresión de HLA-DR $++$ en estas células sería consecuencia del perfil de citoquinas proinflamatorio producido en el contexto de la infección viral. En la infección con la cepa 78V-6507 no se observó la subpoblación U937 HLA-DR $++$, esto podría ser consecuencia de la presencia de IL-10, citoquina que no favorece la expresión de HLA-DR y cuya producción fue estimulada desde el inicio de la infección por la cepa endémica.

En el caso de la infección por otros flavivirus que infectan y replican en monocitos, se comprobó que DENV, YFV y JEV, alteran el fenotipo de las células y su función como CPA. Por ejemplo, se observó que las CDmo infectadas con DENV disminuyen la expresión de moléculas del CMH I, II y moléculas co-estimuladoras y evidencian deterioro para polarizar la respuesta de $Li\ T\ CD4+$ hacia el perfil Th1, apropiado para eliminar el virus (74). Para JEV se comprobó que el virus inhibe la expresión de marcadores de superficie de maduración y de CMH I en monocitos y

CD, a la vez que induce el deterioro funcional de las CD generando una pobre respuesta de los Li T CD8 + (12). Se ha encontrado además que la infección con el JEV no sólo perjudica la capacidad de las CPA para la activación de células T CD8+, sino que también expande la población de los Li T reguladoras (LiTCD4+Foxp3+), con función inmunosupresora potencial (75). Estos resultados indican que los flavivirus manipulan la función de los monocitos como CPA, disminuyendo la presentación antigénica restringida por CMH, lo que conduce a menor estimulación de Li T, impidiendo la generación efectiva de mecanismos celulares y humorales propios de la inmunidad adaptativa y favoreciendo con ello la diseminación de la infección.

La relevancia de la presencia de la población de células HLA-DR++ en el marco de la infección con la cepa CbaAr-4005 debe ser dilucidada con futuras investigaciones, ya que no se puede afirmar que tengan un comportamiento eficaz como CPA porque no fue evaluada la presencia de moléculas co-estimuladoras fundamentales para el accionar efectivo de una CPA. El aumento de la expresión de HLA-DR sobre las U937 puede responder a la activación de la célula producto de los mediadores biológicos liberados en la infección por la cepa epidémica.

5.3.2.2 Receptores Toll- Like

El sistema inmune innato actúa como la primera línea de defensa para la detección de una infección viral y responde con mecanismos de protección inmediatos. Esto implica el reconocimiento de los PAMP por células, tales como monocitos o macrófagos, CD y células asesinas naturales (NK). Por lo tanto, la primera barrera a superar para la infección viral son las respuestas rápidas de la inmunidad innata del huésped, que incluyen los IFN α/β , citoquinas inflamatorias, las proteínas del complemento, la acción de las células NK, la apoptosis y la autofagia. Estas respuestas están mediadas por la estimulación de receptores de reconocimiento de patógenos (RRP), dentro de los que incluyen los TLR ubicados en las células inmunes.

Los monocitos detectan ARN de simple o doble cadena de flavivirus a través de los RRP, como RIG-I y TLR3/7. Estos receptores activan sus moléculas adaptadoras IPS-1, TRIF, MyD88 respectivamente, que inician la cascada de

señalización (IKK ϵ , TBK1, RIP-1, y IRAK4) que finalmente activan los factores IRF-3, IRF-7, y NF-kappa B, que conducen a la transcripción de los genes de IFN α / β y citoquinas pro-inflamatorias a fin de generar un estado antiviral (18).

Las células U937 no expresan de manera basal TLR-3 ni TLR-2. En la infección de U937 por SLEV se detectó la expresión temprana de TLR-3 en el primer día de la infección, independientemente de la cepa utilizada.

El rol de TLR-3 en las infecciones virales es controversial. Para ciertos virus se ha demostrado que TLR-3 contribuye a su eliminación, mientras que para otros se ha observado que el virus puede beneficiarse de la estimulación de TLR-3 (76). El caso más relevante de la implicancia de la participación de TLR-3 en la infección por un flavivirus, quedó demostrada para WNV, ya que ratones TLR-3 deficientes (TLR3 - / -) fueron más resistentes a la infección letal por WNV, presentando disminución de producción de citoquinas proinflamatorias y mayor carga viral en la periferia. En el cerebro de los TLR-3 deficientes, la carga viral, los signos de inflamación y neuropatología se redujeron en comparación con ratones de tipo salvaje. A partir de este trabajo se considera que la infección por WNV conduce a una respuesta inflamatoria TLR-3 dependiente, que provoca disrupción en la BHE y permite la penetración cerebral del virus y posterior lesión neuronal (77).

El silenciamiento de la expresión de TLR-3 en U937 provocó la disminución de citoquinas inflamatorias en respuesta a la infección por DENV, lo que sugiere que TLR-3 puede ser un componente importante de la respuesta antiviral a DENV (78). Por otro lado en la infección por JEV, los niveles de INF α/β en CD infectadas no se vieron afectados por el silenciamiento de MyD88 y lo más importante no tuvo efecto sobre la susceptibilidad a JEV *in vivo* (12). Este hecho sugiere que serían varios los TLRs involucrados en la infección viral.

