

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

Maestría en Ciencias de la Salud
Área de concentración en Enfermedades Infecciosas

Tesis para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Salud con área de concentración en Enfermedades Infecciosas.

“Efectos de la inhibición de los adaptadores MyD88 o Trif de los TLR sobre el tipo de citocinas producidas por CPA durante en la infección *in vitro* por el RSV”

Alumno:

Med. Cir. Andreu Comas García.

Director de tesis:

Dr. José Moreno Rodríguez (INSP).

Asesor interno:

Dr. José Ramos Castañeda (INSP).

Asesor externo:

Dr. Pedro A. Piedra (Baylor College of Medicine).

“La verdadera ciencia enseña, sobre todo, a dudar y a ser ignorante”.

Miguel de Unamuno

Primero agradezco a mi familia, particularmente a mis padres, hermano y abuelos, por que sin su ejemplo, comprensión, apoyo, críticas y cariño, esto jamás hubiera sido posible. Por ustedes soy una persona correcta y con ambiciones adecuadas. Ustedes le dan sentido a mis fracasos y la magnitud correcta a mis triunfos. Gracias por ser mi modelo a seguir.

Daniel, te agradezco por que haberme enseñado este camino y vocación. Tu siempre has sido el mejor ejemplo de ética, sencillez y rectitud que alguien puede tener. Gracias por ser mi mentor, con eterna admiración y espero pronto estar a tu nivel.

La primera impresión nunca se olvida, y contigo Pepe, eso fue lo que pasó. Tus críticas me hicieron querer trabajar contigo y ser tu alumno. No solo te considero un gran jefe, un mentor excelente y un maestro sin igual, te considero un verdadero amigo. Gracias por la confianza y el apoyo, pero apenas empieza lo bueno.

Dr. José Moreno “Doc Moreno”, gracias por escuchar mis ideas, pero sobre todo, gracias por animarse a apostar en este proyecto. A su lado aprendí mucho, desde cocinar hasta ciencia, pero sobre todo aprendí a ser crítico con lo que leo, digo y hago. Hoy deja de ser mi director de tesis pero comienza ser un muy buen amigo.

A mis amigos y compañeros: Yvonne, Ruth, Edna, Sol, Karla, Gloria y Jorge, con ustedes los momentos más difíciles parecen ser más sencillos. Gracias por estar ahí y su apoyo, por ponerme los pies en la tierra y por su comprensión.

A mi jurado por haber aceptado, por sus críticas y por su juicio. Con admiración y respeto tomo todo sus comentarios y consejos, gracias.

Pero el agradecimiento más especial es para ti, Lucía. Tu eres mi inspiración y mi motor, todo lo que he hecho, lo que hago y lo que haré esta dedicado a ti. Gracias por aguantar las semanas de lejanía, los momentos de estrés, mal humor y cansancio. Siempre has sido un apoyo enorme, un bastón, una excelente amiga, amante, novia y mi enamorada. Gracias a ti por todo y más por lo que falta.

ÍNDICE.

Introducción.....	4
Antecedentes.....	5
Epidemiología.....	5
Manifestaciones clínicas y factores de riesgo para enfermedad grave.....	6
Descripción viral.....	8
Receptores de la inmunidad innata contra el RSV.....	11
Inicio y diferenciación fenotípica de la respuesta inmune adquirida.....	13
Inmunoregulación del RSV.....	16
Inmunopatología asociada al RSV.....	18
Justificación.....	21
Pregunta de investigación.....	21
Hipótesis.....	21
Objetivo principal.....	22
Objetivos específicos.....	22
Limitaciones.....	22
Materiales y métodos	23
Resultados	26
Discusión	36
Conclusiones	39
Bibliografía	40

INTRODUCCIÓN.

El virus sincicial respiratorio (RSV) es un virus altamente contagioso que puede infectar en múltiples ocasiones a un individuo a lo largo de la vida. Este es el agente etiológico más importante de infecciones agudas del tracto respiratorio superior e inferior en personas menores de 5 años y mayores de 65 años edad. Durante la infancia, las reinfecciones por el RSV son frecuentes, y la respuesta inmune predominante hacia este virus es del tipo Th2.

La inmunidad innata es de gran importancia, tanto en la resistencia como en la fisiopatología de la infección por el RSV, siendo las células presentadoras de antígenos (CPA) las que participan en la respuesta inicial, con la intervención predominantemente de los receptores tipo Toll (TLR), expresados por ellas, los cuales intervienen en la detección y en la respuesta inicial contra la infección por el RSV. La transducción de señales por dichos receptores es a través de dos vías que utilizan, alternativamente, las moléculas adaptadoras MyD88 y Trif.

Como se mencionó, la infección por RSV induce una respuesta predominantemente tipo Th2, la cual se asocia a afección de las vías aéreas que se presenta frecuentemente como broncoespasmo, que es más frecuente en la primoinfección que de las reinfecciones. A la fecha, se desconoce el mecanismo por el cual la interacción entre CPA y el RSV resulta preferentemente en una respuesta tipo Th2. Dado que la maduración de CPA y su capacidad de inducir preferentemente respuestas por subpoblaciones Th1/Th2/Th17 de linfocitos T depende de su activación inicial a través de los TLR, es posible que en los individuos que desarrollan complicaciones por una respuesta de tipo Th2, el RSV active predominantemente MyD88 o Trif y el papel individual de cada uno de estos adaptadores en el desarrollo de respuestas Th1, Th2 o Th17 es desconocido.

ANTECEDENTES.

-Epidemiología.

El RSV fue aislado y descrito por primera vez en chimpancés con infección del tracto respiratorio superior en el laboratorio del Dr. Robert M. Chanock. Posteriormente se identificó que este virus como el principal agente etiológico de infección del tracto respiratorio bajo (bronquiolitis, neumonía y laringotraqueítis) en niños < 5 años. Para los 2 años de edad casi el 100% de los niños han sido infectados, de los cuales, el 1-10% desarrollan una infección respiratoria grave. El pico de incidencia de infección por RSV ocurre entre los 2 y 6 meses de edad. El RSV también es un patógeno relevante en ancianos, en receptores de trasplantes de médula ósea, en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y en asmáticos [1-5].

Los niños que padecen una infección grave por el RSV tienen morbi-mortalidad elevadas y frecuentemente requieren hospitalización, lo que tiene un impacto importante en los costos directos e indirectos. Se calcula que el costo anual directo asociado a la infección por el RSV en EEUU es mayor de \$300,000,000.00 USD. El CDC calcula un promedio de 17,358 defunciones asociadas al RSV cada año. La Organización Mundial de la Salud estima que cada año a nivel global este virus causa 64 millones de infecciones con 160,000 muertes atribuibles. Aparentemente, el 47% de los niños que fueron infectados en el primer año de vida se re-infectan en el segundo año de vida, para el tercer año de vida el porcentaje de reinfección es del 45%. El RSV es el agente causa entre el 43% y el 96% de todos los casos de bronquiolitis [6, 7].

En México se cuenta con poca información sobre la epidemiología de este virus. En estudios previos hemos estimado la duración de los brotes epidémicos anuales por RSV en San Luis Potosí, su duración mínima fue de 14 semanas y la máxima de 24 semanas. Durante este periodo en estudio (2003-2009) calculamos una mortalidad asociada a este patógeno de 4.36% vs 3.74% de la influenza. Dentro la mortalidad únicamente por causas respiratorias y cardiovasculares, al RSV se le atribuyeron el 7.71% de las muertes vs el 6.05% de la influenza. Analizando estos datos por grupo de edad, la mayor tasa de mortalidad ocurre en personas >60 años (183.55 muertes/100,000 años persona), seguidas de menores de 4 años (15.9 muertes/100,000 años persona), en tercer lugar está el grupo de 20-59 años (3.97 muertes/100,000 años persona) y al grupo de 5-19 años no se le atribuyeron muertes [5].

Entre el 1 de Abril de 2009 y el 30 de Marzo de 2010 en San Luis Potosí estudiamos 657 pacientes hospitalizados por infección del tracto respiratorio inferior. En este estudio se detectó influenza pandémica A/H1N1/2009, influenza estacional/no subtipificable y RSV. El 26.9% de los pacientes hospitalizados fueron positivos para influenza pandémica A/H1N1/2009, 21.3% para RSV y 0.6% para influenza estacional/no subtipificable. En el caso del RSV, los principales grupos de edad en los cuales se detectó este patógeno fue en <5 años y >60 años. En el caso de Influenza pandémica A/H1N1/2009 el principal grupo afectado fue el de 20-59 años, seguido de >60 años y 5-20 años y por último 0-5 años [8].

En regiones de clima templado, las epidemias anuales se presentan entre invierno y primavera. Sin embargo la duración y estacionalidad de las epidemias dependen de las características geográficas y climatológicas de cada región, como son la altitud sobre el nivel del mar, latitud, humedad, temperatura y horas diarias de exposición al sol y luz UV entre otras. El humano es el único hospedero natural del RSV [7, 9].

-Manifestaciones clínicas y factores de riesgo para enfermedad grave.