En el contexto de la infección por ambas cepas de SLEV durante las primeras horas pi el porcentaje de células que expresaron TLR-3 fue similar al porcentaje de células infectadas, lo que sugiere pensar que el virus induciría la expresión de este receptor. Es de tener en cuenta que los virus han evolucionado a fin de modular la señal vía TLR-3. Diferentes virus, hepatitis C, influenza A, respiratorio sincitial (79), de la inmunodeficiencia de simios (80) y VIH (81), aumentan la expresión de TLR-3. Dado que la regulación positiva de TLR-3 sensibiliza a las células a la exposición viral o dsRNA posterior, esto contribuiría a una mayor respuesta inflamatoria, que si el huésped no puede modular adecuadamente, genera lesión y daño histológico. En este sentido el hecho de que no se exprese TLR-3 en los días posteriores de la

infección con SLEV (CbaAr-4005 y 78V-6507) plantea la posibilidad de un mecanismo de *down*-regulación. Se podría tratar de un mecanismo regulador de la célula inmune, ya que al disminuir el número de moléculas TLR-3, menor será la posibilidad de interactuar con el ARNsc viral y por lo tanto caería la producción de citoquinas inflamatorias reduciendo el riesgo de lesión en el huésped. Por otro lado, se podría deber a un mecanismo desplegado por SLEV para evadir la respuesta inmune innata generando la *down*-regulación en la expresión de TLR-3 evitando así la producción de mediadores antivirales. Al respecto se demostró que las cepas virulentas de WNV retrasan la activación de RRP, dando una ventaja para la replicación del virus dentro de las células durante las primeras etapas de la infección (82).

Existe controversia en cuanto a cuáles serían los mecanismos utilizados por los flavivirus para evadir la detección por los RRP. Hay trabajos que indican que la proteína NS1 de WNV inhibe la activación transcripcional, inducida por TLR-3, de IFN α/β e IL-6 a través del fracaso de la translocación nuclear de NF- κ B y IRF3 en células HeLa (83). También que la forma soluble de NS1 (NS1s) inhibe la señalización vía TLR-3 (84).

Respecto a la expresión de TLR-2, se observó que el aumento en su expresión en la etapa tardía de la infección con la cepa epidémica CbaAr-4005 coincidió con la aparición de las células de fenotipo maduro e inflamatorio CD14+ y la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF e IL-6, con lo que se puede relacionar la presencia de este TLR como marcador de activación celular. En este sentido, el estudio *in vivo* e *in vitro* del perfil de activación de los monocitos con DENV, mostró que la infección con este virus gatilla la expresión de TLR2/4 y la secreción de citoquinas proinflamatorias que eventualmente conducirían a las manifestaciones del DH (85).

En suma, múltiples TLR han sido implicados en el inicio de la respuesta antiviral como también algunos han sido involucrados en la fisiopatogenia de la infección por flavivirus; sin embargo, las vías de señalización involucradas y los mecanismos que plantea el virus para evadirlas dependen del virus en cuestión. Se necesitarán múltiples estudios con SLEV a fin de caracterizar la participación de los distintos TLR y su relación con la evolución de la infección.

5.4 Producción de Inmunomoduladores por monocitos infectados por SLEV

En este trabajo se demostró que la infección por SLEV estimuló a monocitos humanos a secretar citoquinas como IL-6, IL-10 y TNF. El perfil de citoquinas y la cinética en la producción dependió de la cepa infectante y el tiempo de la infección. Se observó que la cepa CbaAr-4005, de mayor virulencia y considerada epidémica, generó un perfil proinflamatorio, dados los elevados niveles de producción de TNF e IL-6. Las células U937 no producen TNF e IL-6 de manera basal. La producción de estas citoquinas por U937 se logra sólo mediante estímulo de diferenciación provocados por PMA o factor estimulante de colonias de granulocítica- macrófaga (GM-CSF, del inglés *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (86) .

Se observó que la mayor producción de TNF inducida por la cepa SLEV CbaAr-4005 coincidió con altos niveles de infección, replicación y apoptosis. Ha sido reportado que monocitos aislados de CMSP de individuos sanos infectados *in vitro* por DENV son fuente de TNF, hecho que se relaciona con la replicación viral ya que no se produce cuando se infecta con virus inactivado (87). Un estudio más reciente reportó que la replicación de DENV en CDmo correlacionó positivamente con la producción de TNF y la apoptosis y que se necesitan varios ciclos de replicación viral para gatillar su secreción (31).

Se conoce que el TNF es un inductor de apoptosis (88). El aumento de TNF en el contexto de la infección de monocitos humanos por SLEV, podría generar una señal autócrina o parácrina para inducir apoptosis de estas células y de esa manera interferir en el ciclo de vida del SLEV. Se sabe que ciertos flavivirus pueden modular la apoptosis mediada por TNF a fin de favorecer su replicación. Así para lograr alta replicación viral en macrófagos, células hepáticas y CD, el DENV inhibe la apoptosis bloqueando la vía del factor NF- κ B en respuesta de TNF (74).