El RSV se ha relacionado con el desarrollo o exacerbación de hiperreactividad de la vía aérea durante la infancia o adolescencia. Se considera que este virus predispone al desarrollo ulterior de enfermedades como el asma o hiperreactividad de la vía aérea, además de ser responsable de crisis respiratorias agudas en pacientes asmáticos o con enfermedad pulmonar crónica. En individuos con susceptibilidad genética a desarrollar asma o hiperreactividad bronquial (ser atópico o tener antecedentes heredofamiliares de atopia), haber padecido enfermedad grave antes del primer año de vida y/o reinfecciones frecuentes por RSV durante la infancia, predisponer al desarrollo de estas patologías respiratorias. Se ha estimado que el 15% de los niños hospitalizados por infección por RSV desarrollarán episodios subsecuentes de broncoespasmo, los cuales pueden persistir hasta los 11 años de edad [10-13].

Algunas de las consecuencias fisiopatológicas de la infección por RSV son la reducción del diámetro de las vías aéreas inferiores, broncoespasmo y sobreproducción de moco, lo cual lleva a oclusión de la vía aérea e hipoxia. Se ha propuesto que la inmunidad adaptativa contra RSV es de corta duración o ineficiente. Por el otro lado la morbilidad respiratoria resultante de esta infección es aparentemente de largo plazo, con reinfecciones frecuentes a lo largo de la vida y mayor el riesgo de desarrollar asma [1, 3, 7]

La infección por el RSV genera extravasación de líquido al espacio aéreo de los pulmones, lo cual se debe a un aumento de la permeabilidad de la membrana celular y alteraciones en la estructura celular. Este fenómeno podría explicarse, en parte por la interacción de la proteína F viral con el TLR4, lo cual disminuye el transporte celular de sodio y la depuración de líquido alveolar. Mientras que la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y alteración en el rearrreglo del citoesqueleto puede ser explicada mediante la vía de señalización dependiente de MAPK (p58 y la HSP27) [14].

Los factores de riesgo más importantes para desarrollar enfermedad grave por RSV son la existencia de cardiopatía congénita, enfermedad pulmonar crónica, la edad al momento de sufrir la primoinfección (<6 meses de edad), antecedente de prematuridad, inmunosupresión (especialmente en postrasplantados de médula ósea o inmunodeficiencias) [15-18].

La inoculación viral ocurre por el contacto de partículas en aerosol o secreciones nasofaríngeas con el epitelio del tracto respiratorio superior y/o con la conjuntiva ocular. La replicación viral ocurre en la nasofaringe, pero al avanzar la infección, se disemina al tracto respiratorio inferior. El periodo de incubación es de 4 a 5 días y los síntomas más frecuentes son rinorrea, tos y fiebre, aunque algunos pacientes pueden presentar signos de infección moderada del tracto respiratorio inferior. La progresión de esta infección hacia el tracto respiratorio inferior puede presentarse como bronquiolitis o neumonía, generalmente con tos, broncoespasmo e insuficiencia respiratoria [7, 19].

Habitualmente, la infección se restringe a las células superficiales del epitelio respiratorio, incluyendo células ciliadas de los bronquiolos pequeños, neumocitos alveolares tipo I, así como células dendríticas (DC) intraepiteliales. Las características histopatológicas más relevantes de la infección por RSV son: necrosis epitelial, proliferación del epitelio broncoalveolar (ocasional), infiltrados de monocitos y linfocitos T en arteriolas pulmonares y bronquiales, así como infiltrados perivasculares de neutrófilos y eosinófilos en las vías respiratorias pequeñas. Las lesiones tisulares generalmente ocurren en forma de parches y con menor frecuencia son difusas. La obstrucción de las vías aéreas se debe a la descamación de células epiteliales, aumento en la secreción de moco y acumulación de células inmunes en ellas. A pesar de que la formación de sincicios es una de las características en la patología celular causada por este agente, por la cual recibe su nombre, ésta no es frecuente en estudios anatomopatológicos de niños con bronquiolitis o neumonía por RSV [7].

-Descripción viral.

Taxonómicamente el RSV se clasifica en el orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae*, género *Pneumovirus*. Los dos únicos miembros de la subfamilia *Pneumovirinae* que se sabe que afectan al tracto respiratorio del humano son el RSV y el metapneumovirus humano (hMPV). Otros virus del mismo género son el virus sincicial respiratorio bovino (BRSV) y el virus de la neumonía del ratón (PVM), pero no afectan al humano [7, 20, 21].

El RSV es un virus envuelto, con genoma de RNA de cadena sencilla (ssRNA) no segmentado y en sentido negativo. Su tamaño es de aproximadamente 15.2 kb y está conformado por 10 genes, que codifican 11 proteínas estructurales y no estructurales. Proteínas no estructurales: *NS1* y *NS2*. Proteínas estructurales: nucleoproteína (*N*), fosfoproteína (*P*), proteína de matriz (*M*), proteína pequeña hidrofóbica (*SH*), proteína de adhesión (*G*), proteína de fusión (*F*), proteína de matriz 2 (*M2*) (la cual tiene dos marcos abiertos de lectura). De estas, las proteínas transmembranales son: *G*, *F* y *SH*. La holonucleocápside está físicamente asociada al genoma viral y esta formada por las proteínas *M2-1*, *M2-2*, *P*, *N* y *L*. Finalmente, la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) esta codificada en el gene *L*. La tabla 1 resume las principales características estructurales y funcionales del RSV [2, 7, 20-23].

Tabla 1. Características estructurales y funcionales del RSV

Gen	Proteína	Función	referencia
<i>NS1</i>	NS1	NS1 bloquea síntesis y función de INF-I, gen en región promotora 3', prescindible para la replicación viral. Bloquean activación IRF3, Jak/STAT2, disminuye fosforilación STAT1 y STAT2, degrada STAT2 por ubiquitinación, disminución expresión del gen STAT2.	[7, 14, 20, 21, 23-26]
<i>NS2</i>	NS2	NS2 bloquea síntesis y función de INF-I, gen en región promotora 3', prescindible para la replicación viral. Bloquean activación IRF3, Jak/STAT2, disminuye fosforilación STAT1 y STAT2, disminución expresión del gen STAT2, bloquea RIG-I.	[7, 14, 20, 21, 23-26]
<i>N</i>	<i>N</i>	Proteína decamérica anular que se une con el genoma y antígeno viral, reduce la probabilidad de que el RNA viral se reconocido por RIG-I y TLRs endosomales. Durante la síntesis del RNA viral, su extremo N-terminal interactúa con la RdRp y su extremo C-terminal con la fosfoproteína.	[7, 20, 21]
<i>P</i>	<i>P</i>	Homoetrámero que interactúa con las proteínas <i>N</i> y <i>M2-1</i> , funciona como cofactor esencial para la síntesis de RNA. Al interactuar con la proteína <i>N</i> la polimerasa accede al genoma viral. Permite que las proteínas <i>N</i> y <i>L</i> se encuentren solubles para el ensamblaje viral.	[7, 20, 21]
<i>M</i>	<i>M</i>	Proteína monomérica asociada membrana plasmática y la RNP, es relevante durante el proceso de salida del virus, silencia la síntesis de RNA durante el empaquetamiento. Está involucrada en la morfología del virión.	[21]

Tabla 1. Características estructurales y funcionales del RSV

Gen	Proteína	Función	referencia
M2	M2-1	Homotetrámero con motivo de dedo de zinc, la cual se une a la proteína P y al RNA viral, factor para la procesividad transcripcional, potencia la lectura en las uniones entre los genes virales para sí poder generar el antígenoma.	[7, 20, 21]
	M2-2	Regulación entre la síntesis para la transcripción y replicación del RNA viral.	[7, 20, 21]
SH	SH	Contiene dos inicios de la traducción y sitios variables N-glicosilación. Posee actividad porina y de canal catiónico, se inserta en las células infectadas. Inhibe apoptosis temprana.	[2, 7, 20]
F	F	Proteína de fusión de envoltura viral con la membrana celular, formación de sincicios con células vecinas. Sintetizada como F ₀ , requiere doble escisión para su función. Cuenta con dos son regiones repetidas de siete aminoácidos que contienen únicamente dos secuencias (HRA y HRB) que forman 6HB. Se une a TLR 2/6, 4, SP-A y nucleolina. Tiene forma secretada y transmembranal (región C-terminal). Genera anticuerpos neutralizantes.	[7, 21, 49, 50]
G	G	Proteína de adhesión con gran variabilidad antigénica, produce anticuerpos neutralizantes. Existen dos formas de la proteína (mG y sG), sG induce eosinofilia y producción de IL-5, IL-13, IgE, histamina, disminuye INF-II. Se une a SP-D, glicosaminoglicanos y CX3CR1. Región GCRR es análoga a CX3CL1, inhibe la activación del TLR2, 4, y 9. Región transmembranal N-terminal.	[2, 7, 20, 21]
L	L	Su gen es del de mayor tamaño, codificada para la polimerasa viral (RdRp) dependiente de RNA, realiza el “capping” y poliadenilación del RNA, como templado utiliza al complejo RNA-NP. La encapsulación del genoma por la polimerasa y las proteínas N y P es una característica de los <i>Mononegavirales</i> , previene la degradación del RNA y minimiza la posibilidad de detección por receptores como RIG-I y por la PKR.	[7, 20, 21]

El RSV tiene un único serotipo que se divide en dos subgrupos antigénicos, RSV-A y RSV-B. De las dos proteínas transmembranales del virus, la más divergente entre ambos subgrupos virales, es la proteína G, con un 53% de homología en sus secuencias de aminoácidos y una similitud antigénica del 1% al 7% entre RSV-A y RSV-B. Las diferencias antigénicas de la proteína G se deben a la alta variabilidad de sus dominios tipo mucina. Se calcula que la divergencia entre el RSV-A y RSV-B ocurrió hace aproximadamente 350 años. La proteína viral F es mucho menos divergente que la proteína G, con una homología del 90% entre el RSV-A y RSV-B y una similitud antigénica del 50%. Los anticuerpos contra la proteína G viral son menos eficientes que los anticuerpos contra la proteína F tanto para neutralización como para protección antigénica [[7].

Cabe recalcar la función de las proteínas NS1 y NS2, las cuales bloquean la síntesis y/o función del IFN-I (α , β y ω). En la célula del hospedero, esta vía es regulada por tres factores de transcripción: IRF3, NF- κ B y AP-1 (ATF-2/c-Jun). Dentro del genoma viral, estos genes son los más proximales a la región promotora, lo que asegura una alta tasa de transcripción y, consecuentemente, una alta

expresión proteínica. Las proteínas no estructurales no son indispensables para la replicación viral [7, 20, 21].

Las proteínas NS1 y NS2 bloquean la activación de IRF3 y de Jak1/STAT2. La infección de células epiteliales por RSV disminuye la expresión de STAT2 fosforilado. La disminución de la fosforilación de esta proteína (aparentemente también disminuye la expresión de STAT2) permite la replicación del RSV y el establecimiento de una infección viral productiva. NS2 es el principal antagonista de IFN-I. En estudios *in vitro* se ha demostrado que el RSV disminuye la fosforilación de STAT1 y STAT2 de la vía del IFN-I, sin afectar STAT1 de la vía del IFN-II (IFN γ) [24]. Otro mecanismo que bloquea la producción de IFN-I, es la unión de NS2 con RIG-I. La proteína NS1 actúa como ligasa E3 de ubiquitina, cuyo blanco es STAT2, que así es degradada por el proteasoma. Ambas proteínas (especialmente NS1) disminuyen TRAF3. A diferencia del RSV, el hMPV no cuenta con las proteínas NS1 y NS2. En estudios comparativos experimentales entre estos dos agentes, se ha encontrado que el hMPV no interfiere con la producción de IFN-I, mientras que el RSV sí lo hace. En BRSV también se ha descrito que NS1 y NS2 inhiben la activación de IRF-3 y disminuyen la expresión de IFN-I. También se ha descrito que el RSV inhibe la inducción de IFN-III (IFN λ o IL-28, 29, 30) en células epiteliales y macrófagos humanos, aunque estos IFN utilizan un receptor diferente, su señalización depende de STAT1 y STAT2 [14, 21, 23-26].

Al unirse a sus receptores celulares (glucosaminoglicanos, nucleolina, TLR 2/6, TLR4 y CX3CR1), el RSV induce adhesión y fusión de la envoltura viral con la membrana celular, después de lo cual el virus ingresa a la célula en vesículas recubiertas por clatrina. La endocitosis en estas vesículas es otra diferencia entre el RSV y los demás paramyxovirus. Después de la entrada de la nucleocápside al citoplasma, la polimerasa viral inicia el proceso de transcripción y replicación. La transcripción del mRNA viral ocurre en dirección 3'-5' y se inicia desde un promotor único en el extremo 3'. La transcripción genera varios segmentos subgenómicos de mRNA mediante un mecanismo de inicio-paro-reinicio. La replicación del RNA viral incluye la síntesis de un genoma intermediario de sentido positivo, el cual es copiado para la generación del genoma de la progenie viral [7, 14].

El nivel de expresión de las proteínas virales está relacionado con la abundancia de su mRNA y los niveles de éste son inversamente proporcionales a la distancia entre el gen transcrito y la secuencia promotora. El mRNA viral es detectable desde las 4 h post-infección (p.i.), alcanzando su pico de producción entre 12 y 20 h p.i.. Tanto la expresión como la replicación de los genes virales ocurren en el citoplasma. Los viriones son ensamblados en la membrana plasmática, donde se encuentra localizada la nucleocápside. Los viriones maduros se agrupan en la superficie apical de la célula,

dichos grupos tienen estructuras filamentosas asociadas a caveolina-1, que se extienden a lo largo de la membrana plasmática [7, 14].

-Receptores de la inmunidad innata contra el RSV.

Las RNA-helicases citoplásmicas y los TLR son los principales mecanismos de reconocimiento de virus de RNA por el sistema inmune innato. Las RNA-helicases citoplásmicas más estudiadas son RIG-I (*gen 1 inducible por ácido retinoico*) y MDA5 (*gen 5 asociado a diferenciación de melanoma*). Ambas proteínas reconocen el RNA viral mediante sus dominios de helicasa y esta interacción cataliza la exposición de los dominios CARD, los que inician la señalización antiviral, y reclutan y activan caspasas. Tanto RIG-I como MDA5 utilizan moléculas adaptadoras llamadas MAVS, IPS-1, Cardif o VISA, todas las cuales se localizan en la membrana mitocondrial y activan las vías de IRF3 y NF- κ B. Existe una tercera RNA-helicasa, Igp2, homóloga con las dos anteriores, pero sin dominio CARD, esta helicasa funciona como regulador dominante negativo de RIG-I y MDA5. RIG-I parece ser la única de estas tres RNA-helicases, que reconoce al RSV [27, 28], lo que sugiere que Igp2 no tiene efectos dominantes negativos en la infección por este virus.

Otro mecanismo de reconocimiento de RSV es a través de los TLR, los cuales estimulan la respuesta inmune innata a través de dos vías, de las cuales una lleva a la producción de IFN-I. Los TLR pertenecen a la familia de los PRR (receptores de reconocimiento de patrones moleculares) y sus ligandos se conocen como PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos). Independientemente de sus dominios extracelulares, que reconocen distintos PAMP, los TLR tienen dominios citoplásmicos denominados TIR (*toll/interleukin-1 receptor*), los cuales son activados tras la unión ligando-TLR en el medio extracelular (o en endosomas para algunos TLR). Los dominios TIR son responsables de la señalización por todos los TLR. Estos se asocian con dominios TIR en moléculas adaptadoras, que son: MyD88 (TLR5, 7, 8, 9, 11), TIRAP (TLR4, 2/1, 2/6), Trif (TLR3), TRAM (TLR4). En el caso de TLR4, TIRAP y TRAM funcionan como puentes para unir MyD88 y Trif, respectivamente. En el caso de los TLR2/1 y 2/6 utiliza como puente con MyD88 a TIRAP. Los TLR que activan MyD88 llevan a la activación y traslocación al núcleo de los factores de transcripción de la familia NF- κ B p65, y las vías inflamatorias dependientes de ésta, mientras que Trif activa IRF3 y 7, lo que activa la transcripción de IFN-I [27-29].

A diferencia de otros TLR que son expresados en la superficie celular, TLR3, 7, 8 y 9 residen en endosomas, donde obtienen acceso a los ácidos nucleicos, de bacterias o de virus que fueron desnudados a su entrada o aquellos que se encuentran en proceso de ensamblaje durante su

exocitosis. El TLR7 originalmente mostró que mediaba la respuesta antiviral inducida por compuestos de imidazoquinolina, pero ahora se sabe que tanto este TLR como el TLR8 reconocen ssRNA (como el del RSV) y activan la respuesta inmune innata. La respuesta dependiente de TLR7 y, muy probablemente, de TLR8, requieren de la fusión o desnudamiento viral y la acidificación del endosoma. Por su parte, TLR9 es primariamente activado por DNA con motivos CpG hipometilados, comunes en bacterias, aunque se ha sugerido que podría ser también activado por ssRNA [27-29].

La proteína intermediaria MyD88 (vía MyD88 dependiente) es un adaptador, que al ser reclutado por sus TLR (todos, excepto TLR3) interactúa directa o indirectamente con su dominio TIR, lo que permite la interacción y activación de los miembros de la familia IRAK (*IL-1R associated kinase*), IRAK4 e IRAK1, que a su vez activan a TRAF6 (*TNF receptor-associated factor*). Esto lleva a la activación de NF- κ B mediante la vía del complejo de cinasas α - β - γ de I κ B (IKK), el cual, fosforilado, fosforila e induce la disociación del inhibidor de NF- κ B (I κ B α), que constitutivamente se encuentra unido al complejo NF- κ B p65/p50/I κ B α . Este último, fosforilado y disociado, es ubiquitinado y degradado por el proteasoma 26s, dejando a NF- κ B (p65/p50) libre para ser traslocado al núcleo, donde activa la transcripción de diversos genes relacionados con el proceso inflamatorio. Además, MyD88 también lleva a la activación del factor de transcripción AP1, por mecanismos aún no completamente entendidos. Así, la vía de estimulación de los TLR a través de MyD88 culmina con la síntesis de citocinas diversas, como son IL-1 β , IL-6, IL-12p40 y TNF. Estas señales reclutan eficientemente células inmunes al sitio de la infección y activan células diversas, incluyendo a las CPA. Los TLR implicados en la respuesta a RSV son: TLR2/6, TLR3, TLR4, TLR7 y TLR8, los cuales interactúan con diferentes componentes del virus [15, 27-31].