Tanto TNF como IL-6 puede interferir con el ciclo de vida del virus y / o iniciar un proceso inflamatorio en el transcurso de la infección (74). En varias infecciones causadas por flavivirus se demostró que las citoquinas inflamatorias son producidas por monocitos e intervienen en la fisiopatología y la evolución de la enfermedad (31). Se sabe que elevados niveles de TNF inducen expresión de moléculas de adhesión y apoptosis de las células endoteliales, favoreciendo la diapédesis, extravasación de células inmunes y la fuga vascular asociada al DH (89). Se demostró que DENV induce la producción de TNF e IL-6 en U937 diferenciadas a macrófagos y que el sobrenadante de este cultivo provoca la disrupción de las uniones de células

epiteliales (90). Numerosos trabajos pretenden identificar biomarcadores que definan los factores de riesgo para el desarrollo de formas graves de dengue. Tal es el caso descrito en un modelo murino de DH, donde la carga viral, los altos niveles de TNF e infiltrado de macrófagos en los tejidos locales se correlacionaban con la apoptosis de células endoteliales y la hemorragia (91). La evaluación de CMSP de niños con DENV mostraron que los que desarrollaron DH presentaban niveles de apoptosis superiores respecto a los que padecían DF, sugiriendo que la severidad de la infección se correlacionaba con la apoptosis de células de la inmunidad innata. En este trabajo también se demostró que uno de los factores involucrados en la apoptosis de las CMSP eran los niveles elevados de TNF (39). Por otro lado hay autores que observaron asociación entre niveles plasmáticos elevados de IL-6 y receptores solubles de TNF (sTNFR1, sTNFR2) con formas severas de dengue, pero no con el aumento de TNF- α e IL-17(92).

En los flavivirus neurotrópicos también se evaluó el rol de TNF en la encefalitis, que es la manifestación clínica severa de la infección. En la infección por WNV la capacidad de neuroinvasividad del virus estaría relacionada con una alta viremia y niveles elevados de citoquinas inflamatorias, donde TNF intervendría en la disrupción de la BHE posibilitando el ingreso del virus a SNC (93).

La IL-6 es una citoquina fundamentalmente secretada por monocitos/macrófagos, aunque también por Li T, B, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, etc. Participa en la inmunidad innata mediando la producción de proteínas de fase aguda y en la adquirida, estimulando a los Li B a diferenciarse en células plasmáticas productoras de anticuerpos (94). En el modelo experimental de este trabajo se observó la producción de IL-6 desde el primer día pi, aumentado su concentración conforme aumentaron los días pi. Se sabe que IL-6 estimula la diferenciación celular, por lo que se puede sugerir que los cambios fenotípicos observados (pérdida de la homogeneidad morfológica, granularidad citoplasmática, adhesión y agrupación celular) conjuntamente con la aparición del marcador de monocitos maduros CD14 estuvieron mediados por IL-6, ya que coincidieron con su mayor producción. Por otro lado la cepa 78V-6507 generó la producción de IL-6 en concentraciones menores y de manera más tardía en la infección. El hecho que se produzca IL-6 en los tres últimos días de la infección experimental y a baja concentración podría justificar el menor número de células CD14+ halladas durante la infección con dicha cepa.

La IL-6 potencia los efectos citotóxicos del TNF aumentando los receptores para TNF (86). Se podría sugerir entonces que la maduración y activación de los monocitos junto con la elevada apoptosis generada en la infección por CbaAr-4005, estarían mediadas en parte por una acción sinérgica entre ambas citoquinas, hecho que se refuerza por la correlación positiva encontrada entre la apoptosis, expresión de CD14+ y la concentración de estas citoquinas. Resultados de estudios relacionando los valores de IL-6 y TNF en plasma de pacientes con DF y DH y en cultivo de monocitos humanos infectados *in vitro* sugieren que ambas citoquinas están involucradas en el desarrollo del DH y que los monocitos podrían ser la principal fuente de producción de ellas (95).

La mayoría de los estudios realizados en flavivirus relacionan la elevada producción de citoquinas proinflamatorias asociadas con un rol deletéreo para el huésped. En este trabajo se comprobó que la infección por la cepa epidémica CbaAr-4005 induce la maduración de monocitos humanos hacia un fenotipo funcional M1 dado por perfil de citoquinas proinflamatorias cuyo rol en la infección *in vivo* tendrá que ser estudiado. Sin embargo la morbilidad y/o mortalidad que produjo la infección con la cepa CbaAr-4005 en modelo murino (13,23) podrían ser resultados de dichos hallazgos.

Respecto a la producción de inmunorreguladores negativos de la respuesta inflamatoria, en este modelo de infección viral, la producción de IL-10 también fue dependiente de la cepa y el tiempo pi. La infección con la cepa 78V-6507 indujo la producción temprana de esta citoquina antiinflamatoria, mientras que CbaAr-4005 lo hizo aumentando su concentración en los días finales de la infección.

La IL-10 es una citoquina inmunorreguladora importante con múltiples efectos biológicos en diferentes tipos de células que en humanos es producida por linfocitos T reguladores, monocitos y células B (94). En la patogénesis de la infección con DENV, su función inmunosupresora está asociada a resistencia al IFN tipo I, lo que genera una disminución en la depuración del virus y persistencia de la infección (96). También se encontró una asociación entre niveles altos de IL-10 en plasma y dengue hemorrágico en niños (11,97). Estudios *in vitro* con monocitos infectados por DENV determinaron una correlación positiva entre concentración de IL-10, TNF y apoptosis (11), sugiriendo un rol inmunorregulador de la IL-10 en tanto su pico de producción fue posterior al nivel máximo de producción de TNF. Otros autores encontraron correlación entre el aumento de IL-10 y shock hemodinámico por dengue (29).

Según estos antecedentes, se puede inferir que la producción tardía de IL-10 en la infección por CbaAr-4005 podría ser inducida cuando existen altos niveles de TNF, como un mecanismo compensatorio del monocito a fin de regular el proceso inflamatorio. Además se debe considerar que IL-10 induce apoptosis de monocitos vía CD95 y que los monocitos en apoptosis espontánea *in vitro* producen IL-10 (98). En la infección por WNV se le asigna un rol negativo a la IL-10 ya que su aumento post-infección en modelos *in vivo* e *in vitro* se asocia con alto grado de infección, en tanto ratones deficientes de IL-10 (IL-10^{-/-}) muestran una mejor supervivencia (99).

En la infección por CbaAr-4005 existió correlación positiva entre la carga viral, las concentraciones de TNF e IL-10 con la apoptosis de los monocitos, por lo que se podría deducir que el virus al infectar a los monocitos induce la producción de estas citoquinas que estarían involucradas en la apoptosis por vía extrínseca de la célula. La existencia de correlación positiva entre la IL-10 y carga viral permite que se sugiera que esta citoquina podría ser la responsable de los altos niveles de replicación viral de la cepa epidémica. En cambio en la infección por 78V-6507, la producción temprana de IL-10 posiblemente moduló la respuesta inflamatoria del monocito y la menor producción de TNF hecho que estaría ligado a la menor apoptosis de los monocitos. Por otro lado, como se mencionó en párrafos anteriores, si bien está documentado que los valores altos de IL-10 se relacionan con baja depuración viral y mayor replicación, esto no fue lo hallado en la infección con 78V-6507. Se podría sugerir, en cambio, que la IL-10 sería un factor protector para los monocitos en la infección por la cepa 78V-6507, ya que se asocia a un mayor número de células viables, que podrían ejercer una acción microbicida más eficiente y con ello regular la replicación controlando así la diseminación viral. En ratones estos hallazgos se verían reflejados por la menor morbi-mortalidad que produce 78V-6507 en modelo murino (13,23)

Como se ha destacado los mediadores biológicos liberados por los monocitos pueden ejercer tanto una acción protectora como patológica, dependiendo del tipo de citoquina, la concentración y el tiempo de producción de estas moléculas efectoras. Por lo tanto serán necesarios estudios adicionales con SLEV a fin de profundizar y definir el rol biológico de las diferentes citoquinas (además de las estudiadas aquí) producidas frente a distintas cepas de este virus e identificar las vías de activación y señalización involucradas en su producción. La importancia de ello radica en la posibilidad de generar estrategias terapéuticas para

aquellos pacientes que posean marcadores biológicos asociados a riesgo de encefalitis.

5.5 Bibliografia

1. Harris P, Ralph P. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leukoc Biol.* 1985;37:407–22.
2. Baek Y-S, Haas S, Hackstein H, Bein G, Hernandez-Santana M, Lehrach H, et al. Identification of novel transcriptional regulators involved in macrophage differentiation and activation in U937 cells. *BMC Immunol.* 2009;10:18.
3. Sintiprungrat K, Singhto N, Sinchaikul S, Chen S-T, Thongboonkerd V. Alterations in cellular proteome and secretome upon differentiation from monocyte to macrophage by treatment with phorbol myristate acetate: insights into biological processes. *J Proteomics.* 2010;73(3):602–18.
4. Ashhurst TM, Vreden C Van, Munoz-erazo L, Niewold P, Watabe K, Terry RL, et al. Antiviral macrophage responses in flavivirus encephalitis. *Indian J Med Res.* 2013;138:632–47.
5. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Ley K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science.* 2010;327(5966):656–61.
6. Klomporn P, Panyasrivanit M, Wikan N, Smith DR. Dengue infection of monocytic cells activates ER stress pathways, but apoptosis is induced through both extrinsic and intrinsic pathways. *Virology.* 2011;409(2):189–97.
7. Puerta-Guardo H, Mosso C, Medina F, Liprandi F, Ludert JE, del Angel RM. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in U937 cells requires cholesterol-rich membrane microdomains. *J Gen Virol.* 2010;91(2):394–403.
8. Chan JF-W, Yip CC-Y, Tsang JO-L, Tee K-M, Cai J-P, Chik KK-H, et al. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. *Emerg Microbes Infect* 2016;5(8):1-12.
9. Barros VED, Ferreira BR, Livonesi M, Figueiredo LTM. Cytokine and nitric oxide production by mouse macrophages infected with Brazilian flaviviruses.