Por otra parte, la cascada de señales de la vía MyD88 independiente (vía Trif dependiente), es activada únicamente por TLR3 y TLR4 e implica el reclutamiento de Trif, ya sea directa (TLR3) o indirecta, a través de TRAM (TLR4), todo a través de interacciones entre dominios TIR. Trif recluta y activa a los adaptadores RIP1 y TBK1, lo cual lleva a dos eventos, que son: activación de IRF3, que forma dímeros con IRF7, y son traslocados al núcleo, donde inducen la transcripción de los genes de IFN-I; además de activar también NF- κ B, en una fase tardía. De todos los TLR, sólo TLR4 es capaz de activar las vías MyD88 y Trif dependientes, mientras que TLR3 es el único que no señala mediante MyD88 [15, 28-30, 32, 33].

Los efectos de la infección viral en las células del hospedero se pueden clasificar como directos, cuando hay destrucción celular como resultado de la replicación viral; o indirectos, cuando la

respuesta contra el virus es la causa de la enfermedad. En relación a lo anterior, se ha sugerido que los TLR pueden jugar tres papeles diferentes en la relación infección viral y enfermedad: 1) no participar, o que este sea éste sea limitado, 2) jugar un papel importante en la protección, ó 3) exacerbar las manifestaciones clínicas. Estos receptores pueden modular (aumentar o disminuir) la magnitud de la respuesta inflamatoria inducida por virus, así como la activación de la inmunidad adaptativa virus específica [27].

Los ligandos exógenos mejor reconocidos y estudiados para el TLR4 son los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas y la proteína F del RSV. El TLR4 cuenta con dos moléculas pivote para la interacción con sus ligandos, MD-2 y CD14. Para la unión de los LPS al TLR, estos deben unirse a la proteína de unión a LPS (LBP), de donde el LPS es transferido a CD14 y después a MD-2, lo que genera la homodimerización del TLR4, seguida de la señalización celular. La formación de este complejo (TLR-4/MD-2/CD14) es indispensable para la activación de esta vía [28, 29, 31-33].

-Inicio y diferenciación fenotípica de la respuesta inmune adaptativa.

Las CPA, además de iniciar la respuesta inmune adaptativa, modulan el fenotipo de la respuesta de las células T. Este inicio de la respuesta inmune adaptativa ocurre cuando un PAMP se une a un PRR (TLR, RLR, CLR), con lo cual se activan las CPA, con lo que se liberan mediadores, como citocinas, quimiocinas, proteínas de estrés y lípidos derivados de la muerte celular, en la zona de infección. Una CPA que reconoció a un patógeno y expresa en su MHC un péptido derivado de este, madura y migra hacia los órganos linfoides, con lo que se generará una respuesta antígeno específica al presentar dicho péptido al receptor de células T (TCR) [28, 34].

Cuando el TCR de linfocitos T CD4⁺ vírgenes (Th0) reconoce específicamente un péptido presentado por las MHC-II en una CPA, estos linfocitos son activados y se pueden diferenciar hacia varios fenotipos efectores. Dependiendo de las citocinas producidas por las células T CD4⁺ activadas, se han clasificado en: Th1, Th2, Th17 y T reguladoras (Treg o Th3). La diferenciación de las Th0, es un evento dependiente del contacto con la CPA, aunque hay que tomar en cuenta algunos aspectos relevantes como son: 1) la naturaleza y afinidad del antígeno, 2) el tipo de señalización del TCR, 3) la naturaleza de la señal del correceptor, y 4) las citocinas del ambiente. La diferenciación fenotípica de una célula Th0 lleva a la producción de citocinas particulares de cada fenotipo, la adquisición de un compromiso hacia dicho perfil, la supresión en la producción de citocinas opuestas al fenotipo expresado y por último, la estabilización y potenciación del fenotipo

efector. La tabla 2 muestra las principales características de cada fenotipo efector de células T CD4⁺, mientras que en la tabla 3 se resumen las principales características de las citocinas características de cada tipo de respuesta de células T CD4⁺ [34, 35].

Tabla 2. Características de los fenotipos efectores de las células T CD4 ⁺ [34, 35].					
Fenotipo	Moléculas inductoras	Citocinas efectoras	Factores de transcripción	Genes activados	Blanco de acción
Th1	IL-12, IL-18, IFN-I, IFN- γ , DLL1,4, ICAM-1, LFA-1.	IL-12 e IFN- γ	STAT1, STAT3, STAT 4, T-bet	<i>infg, Tbx21, Tbet, il12b2, Runx3</i>	Patógenos intracelulares, especialmente en macrófagos. Células neoplásicas
Th2	IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, Jagged 1,2, ICOS.	IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13	STAT6, Gata-3, c-MAF	<i>il5, ill3, il4, gata-3</i>	Aumenta producción de anticuerpos. Parásitos. Respuesta alérgica.
Th17	IL-6, IL-21, TGF- β	IL-17, IL-17F, IL-6, IL-22, TNF- α	STAT3, ROR γ t	<i>RORγt</i>	Inflamación tisular, activación de neutrófilos (epitelio intestinal y pulmón). Bacteria extracelulares.
Treg	IL-10, TGF- β	IL-10, TGF- β	Foxp3	<i>Foxp3</i>	Regulación de la actividad de la respuesta inmune adquirida.

Los factores maestros de transcripción Gata-3 y T-bet son antagonistas mutuos, los cuales al expresarse modifican la estructura de la cromatina, con lo cual una célula activada estabiliza el fenotipo adquirido e inhiben el desarrollo de un fenotipo alterno. En el caso de Gata-3 la reorganización de la cromatina permite la transcripción de los genes localizados en el locus Th2 (*il4*, *il5* e *ill3*), además de la inducción de la polarización de la respuesta inmune debido a la presencia de las citocinas mencionadas en la tabla 2, existen vías de inducción independiente de IL-12 e IL-4. Este mecanismo utiliza los ligandos de Notch, de los cuales, los ligandos de Notch 3 (Delta-like (DLL) 1 y 4) generan una respuesta Th1, y los ligandos de Notch 1 y 2 (Jagged 1 y 2), inducen una respuesta Th2 [34, 35].

Además de los ligandos de Notch, las citocinas presentes durante la activación inicial de los linfocitos Th0, determinan la subpoblación a la que habrán de diferenciarse. En el caso de las Th1, estas citocinas son el IFN γ y la IL-12, con alguna participación de la IL-18 ; para los linfocitos Th2, la principal citocina es la IL-4 misma, con alguna participación de la IL-33; para las células Th17, las citocinas esenciales son IL-6 y TGF β en un inicio, seguidas de IL-23 y finalmente con la

participación de IL-1. Las funciones de estas células son: la defensa contra bacterias intracelulares y virus para las Th1, defensa contra helmintos para las Th2, mientras que las Th17 son indispensables para la defensa contra bacterias extracelulares y algunas levaduras. Estas mismas subpoblaciones pueden participar como mediadores de daño inmunológico en algunos procesos patológicos, de las cuales, por su importancia en la infección por RSV, destacamos aquí las Th2, que también son las principales responsables de procesos de tipo asmático [34, 35].

Tabla 3. Características y función de las citocinas tipo Th1, Th2 y Th17.		
Citocina	Fuente celular	Efectos principales
IL-1	Macrófagos, queratinocitos, células endoteliales.	Efectos proinflamatorios, pirógeno, induce secreción de TNF.
IL-4	Linfocitos Th2, NKT, mastocitos, basófilos, eosinófilos, natural helper cells,	Activación de linfocitos B, cambio de isotipo hacia IgE e IgG1, diferenciación de Th0 a Th2, maduración de células cebadas. Antagonista IL-12.
IL-5	Linfocitos Th2, células cebadas, eosinófilos.	Diferenciación de eosinófilos y basófilos. Factor de crecimiento de linfocitos B.
IL-6	Macrófagos, linfocitos T, estroma del timo, médula ósea y endotelio.	Proliferación de células plasmáticas y linfocitos B. Mielopoyesis.
IL-9	Linfocitos Th2, eosinófilos, células cebadas.	Proliferación de células cebadas, eritropoyesis, expansión de linfocitos B1, maduración de megacariocitos.
IL-10	Monocitos, linfocitos T, Treg, linfocitos B, células dendríticas, queratinocitos	Inhibición funcional de linfocitos Th1 y macrófagos. Proliferación de linfocitos B, maduración de células cebadas. Cambio a isotipo IgA y anergia de linfocitos T (junto con TGF- β).
IL-12	Células dendríticas, macrófagos, linfocitos Th1.	Maduración de NK, diferenciación de Th0 a Th1, antagonista de IL-4.
IL-13	Linfocitos Th2.	Similar a IL-4, induce fibrosis. El receptor 2 es antagonista.
IL-17A y F	Linfocitos Th17.	Proinflamatorio (fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y epiteliales) y quimiotaxis de neutrófilos.
IL-21	Linfocitos T activados.	Activa NK y células T CD8 ⁺ , cambio de isotipo IgG2b e IgG1.
IL-22	Linfocitos Th17, NK y B.	Induce proteínas de fase aguda en hígado y páncreas, proinflamatorio (fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y epiteliales) y quimiotaxis de neutrófilos.
INF- α	Células dendríticas plasmacitoides, macrófagos.	Antiproliferativo, pirógeno, apoptosis, inflamación, antiviral, inducción de INF- γ .
INF- β	Fibroblastos, macrófagos,	Similar a INF- α

Tabla 3. Características y función de las citocinas tipo Th1, Th2 y Th17.