- Rev Inst Med trop S Paulo. 2009;51(3):141–7.
10. Parquet MC, Kumatori A, Hasebe F, Mathenge EGM, Morita K. St. Louis encephalitis virus induced pathology in cultured cells. *Arch Virol*. 2002;147(6):1105–19.
 11. Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Reis SRI, Miranda AS, Gandini M, Barbosa LS, et al. Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(8):1091–9.
 12. Aleyas AG, George J a, Han YW, Rahman MM, Kim SJ, Han SB, et al. Functional modulation of dendritic cells and macrophages by Japanese encephalitis virus through MyD88 adaptor molecule-dependent and - independent pathways. *J Immunol*. 2009;183(4):2462–74.
 13. Rivarola ME. Procesos Patogénicos e Inmunológicos en la Infección con Virus Encefalitis San Luis (VESL) en modelo murino. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba; 2015.
 14. Samuel MA, Diamond MS. Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *J Virol*. 2006;80(19):9349–60.
 15. Bai F, Kong K-F, Dai J, Qian F, Zhang L, Brown CR, et al. A paradoxical role for neutrophils in the pathogenesis of West Nile virus. *J Infect Dis*. 2010 Dec 15;202(12):1804–12.
 16. Vogel P, Kell WM, Fritz DL, Parker MD, Schoepp RJ. Early events in the pathogenesis of eastern equine encephalitis virus in mice. *Am J Pathol* 2005;166(1):159–71.
 17. Wang Y, Lobigs M, Lee E, Müllbacher A. CD8+ T cells mediate recovery and immunopathology in West Nile virus encephalitis. *J Virol*. 2003;77(24):13323–34.
 18. Ye J, Zhu B, Fu ZF, Chen H, Cao S. Immune evasion strategies of flaviviruses. *Vaccine*. 2013;31(3):461–71.
 19. Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. Infection of human cells by

- dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol*. 2000;74(17):7814–23.
20. Lindenbach BD, Rice CM. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 2007th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2007. p. 1101–51.
 21. Lim SM, Koraka P, van Boheemen S, Roose JM, Jaarsma D, van de Vijver DAMC, et al. Characterization of the Mouse Neuroinvasiveness of Selected European Strains of West Nile Virus. *PLoS One*. 2013;8(9):1–14.
 22. Nathanson N, Cole GA. Fatal Japanese encephalitis virus infection in immunosuppressed spider monkeys. *Clin Exp Immunol*. 1970;6(1):161–6.
 23. Rivarola ME, Tauro LB, Llinás GA, Contigiani MS. Virulence variation among epidemic and non-epidemic strains of Saint Louis encephalitis virus circulating in Argentina. *Memórias do Inst Oswaldo Cruz*. 2014 Apr;109(2):197–201.
 24. Diaz LA, Nemeth NM, Bowen RA, Almiron WR, Contigiani MS. Comparison of Argentinean Saint Louis encephalitis virus non-epidemic and epidemic strain infections in an avian model. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(5):1–7.
 25. Ahantarig A, Růžek D, Vancová M, Janowitz A, Šťátná H, Tesařová M, et al. Tick-borne encephalitis virus infection of cultured mouse macrophages. *Intervirology*. 2009;52(5):283–90.
 26. Donadieu E, Bahuon C, Lowenski S, Zientara S, Couplier M, Lecollinet S. Differential virulence and pathogenesis of West Nile viruses. *Viruses*. 2013 Nov 22;5(11):2856–80.
 27. Chaturvedi UC, Nagar R, Shrivastava R. Macrophage & dengue virus: Friend or foe? *Indian J Med Res*. 2006;124(1):23–40.
 28. Mackenzie JM, Khromykh AA, Parton RG. Cholesterol Manipulation by West Nile Virus Perturbs the Cellular Immune Response. *Cell Host Microbe*. 2007;2(4):229–39.
 29. Chanhakan S, Butthep P, Yoksan S, Tangnaratchakit K, Chuansumrit A. Vascular leakage in dengue hemorrhagic fever is associated with dengue infected monocytes, monocyte activation/exhaustion, and cytokines production.

- Int J Vasc Med. 2015;2015: 1-9.
30. Brown MG, Huang YY, Marshall JS, King CA, Hoskin DW, Anderson R. Dramatic caspase-dependent apoptosis in antibody-enhanced dengue virus infection of human mast cells. *J Leukoc Biol.* 2009;85(1):71–80.
 31. Silveira GF, Meyer F, Delfraro A, Mosimann ALP, Coluchi N, Vasquez C, et al. Dengue virus type 3 isolated from a fatal case with visceral complications induces enhanced proinflammatory responses and apoptosis of human dendritic cells. *J Virol.* 2011;85(11):5374–83.
 32. Ghosh Roy S, Sadigh B, Datan E, Lockshin R a, Zakeri Z. Regulation of cell survival and death during Flavivirus infections. *World J Biol Chem.* 2014;5(2):93–105.
 33. Parquet M del C, Kumatori A, Hasebe F, Morita K, Igarashi A. West Nile virus-induced bax-dependent apoptosis. *FEBS Lett.* 2001;500(1–2):17–24.
 34. Samuel M a, Morrey JD, Diamond MS. Caspase 3-dependent cell death of neurons contributes to the pathogenesis of West Nile virus encephalitis. *J Virol.* 2007;81(6):2614–23.
 35. Liao CL, Lin YL, Wang JJ, Huang YL, Yeh CT, Ma SH, et al. Effect of enforced expression of human bcl-2 on Japanese encephalitis virus-induced apoptosis in cultured cells. *J Virol.* 1997;71(8):5963–71.
 36. Su H-L, Liao C-L, Lin Y-L. Japanese Encephalitis Virus Infection Initiates Endoplasmic Reticulum Stress and an Unfolded Protein Response. *J Virol.* 2002;76(9):4162–71.
 37. Yanga T-C, Shiua S-L, Chuanga P-H, Linb Y-J, Wanb L, Lanc Y-C, et al. Japanese encephalitis virus NS2B-NS3 protease induces caspase 3 activation and mitochondria-mediated apoptosis in human medulloblastoma cells. *Virus Res.* 2008;143(1):77–85.
 38. Myint KS, Endy TP, Mongkolsirichaikul D, Manomuth C, Kalayanarooj S, Vaughn DW, et al. Cellular immune activation in children with acute dengue virus infections is modulated by apoptosis. *J Infect Dis.* 2006;194(5):600–7.
 39. Jaiyen Y, Masrinoul P, Kalayanarooj S, Pulmanusahakul R, Ubol S.

- Characteristics of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cell death that correlates with the severity of illness. *Microbiol Immunol.* 2009;53(8):442–50.
40. Diaz LA, Ré V, Almirón WR, Fariás A, Vázquez A, Sanchez-Seco MP, et al. Genotype III Saint Louis encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(11):1752–4.
 41. Mitchell C, Darsie RJ, Monath T, Sabattini M, Daffner J. The use of an animal-baited net trap for collecting mosquitoes during western equine encephalitis investigations in Argentina. *J Am Mosq Control Assoc.* 1985;1:43–7.
 42. Wu H, Che X, Zheng Q, Wu A, Pan K, Shao A, et al. Caspases: A molecular switch node in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Int J Biol Sci.* 2014;10(9):1072–83.
 43. Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y, Xue D. Mechanisms of AIF-Mediated Apoptotic DNA Degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 2002;298(5598):1587–92.
 44. Yang JS, Ramanathan MP, Muthumani K, Choo AY, Jin SH, Yu QC, et al. Induction of inflammation by West Nile Virus capsid through the caspase-9 apoptotic pathway. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(12):1379–84.
 45. Yang MR, Lee SR, Oh W, Lee EW, Yeh JY, Nah JJ, et al. West Nile virus capsid protein induces p53-mediated apoptosis via the sequestration of HDM2 to the nucleolus. *Cell Microbiol.* 2008;10(1):165–76.
 46. Catteau A, Kalinina O, Wagner MC, Deubel V, Courageo MP, Desprès P. Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. *J Gen Virol.* 2003;84(10):2781–93.
 47. Chen S, Chang T, Stone G, Chen C, Liu J. Programmed Cell Death Induced by Japanese Encephalitis Virus YL Vaccine Strain or Its Recombinant Envelope Protein in Varied Cultured Cells. *Intervirology.* 2006;49(Octubre):346–351.
 48. Ramanathan MP, Chambers JA, Pankhong P, Chattergoon M, Attatippaholkun W, Dang K, et al. Host cell killing by the West Nile Virus NS2B-NS3 proteolytic complex: NS3 alone is sufficient to recruit caspase-8-based apoptotic pathway.

- Virology. 2006;345(1):56–72.
49. Yiang GT, Chen YH, Chou PL, Chang WJ, Wei CW, Yu YL. The NS3 protease and helicase domains of Japanese encephalitis virus trigger cell death via caspase-dependent and -independent pathways. *Mol Med Rep.* 2013;7(3):826–30.
 50. Chen C-LL, Lin C-FF, Wan S-WW, Wei L-SS, Chen M-CC, Yeh T-MM, et al. Anti-Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Antibodies Cause NO-Mediated Endothelial Cell Apoptosis via Ceramide-Regulated Glycogen Synthase Kinase-3 beta and NF-kappa B Activation. *J Immunol.* 2013;191(4):1744–52.
 51. Long X, Li Y, Qi Y, Xu J, Wang Z, Zhang X, et al. XAF1 contributes to dengue virus-induced apoptosis in vascular endothelial cells. *FASEB J.* 2013;27(3):1062–73.
 52. Lin RJ, Liao CL, Lin YL. Replication-incompetent virions of Japanese encephalitis virus trigger neuronal cell death by oxidative stress in a culture system. *J Gen Virol.* 2004;85(2):521–33.
 53. Medigeschi GR, Lancaster AM, Hirsch AJ, Briese T, Lipkin WI, Defilippis V, et al. West Nile virus infection activates the unfolded protein response, leading to CHOP induction and apoptosis. *J Virol.* 2007;81(20):10849–60.
 54. Iranpour M, Moghadam AR, Yazdi M, Ande SR, Alizadeh J, Wiechec E, et al. Apoptosis, autophagy and unfolded protein response pathways in Arbovirus replication and pathogenesis. *Expert Rev Mol Med.* 2016;18(e1):1-21.
 55. Netsawanga J, Panaamponb U, Khunchaib S, Kooptiwutd S, Nagilab A, Puttikhunte C, et al. Dengue virus disrupts Daxx and NF-κB interaction to induce CD137-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;450(4):1485–1491.
 56. Leventis PA, Grinstein S. The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. *Annu Rev Biophys Vol 39.* 2010;39:407–27.
 57. Birge RB, Boeltz S, Kumar S, Carlson J, Wanderley J, Calianese D, et al. Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death Differ* 2016;23(6):1–17.

58. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon a J, Rader J a, van Schie RC, LaFace DM, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 1995;182(November):1545–56.
59. Schroit AJ, Madsen JW, Tanaka Y. In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes. *J Biol Chem.* 1985;260(8):5131–8.
60. Jan JT, Chen BH, Ma SH, Liu CI, Tsai HP, Wu HC, et al. Potential dengue virus-triggered apoptotic pathway in human neuroblastoma cells: arachidonic acid, superoxide anion, and NF-kappaB are sequentially involved. *J Virol.* 2000;74(18):8680–91.
61. Umareddy I, Pluquet O, Wang QY, Vasudevan SG, Chevet E, Gu F. Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Virology.* 2007;4(91):1-10.
62. Lee C, Liao C, Lin Y. Flavivirus Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling To Block Caspase-Dependent Apoptotic Cell Death at the Early Stage of Virus Infection Flavivirus Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling To Block Caspase-Dependent Apoptotic Cell Death. *J Virol.* 2005;79(3):8388–99.
63. Urbanowski MD, Hobman TC. The West Nile virus capsid protein blocks apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *J Virol.* 2013;87(2):872–81.
64. Liu Y, Liu H, Zou J, Zhang B, Yuan Z. Dengue virus subgenomic RNA induces apoptosis through the Bcl-2-mediated PI3k/Akt signaling pathway. *Virology.* 2014;448:15–25.
65. Zamani F, Shahneh FZ, Aghebati-Maleki L, Baradaran B. Induction of CD14 expression and differentiation to monocytes or mature macrophages in promyelocytic cell lines: New approach. *Adv Pharm Bull.* 2013;3(2):329–32.
66. Auffray C, Fogg DK, Narni-Mancinelli E, Senechal B, Trouillet C, Saederup N, et al. CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and

- the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med*. 2009;206(3):595–606.
67. Pichlmair A, Reis e Sousa C. Innate recognition of viruses. *Immunity*. 2007 Sep 21;27(3):370–83.
 68. Mantovani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol*. 2007;37(1):14–6.
 69. Kleer I De, Willems F, Lambrecht B, Goriely S. Ontogeny of myeloid cells. *Front Immunol*. 2014;5:1–11.
 70. Sang Y, Miller LC, Blecha F. Journal of Clinical & Cellular Macrophage Polarization in Virus-Host Interactions. *J Clin Cell Immunol*. 2015;6(2):1–11.
 71. Durbin AP, Vargas MJ, Wanionek K, Hammond SN, Gordon A, Rocha C, et al. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology*. 2008;376(2):429–35.
 72. Getts DR, Terry RL, Getts MT, Müller M, Rana S, Shrestha B, et al. Ly6c+ “inflammatory monocytes” are microglial precursors recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis. *J Exp Med*. 2008;205(10):2319–37.
 73. Chen YC, Wang SY, King CC. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol*. 1999;73(4):2650–7.
 74. Palmer DR, Sun P, Celluzzi C, Pang S, Sun W, Marovich M a, et al. Differential Effects of Dengue Virus on Infected and Bystander Dendritic Cells. *J Virol*. 2005;79(4):2432–9.
 75. Cao S, Li Y, Ye J, Yang X, Chen L, Liu X, et al. Japanese encephalitis Virus wild strain infection suppresses dendritic cells maturation and function, and causes the expansion of regulatory T cells. *Viol J* 2011;8(1):39.
 76. Vercammen E, Staal J, Beyaert R. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(1):13–25.
 77. Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-like

- receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med.* 2004;10(12):1366–73.
78. Tsai YT, Chang SY, Lee CN, Kao CL. Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. *Cell Microbiol.* 2009;11(4):604–15.
 79. Groskreutz DJ, Monick MM, Powers LS, Yarovinsky TO, Look DC, Hunninghake GW. Respiratory Syncytial Virus Induces TLR3 Protein and Protein Kinase R, Leading to Increased Double-Stranded RNA Responsiveness in Airway Epithelial Cells. *J Immunol.* 2006;176(3):1733–40.
 80. Sanghavi SK, Reinhart T a. Increased expression of TLR3 in lymph nodes during simian immunodeficiency virus infection: implications for inflammation and immunodeficiency. *J Immunol.* 2005;175(8):5314–23.
 81. Bhargavan B, Woollard SM, Kanmogne GD. Toll-like receptor-3 mediates HIV-1 transactivation via NFκB and JNK pathways and histone acetylation, but prolonged activation suppresses Tat and HIV-1 replication. *Cell Signal.* 2016;28(2):7–22.
 82. Fredericksen BL, Gale M. West Nile Virus Evades Activation of Interferon Regulatory Factor 3 through RIG-I-Dependent and -Independent Pathways without Antagonizing Host Defense Signaling. 2006;80(6):2913–23.
 83. Wilson JR, Sessions PF De, Leon MA, Scholle F. West Nile Virus Nonstructural Protein 1 Inhibits TLR3 Signal Transduction. 2008;82(17):8262–71.
 84. Crook KR, Miller-Kittrell M, Morrison CR and FS. Modulation of innate immune signaling by the secreted form of the West Nile virus NS1 glycoprotein. *Virology.* 2014;(0):172–182.
 85. Azeredo EL, Neves-Souza PC, Alvarenga AR, Reis SRNI, Torrentes-Carvalho A, Zagne SMO, et al. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology.* 2010;130(2):202–16.
 86. Cairns JA, Guy GR, Tan YH. Interleukin-6 regulates the cytotoxic effect of tumour necrosis factor on U937 cells. *Immunology [Internet].* 1992;75(4):669–