Citocina	Fuente celular	Efectos principales
INF- γ	Linfocitos Th1, linfocitos CD8 ⁺ , NK, linfocitos B.	Activación de macrófagos, antiviral, induce expresión de MHCI, MHCII, IL-12b2, cambio de isotipo a IgG2a.
TNF	Macrófagos, linfocitos Th1, Th17, B	Apoptosis, inflamación, aumento de la adhesividad del endotelio, organizador del tejido linfoide.

-Imunoregulación en la respuesta al RSV.

La infección del epitelio respiratorio por el RSV genera una cascada de señales mediadas por NF- κ B promoviendo la expresión de los siguientes factores: CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL2, CX3CL1, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-12p40, IL-13, y TNF. Los patrones de respuesta a este virus cambian dependiendo de la edad, el sistema inmune del neonato suele producir una respuesta del tipo Th2 ante el RSV. La proteína G viral inhibe la expresión temprana de CCL2, CCL3, CCL4, y CXCL2, además de bloquear o inhibir al IFN- β . Esto también se puede deber a la incapacidad de las DC de favorecer una respuesta Th1. La expresión CCL2, CCL3, e IL-10 asociada a las proteínas virales G y SH se relacionan con una disminución en la respuesta tipo Th1 [12, 14, 36].

La inmunidad generada por la infección por el RSV es pobre y de corta duración. Lo cual se asocia con el padecer reinfecciones frecuentes a lo largo de la infancia y con una respuesta Th2 en la vía aérea de larga duración. Lo anterior tiene dos posibles mecanismos responsables no excluyentes: 1) inactivación funcional de las células CD8⁺ por el RSV, y 2) la infección de las DC (derivadas de monocitos) por el RSV inhibe su proliferación y la inducción de la función efectora de las células T vírgenes. Se ha propuesto que la inhibición de células T por DCs infectadas por el RSV se debe a una interferencia de la sinapsis inmune [1, 3, 4, 37].

En modelos experimentales *in vivo*, la infección por el RSV aumenta la expresión de los genes *MUC5AC* y *Gob5*, así como el número de eosinófilos pulmonares después del día 9 p.i. (esto se encuentra asociado con los niveles de IL-13). La disminución en el número de neutrófilos y macrófagos se presenta desde el día 6 p.i. Estas observaciones son consistentes con las características clínicas observadas en niños que sufre de bronquiolitis por RSV [15].

Las CPA participan en la iniciación y modulación de las respuestas inmunes innata y adaptativa a patógenos. Durante la infección por el RSV, las células dendríticas (DC) son las principales CPA,

las cuales también incluyen a los macrófagos/monocitos y los linfocitos B. Las DC son una población celular heterogénea que puede dividirse en dos grandes subtipos: las células mieloides o convencionales (cDC) que son $CD11c^{high}/CD11b^{high}$ y las células plasmacitoides (pDC) que son $CD11c^{low}/mPCPAA1^{+}$ o $CD11c^{-}/CD123^{+}$ o $CD11c^{+}/B220^{+}$ o $CCPA11c^{+}/120G8^{+}$. Las cDC se han relacionado con dirigir la respuesta pro-alérgica, mientras que las pDC son la principal fuente de producción de IFN-I y bloquean el ambiente inmunológico pulmonar contra la respuesta Th2 [1, 4, 15, 38].

Después de la detección, captura y degradación del RSV, las DC responden secretando IFN-I, quimiocinas y citocinas pro-inflamatorias, e induce la expresión de moléculas coestimuladoras y receptores celulares (MHC-I, MHC-II, CD36, CD40, CD80, CD83, CD86). Después de su activación, las DC migran hacia el tejido linfóide, donde funcionan como CPA, siendo el puente entre la inmunidad innata y la adaptativa. La infección por el RSV aumenta la expresión de CD40, CD80 y CD86 en pDC [15, 26, 36, 39].

En experimentos *in vivo* en ratones infectados con RSV, el aumento en el número de células pDC resulta en protección durante la infección por el RSV. Cuando se eliminan las pDC, la infección favorece una respuesta inmune tipo Th2. Para que la respuesta inmune contra el RSV sea antiviral se ha sugerido que es necesaria la activación de la proteína MyD88. En ratones “*knockout*” para esta proteína adaptadora infectados por este virus se observaron 3 eventos: 1) las DCs fueron incapaces de producir una respuesta tipo Th1 (IL-12 y la señal “*delta-like4*”) e incrementaron la Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), 2) las células $CD4^{+}$ Ag-específicas no pudieron inducir niveles óptimos de IFN- γ , y 3) la transferencia de DCs de ratones con la proteína adaptadora a los “*knockout*” reconstituía la respuesta tipo Th1, mientras que viceversa la respuesta inmune se dirigía hacia el tipo Th2. Sin embargo los ratones utilizados en este estudio, su fondo genético era C6 [15].

De acuerdo con los hallazgos anteriores, las cDC infectadas por RSV producen IL-12, lo que favorece la producción de IFN- γ por células T y NK, las pDC producen preferentemente IFN-I, lo cual dirige la diferenciación de las NK y células T hacia un fenotipo citotóxico. En modelos *in vivo* la expansión de ambos subtipos celulares disminuyó la respuesta Th2 y aumentó la respuesta tipo Th1. Cuando se realizó depleción de pDC con expansión de cDC, se observó aumento de la respuesta tipo Th2 con inflamación e hiperreactividad de la vía aérea, además de disminución de la depuración viral [4, 7, 14].

El RSV interfiere con la función de las DC y los macrófagos. Esto se apoya en la siguiente información: 1) la infección, por el RSV, de monocitos/macrófagos y DC disminuye la producción de IFN-I en comparación con el hMPV (*Paramyxovirus* que carece de las proteínas virales NS1 y NS2), 2) la infección por RSV disminuye la maduración de pDC, 3) comparado con los virus influenza y parainfluenza, el RSV produce un perfil de citocinas sesgado hacia el tipo Th2 (bajos niveles de IL-12, con mayores niveles de IL-10, IL-11 y prostaglandina E2), 4) las cDC infectadas por el RSV disminuyen su capacidad de activar células T CD4⁺, 5) posterior a la infección por este virus, el número de DC persiste hasta 8 semanas después de la resolución [7].

-Inmunopatología asociada al RSV

La respuesta del sistema inmune en neonatos ante un reto con RSV tiene un sesgo hacia el tipo Th2. Las células mononucleares periféricas obtenidas de niños con bronquiolitis por RSV producen IL-4 (tipo Th2) al ser retadas *ex vivo* con el RSV. Este mismo ensayo con células de niños entre 7-8 años de edad con historia de enfermedad respiratoria inducida por el RSV produjo el mismo patrón de citocinas después de un reto con RSV. Este modelo ha sido reproducido en ratones BALB/c, que después de una reinfección por RSV a las 12 semanas de vida presentan importante pérdida de peso y una respuesta inmune tipo Th2 con eosinofilia pulmonar, lo que sugiere que esta es una respuesta de larga duración, ineficaz para la depuración viral y que aumenta el riesgo de padecer asma [2].

Entre 1966 y 1967, poco después de que el RSV fuera descubierto se generó la primera vacuna contra este virus. Esta vacuna conocida como FI-RSV se desarrolló en cultivos de células de riñón de mono y el virus se inactivo con formalina. La FI-RSV se aplicó en niños entre 2 meses y 9 años de edad, inyectado la vacuna intramuscularmente en 2 a 3 dosis separadas en intervalos de 1 a 3 meses. Nueve meses después de iniciado el estudio se detectó que 80% de los niños vacunados requirieron hospitalización por enfermedad respiratoria grave, en comparación con el 5% de los niños con la vacuna control contra parainfluenza que requirieron hospitalización. Dos de 141 niños vacunados con FI-RSV fallecieron. Las características clínicas de los niños con enfermedad potenciada por la FI-RSV fueron rinitis, neumonía, bronquiolitis, bronquitis. Los ensayos clínicos de esta vacuna fueron llevados a cabo sin pruebas previas en animales. Los autores concluyeron que la vacuna no solo falló en ofrecer protección contra el virus, sino que además indujo una respuesta inmune alterada y exagerada. Esta reacción se le conoce como enfermedad potenciada por la vacuna FI-RSV. La enfermedad potenciada por la vacuna FI-RSV también se ha presentado *in vivo* en animales de laboratorio (ratones BALB/c, ratones cola de algodón, monos rhesus, terneras, macacos) utilizando formulaciones de proteínas recombinantes contra el RSV [2, 20, 36, 40].