- 73.
87. Espina LM, Valero NJ, Hernández JM, Mosquera JA. Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor- α caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68(1):48–53.
88. Karin M, Lin A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nature Immunol* 2002;3(3):221–7.
89. Cardier JE, Mariño E, Romano E, Taylor P, Liprandi F, Bosch N, et al. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: Possible role of TNF- α in endothelial cell damage in dengue. *Cytokine.* 2005;30(6):359–65.
90. Puerta-Guardo H, Raya-sandino A, González-mariscal L, Rosales VH, Ayala-dávila J. The Cytokine Response of U937-Derived Macrophages Infected through Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Disrupts Cell Apical-Junction Complexes and Increases Vascular Permeability. *J Virol.* 2013;87(13):7486–501.
91. Chen H, Hofman FM, Kung JT, Lin Y, Wu-hsieh BA. Both Virus and Tumor Necrosis Factor Alpha Are Critical for Endothelium Damage in a Mouse Model of Dengue. *J Trop Med.* 2007;81(11):5518–26.
92. Arias J, Valero N, Mosquera J, Montiel M, Reyes E. Increased expression of cytokines , soluble cytokine receptors , soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. *Virology.* 2014;452–453:42–51.
93. Winkelmann ER, Luo H, Wang T. West Nile Virus Infection in the Central Nervous System. *F1000Faculty Rev.* 2016;5(0):1–10.
94. Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(S2):S53–72.
95. Levy A, Valero N, Espina LM, Añez G, Arias J, Mosquera J. Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010;104(1):16–23.

96. Tsai T, Chuang Y, Lin Y, Wan S, Chen C, Lin C. An emerging role for the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in dengue virus infection. *J Biomed Sci. Journal of Biomedical Science*; 2013;20(40):1-9.
97. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Elevated Plasma Interleukin-10 Levels in Acute Dengue Correlate With Disease Severity. *J Med Virol.* 1999;59(April):329–34.
98. Bzowska M, Guzik K, Barczyk K, Ernst M, Flad D, Pryjma J. Increased IL-10 production during spontaneous apoptosis of monocytes. *Eur J Immunol.* 2011;32:2011–20.
99. Bai F, Town T, Qian F, Wang P, Kamanaka M, Tarah M, et al. IL-10 Signaling Blockade Controls Murine West Nile Virus Infection. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):1–13.

6. CONCLUSIONES

La virulencia es un proceso adaptativo y surge como el resultado de la conjunción de varios factores relacionados con el virus (transmisibilidad, patogenicidad, etc) y el potencial de recuperación del hospedador. En varios modelos se ha demostrado que los cambios en la virulencia están asociados con variaciones de diferentes aspectos de la biología en la interacción virus-huésped, lo que sugiere que la virulencia de una cepa viral puede verse afectada por un número potencialmente grande de factores. De allí la importancia de los hallazgos de este estudio, relacionados con la evaluación de la interacción entre SLEV y una célula de la inmunidad innata, el monocito, que a su vez es clave en el desarrollo de la respuesta adaptativa. Este trabajo de tesis ha permitido realizar los siguientes aportes al conocimiento:

- Se ha demostrado la susceptibilidad de células de linaje monocítico a la infección y replicación por dos cepas de SLEV: CbaAr4005 y 78V6507.
- Como consecuencia de la infección y replicación viral estas células adquieren un fenotipo maduro y activado, que es distinto según la cepa infectante.
- Se han identificado distintos factores de virulencia asociados a la cepa epidémica CbaAr-4005 que posibilitan que el virus escape al mecanismo microbicida de una célula inmune y la utilice para su propio beneficio. Se observó también que los monocitos maduros inducidos por la infección soportarían la mayor replicación viral y producirían citoquinas. En este sentido, se demostró correlación positiva entre carga viral, cantidad de células de fenotipo maduro, concentración de citoquinas pro-inflamatorias (TNF, IL-6) y anti-inflamatoria (IL-10) y alto nivel de apoptosis. Por lo tanto, se puede sugerir que SLEV CbaAr-4005 al replicar induce la maduración de la célula hacia un fenotipo inflamatorio M1 que no logra limitar la infección y promueve la muerte tardía de la célula huésped por un mecanismo apoptótico mediado por caspasa-3 inducida por vía intrínseca y posiblemente por extrínseca
- En la infección por SLEV 78V-6507, el monocito se activa hacia un fenotipo regulador M2 inducido por los altos niveles de IL-10 presentes

en la infección temprana, que modula la activación de esta célula y con ello regula la replicación viral y limita la infección, la producción citoquinas pro-inflamatorias y la muerte celular apoptosis.

- Las diferencias halladas en la interacción entre las cepas estudiadas de SLEV y el monocito, podrían justificar, en parte, el comportamiento epidemiológico de estas cepas y las diferencias de virulencia en modelo murino y aviario.

La interacción de los virus y células del linaje mieloide es compleja. Esta interacción es probablemente responsable, al menos en parte, de las diferencias cruciales entre la depuración viral y la patología. La identificación del monocito como célula susceptible a la infección por SLEV genera un amplio espectro para el desarrollo de futuras investigaciones (*in vivo e in vitro*) a fin de dilucidar los mecanismos que participan en la generación de la respuesta antiviral y las estrategias de evasión empleadas por el virus para evadirla.

Los hallazgos expuestos adquieren gran relevancia máxime cuando con SLEV no existen antecedentes que describan la interacción del virus con los monocitos.