Hasta la fecha no existe una explicación ampliamente aceptada y convincente del sustrato fisiopatológico de la enfermedad inducida por la vacuna FI-RSV. *A posteriori*, una primera hipótesis sugiere que la vía Th2 es parcialmente responsable por el desarrollo de dicha complicación, así como de sibilancias y asma después de la infección por el RSV. Sin embargo los niños con bronquiolitis hipóxica severa aparentemente tenían una respuesta Th1/Th2 balanceada después de la infección. Una segunda hipótesis para lo ocurrido sugiere una sobreproducción de citocinas como responsable de la enfermedad respiratoria severa. Inicialmente se pensó que la inmunopatología pulmonar por este virus se debía únicamente a la respuesta tipo Th2. Sin embargo se ha observado que esta alteración también se debe a una respuesta Th1 excesiva [20, 36].

Los hallazgos de la enfermedad inducida por la vacuna se han reproducido en modelos *in vivo*. En ratones BALB/c las células T CD4⁺ son necesarias pero insuficientes para generar la inmunopatología de la enfermedad por FI-RSV. Esta patología se caracteriza por un incremento de IL-5, IL-10, IL-13 con disminución de la expresión de IL-12. Este mismo modelo se ha reproducido en *Macacus rhesus*, en los que la FI-RSV genera IL-5, IL-13, eosinofilia pulmonar e incluso muerte 12 días después del reto con RSV [36].

En infecciones por bacterias Gram negativas (las cuales utilizan el mismo TLR4 que el RSV) se ha demostrado que la estimulación del TLR4 juega un papel importante en la patogénesis de la sepsis bacteriana. Las citocinas inflamatorias que participan en este proceso también se han relacionado con el desarrollo de enfermedades con un gran componente alérgico asma o enfermedad pulmonar crónica. Las manifestaciones alérgicas de la vía aérea incluyen: infiltración eosinofílica, fuga microvascular y oclusión del lumen bronquiolar. Estas manifestaciones son muy similares a las observadas en la enfermedad pulmonar potenciada por la vacuna FI-RSV o por la reinfección en pacientes prematuros. La activación del complejo CD14/MD-2/TLR4 resulta en la liberación de mediadores inflamatorios relacionados con los eventos antes mencionados [33, 41-43].

Dentro del contexto de la infección por el RSV las CPA son importantes para el reconocimiento y activación de la inmunidad innata, para la activación adecuada de la inmunidad adaptativa, así como para los eventos que generan la inmunopatología pulmonar. Estas células son las principales células presentadoras de antígeno durante la infección por el RSV y modulan el balance de la respuesta Th1/Th2. La vía de los TLR, especialmente la de los TLR3, 4, 7 y 8 es muy importante para que se lleve a cabo la activación de las CPA y la posterior producción de citocinas pro-inflamatorias y antivirales. El estudio de la participación de estos receptores es importante en el

entendimiento de la patogénesis de la enfermedad pulmonar asociada al RSV. El bloqueo de la activación del complejo del TLR pudiera disminuir la liberación de citocinas inflamatorias relacionadas con la respuesta Th1 y Th2 y por lo tanto disminuir la inmunopatología respiratoria asociada al RSV. Aunque se ha aceptado como consenso general que la enfermedad potenciada por la FI-RSV y la enfermedad respiratoria grave por RSV se deben a un balance predominantemente Th2, la respuesta Th1 excesiva también es una explicación para estos eventos.

El estudio de los mecanismos que regulan el balance de la respuesta Th1/Th2 ante la infección por el RSV debe de tener como objetivo la identificación de posibles blancos terapéuticos. Entender dichos mecanismos inmunes y así tener la posibilidad para modificarlos es de gran relevancia en una infección que hasta la fecha no cuenta una vacuna efectiva y segura, ni con tratamiento antiviral específico o efectivo.

JUSTIFICACIÓN.

- El RSV es el agente etiológico más importante en infecciones agudas del tracto respiratorio superior e inferior en <5 años y en >65 años de edad.
- Durante la infancia, las reinfecciones por RSV son frecuentes y la respuesta inmune adaptativa eficaz parece no desarrollarse hasta edades mayores.
- Los niños con historia de prematurez, cardiopatías, neumopatías, síndrome de Down y aquellos nacidos durante el periodo otoño-invierno, tienen mayor riesgo de infección grave, para la cual no existe profilaxis costo-efectiva accesible, ni terapéutica antiviral específica.
- En ciertos individuos con mayor riesgo de inmunopatología por RSV, la activación de linfocitos T conduce predominantemente a la vía Th2
- Se desconoce el mecanismo por el cual la interacción huésped-RSV modifica el balance de la respuesta Th1/Th2.
- En la infección por RSV, la respuesta tipo Th2 en pulmón se asocia con un mayor riesgo subsecuente para desarrollar asma.
- Aparentemente en la infección por RSV, el adaptador MyD88, participa en la señalización de la respuesta hacia el tipo Th1. Sin embargo, no se ha estudiado de manera independiente la participación del adaptador Trif.
- Los hallazgos sobre el papel del TLR4 y MyD88 en la respuesta inmune contra RSV se realizaron antes de saber que el TLR4 también utiliza a Trif, y que esto ocurre cuando el TLR4 se localiza en endosomas.
- La diferenciación de linfocitos T hacia Th1 o Th2 u otras subpoblaciones depende de la activación diferencial de las CPA, lo cual depende, al menos en parte, de la señalización a través de sus TLR durante la captación inicial de los patógenos (en este caso, RSV).

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿En la infección de células presentadoras de antígenos por el RSV el balance de la respuesta tipo Th1 o Th2 depende de MyD88 o de Trif?

HIPÓTESIS.

La señalización por MyD88 durante la infección en CPA por el RSV induce la polarización de la respuesta inmune hacia el tipo Th2, y la señalización por Trif hacia Th1.

OBJETIVO PRINCIPAL.

Examinar en forma independiente el papel de los adaptadores MyD88 y Trif en respuesta a la infección por RSV a través de los TLR en la inducción de respuestas tipos Th1 o Th2 en macrófagos J774A.1 como modelo de CPA.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Evaluar el balance de citocinas inductoras de respuestas tipos Th1/Th2 en células infectadas con RSV.
2. Comparar el balance de citocinas inductoras de respuestas tipos Th1/Th2 inducidos por RSV con estímulos convencionales a través de TLR
3. Determinar el perfil de citocinas tipos Th1/Th2 en ausencia selectiva de MyD88 y Trif en células infectadas con RSV.

RESULTADOS ESPERADOS.

Mediante este estudio se determinará lo siguiente:

1. Expresión del mRNA de MyD88 y Trif ante los diferentes tipos de estímulos de maduración.
2. Inhibir mediante siRNA la expresión de MyD88 y Trif.
3. Analizar el efecto de la inhibición selectiva de MyD88 y Trif sobre el perfil de citocinas intracelulares ante los diferentes estímulos de maduración.

LIMITACIONES.

Las limitaciones del estudio son las siguientes:

1. Es un estudio *in vitro* en un modelo experimental y en una sola línea celular.
2. Por lo cual los resultados obtenidos no son necesariamente un reflejo de lo que ocurre *in vivo*

MATERIALES Y MÉTODOS.

Ensayos virales: Se utilizó el virus RSV-A cepa Long, la cual fue expandida en una ocasión en células Hep2, cultivadas en DMEM con L-glutamina 2mM, suero fetal bovino (SFB) 10% y 10 µg/ml ciprofloxacina. El ensayo de placa se realizó en cajas de 6 pozos a una concentración de células Hep2 de 2.5×10^5 células/ml, incubándose 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. El inóculo utilizando diluciones seriadas (\log_{10}), se incubó durante dos horas, con agitaciones manuales cada 15 minutos, posteriormente se lava dos veces las células con PBS/PS/BA y se añadió DMEM 2X con agar 2%, SFB 1%, ciprofloxacino, NaHCO₃ 5%, y DEAE-Dextran 1%. Las placas fueron incubadas a 37°C con 5% CO₂ durante 7 días. Las células se fijaron con formalina 3.7% (1 ml/pozo) y se tiñeron con cristal violeta al 1% (500 microlitros/pozo). Contamos el número de placas y se calcula con una regresión lineal el título del stock viral.

Macrófagos a utilizar para los experimentos: La línea celular J774A.1, la cual deriva de monocitos murinos, obtenido de líquido de ascitis de ratones Balb/c hembras con sarcoma reticular [44]. Esta se cultivaron en medio Advanced DMEM suplementado con L-glutamina 2mM SFB 10% y ciprofloxacina 10 µg/ml ciprofloxacina. La activación/maduración de los macrófagos se realizó con lipopolisacárido (LPS) y ácido poli-inosínico:policitidílico (Poli:C) durante 48 horas. Previo lavado de la monocapa con la PBS/PS/BA, la unión e internalización de RSV se realizó a una MOI de 0.3 y 1.5, con agitación manual cada 15 minutos durante dos horas. Posteriormente se retiró el inóculo se lavo en dos ocasiones con PBS/PS/BA y se agregó medio de cultivo. Luego de 48 horas se obtuvieron proteínas y RNA.

Extracción y purificación de RNA: La extracción y purificación del RNA se realizó mediante el método de TRIZOL según las indicaciones del fabricante. El RNA extraído se resuspendió en 50 µl de A₂O-DEPC, se hicieron alícuotas de 10 µl y se almacenó a -70°C. Para la detección de MyD88 y Trif se sintetizó cDNA con oligo(d)T con el estuche de MML-V de Promega (siguiendo las indicaciones del manufacturante).

Detección viral: La detección viral se realizó mediante RT-PCR en un solo paso (KIT Access RT-PCR System de Promega) utilizando los oligos: RSV-LCs - TCTTCATCACCATACTTTTCTGTTA- (gen L, posición 12647-12623) y RSV-LCs 5'-GCCAAAAAATTGTTTCCACAATA-3' (gen L, posición 12478-12500), con el siguiente programa de termociclado: 50°C/30 min., 94°C/2 min., 45 ciclos de 94°C/20 seg., 55°C/20 seg., 68°C/30 seg, y extensión final 68°C/7 min.

Detección de MyD88 y Trif: Para la detección de los mensajeros de MyD88 y Trif mediante PCR y qRT-PCR. Para la PCR de MyD88 se utilizaron los siguientes oligos: MyD88 mouse.F: 5-TCGAGTTTGTGCAGGAGAG-3 y MyD88 mouse.R (100 bp): 5-CTTGGTGCAAGGGTTGGTAT-3 (exones 4 y 5), con el siguiente programa de termociclado: utilizando una temperatura de alineamiento de 56°C durante 30 ciclos y con extensión final de 72°C/7 minutos. Para la detección de Trif (Ticam1) mediante PCR se utilizaron los siguientes oligos (200 bp): Ticam_F: 5-CAGCTCAAGACCCCTACAGC-3 y Ticam_R: 5-AAGGCACCTAGAATGCCAAA-3 (exones 1 y 2), con el siguiente programa de termociclado: utilizando una temperatura de alineamiento de 57°C durante 30 ciclos y con extensión final de 72°C/7 minutos. Los productos de PCR se resolvieron en gel de agarosa al 1.5% y se tiñó con bromuro de etidio. Para la cuantificación del amplicón de MyD88 y Trif se utilizó el kit TaqMan®RNA-to-CT™ 1-Step Kit de Applied Biosystems para qRT-PCR. Utilizando los mismos primers descritos anteriormente y con sondas tipo Taqman para Trif (5'-/56-FAM/CGCCCTCCA/ZEN/GCATCTTTGCAG/3IABkFQ/-3') y para MyD88 (5'-/56-FAM/CCAGGTGTC/ZEN/CAACAGAAGCGACT/3IABkFQ/-3'). El programa de termociclado (Applied Biosystem 79000HT Fast Real-Time PCR System) fue el siguiente: 50°C/2 minutos, 95°C/10 minutos, un ciclo de 40 repeticiones (95°C/15 segundos, 60°C/1 minuto), extensión de 95°C/15 segundos.

Determinación perfil producción de citocinas: Se realizó el análisis de la expresión de mensajeros de citocinas utilizando el mismo estuche de qRT-PCR y programa de termociclados utilizados para el caso de MyD88 y Trif. Los sistemas TaqMan empleados fueron proporcionados por Applied Biosystem. Las sondas utilizadas fueron las siguientes: IL-2 (Mm00434256_m1), L-4 (Mm00445254_m1), IL-6 (Mm0044640_m1), IL-10 (Mm00434616_m1), IL12b (Mm00434170_m1) INF- γ (Mm008-1778_m1), TGF- β (Mm00441724_m1).

Silenciamiento de MyD88 y Trif mediante transfección transitoria de macrófagos J774 A.1: El silenciamiento se realizó utilizando siRNA de doble cadena complementario al mRNA de MyD88 y Trif, los cuales fueron obtenidos de Thermo Scientific con los productos siGENOME siRNA-Mouse TRAM (D-042495) y siGENOME siRNA-Mouse MyD88 (D-063057). Los métodos de transfección utilizados (utilizando las indicaciones sugeridas por los fabricantes) fueron: siPort, Fugene HD, Lipofectamine LTX, así como nucleofección con Amaxa Nucleofactor II Device el cual utilizó con el siguiente kit: *Mouse Dendritic Cell Nucleofactor Kit* (Amaxa) (programa recomendado por el fabricante T-020). Para comprobar la eficiencia de la transfección se

realizó PCR punto final (kit) y qRT-PCR (1-Step qRT-PCR Apply Biosistem) con técnicas habituales.

RESULTADOS.

En este trabajo se utilizó el virus RSV-A cepa Long, la cual se expandió y propagó en células Hep2. Durante el proceso de expansión observamos que desde las primeras 24 horas post-infección ya era visible el efecto citopático causado por el virus (figura 1B), para el 5° día post-infección la formación de sincicios era evidente y se empezaba a observar desprendimiento de la monocapa celular. En el 7° día, aproximadamente el 80% de la monocapa celular se desprendió y la apariencia del sobrenadante era turbio.

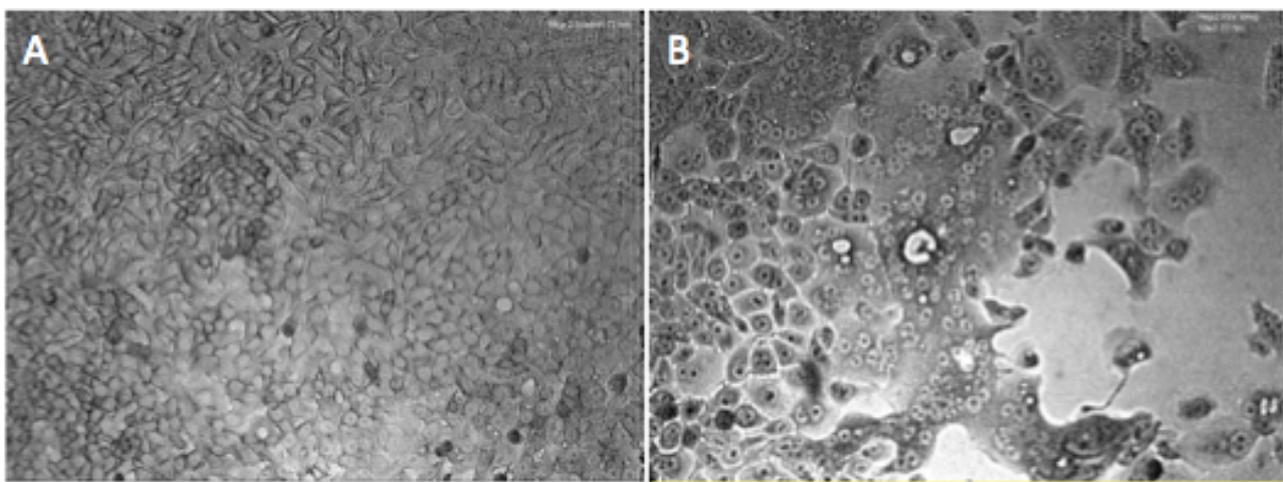


Figura 1. Fotografía 10X de células Vero. A) células sin infección, B) células al 5° día post-infección, se observa la formación de sincicios, visualización de núcleos, presencia de células multinucleadas y ruptura/desprendimiento de la monocapa celular.

Para realizar los experimentos de infección en de la línea monocito/macrófago empleamos la línea celular J774A.1. Antes del desarrollo de la tesis no se había reportado el uso de esta línea celular como modelo experimental para el estudio *in vitro* de la infección por el RSV.

Estas células al ser estimuladas por ligandos agonistas de TLR3 y TLR4 (LPS y Poli I:C respectivamente) mostraron granulación difusa en el citoplasma, desarrollo de protusiones de la membrana y adquisición de morfología en forma de huso, estos cambios son indicativos de la activación de los monocitos/macrófagos (figura 2B y C). La infección por el RSV generó los mismos cambios (figura 2D y 3) que los arriba mencionados. Adicionalmente observamos la aparición de vesículas electrolúcidas de localización periférica (flechas negras en la figura 3A y B). No podemos asegurar que estas vesículas son específicas de la infección, sin embargo no fueron observadas durante la estimulación con LPS y Poli I:C. La infección generó mayor desprendimiento de la monocapa celular (efecto observado desde las 24 horas post-infección) que la aplicación del LPS y Poli I:C.

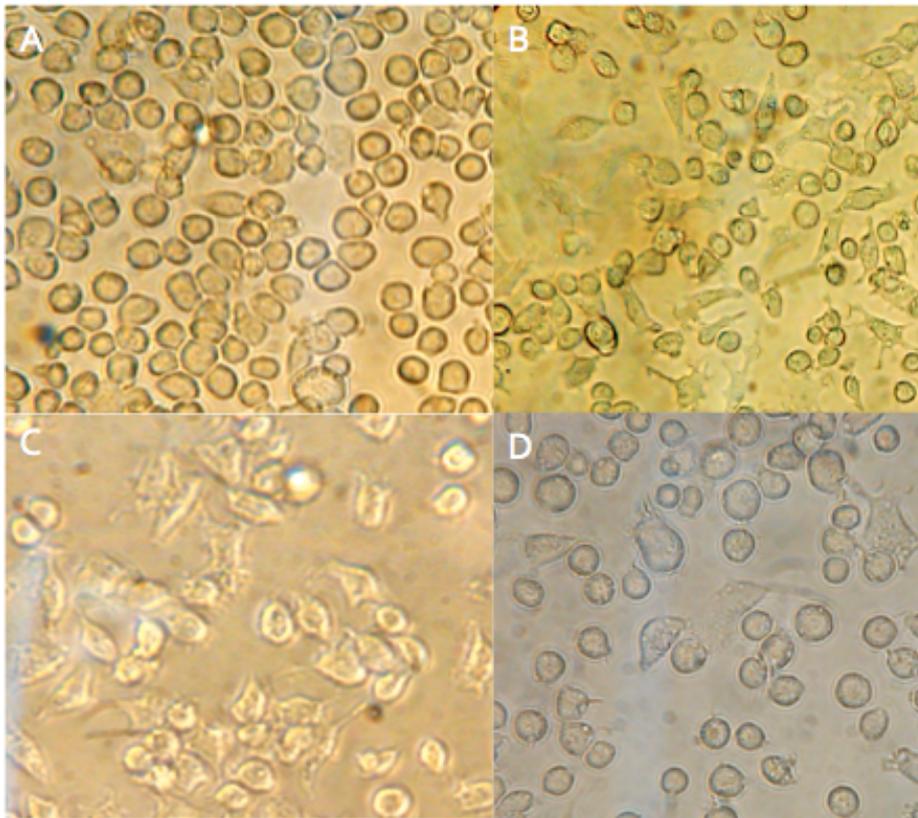


Figura 2. Fotografía 20X de células J774A1 48 h post-estimulación. A) células sin estímulo, B), células estimuladas con 10ng/ml de LPS, c) células estimuladas con 25 mcg/ml de Poli I:C , D) células infectadas con RSV (MOI 0.03).

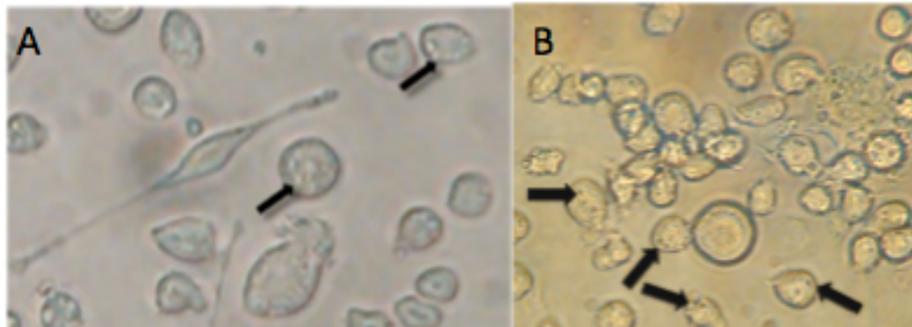


Figura 3. Ampliación de células infectadas con el RSV, flechas indican localización de vesículas.

Para corroborar los hallazgos observados en el cultivo celular se realizó RT-PCR para la detección del genoma viral (gene *L*). Infectamos macrófagos a una MOI de 0.3, 1.5 y 0.3, 48 horas después se extrajo el RNA. En la figura 4 se muestra el producto de la amplificación del gene *L* del RSV utilizando tres dosis de infección. Después de analizar el resultado decidimos trabajar con la MOI 0.3.

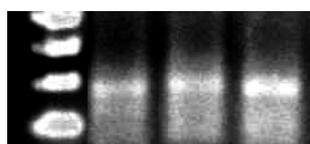


Figura 4. RT-PCR para la detección del RSV en células J774 A.1 infectadas a MOI de 0.3 (carril 2), 1.5 (carril 3) y 3 carril 4).

Como se puede ver en la figura 5 la utilización de LPS y Poli I:C no generó un producto de PCR de las mismas características del obtenido por la infección por RSV. Por lo tanto podemos decir que esta PCR para la detección del virus es específica, y por lo cual se utilizó como evidencia de infección.

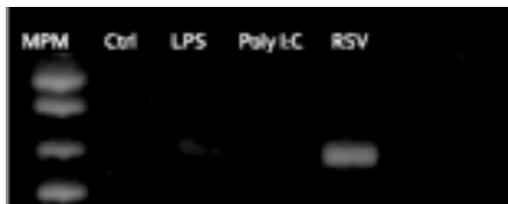


Figura 5. RT-PCR para la detección del RSV en células J774 A.1 estimuladas con LPS, Poli I:C e infectadas con RSV (tamaño esperado 125 bp).

Para determinar la expresión y niveles de mensajeros MyD88 y Trif, se diseñaron oligonucleótidos y sondas Taqman para amplificar una región del transcrito de MyD88 de 100 bp (entre exones 4-5) y Trif de 200 bp (entre exones 1-2). En la figura 6A y 6B mostramos los resultados de la amplificación por RT-PCR punto final de los mensajeros de Trif y MyD88, donde se observa que la infección por RSV incrementó la expresión del mensajero de Trif con respecto al control (figura 6A). Sin embargo esta inducción no fue de la misma magnitud de la generada por con el Poli I:C. En estas condiciones la incubación de LPS no generó la inducción de Trif. La infección por RSV no indujo un incremento del mensajero de MyD88.

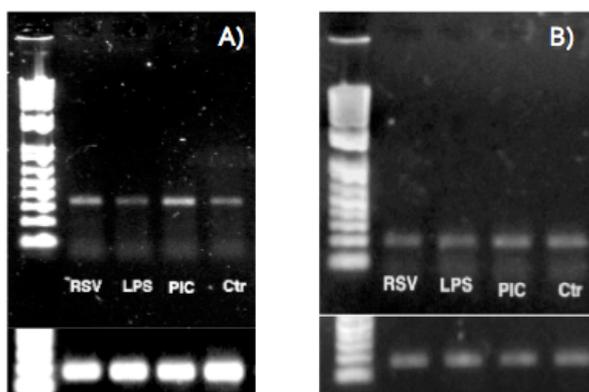


Figura 6. PCR para A) Trif y B) MyD88 (control de carga con GAPHD en paneles inferiores).

Ya que que la RT-PCR de punto final es un método no cuantitativo y que las diferencias observadas son pequeñas, decidimos analizar la expresión de los mRNA de Trif y MyD88 mediante qRT-PCR (figura 7). Mediante qRT-PCR observamos que el mayor incremento en la expresión relativa del mRNA de de Trif ocurrió cuando las células fueron estimuladas con LPS y Poli I:C (4.06 y 3.84 veces respectivamente con respecto al control), mientras el RSV generó un aumento marginal en su expresión (1.37 veces con respecto al control). Para MyD88, la estimulación con LPS y Poli I:C

generaron los mayores niveles de expresión del mensajero (3.81 y 4.05 veces respectivamente, en relación al control), la infección por RSV incrementa 2.38 veces la expresión de MyD88 con respecto al control.

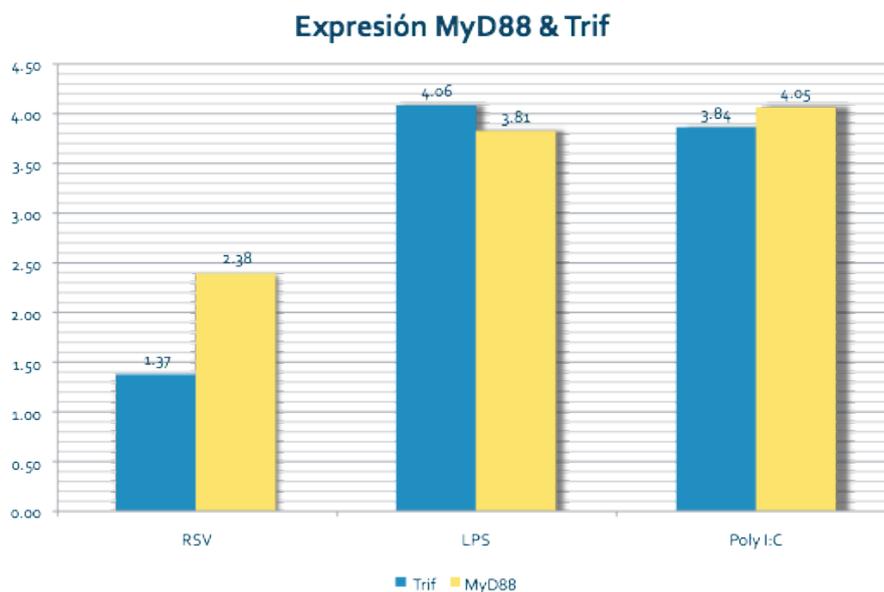


Figura 7. Expresión relativa del mRNA de Trif y MyD88 ante la infección, y estimulación con LPS y Poli I:C.

La infección por el virus incrementó en mayor proporción los niveles del mRNA de MyD88 que de Trif, sin embargo los niveles de expresión de ambos mensajero inducidos por el virus son menores que los generados por sus ligandos clásicos. A pesar de que la magnitud de la inducción de ambas moléculas fue pequeña en comparación con LPS y Poli I:C, consideramos que esto no significa necesariamente que los niveles de expresión registrados no activen las cascadas de señalización dependientes de MyD88 y Trif, y por lo tanto la inducción de un fenotipo en respuesta a la infección.

Al analizar la expresión de los mensajeros de citocina *in vitro*, encontramos que en nuestro modelo la infección por RSV induce expresión del mensajero de TGF- β , IL-4 e IL-6 (figura 8). Ni la infección por RSV, ni la estimulación con LPS o Poli I:C generó la expresión de IL-10 o IL-12 en macrófagos J774A.1 (las sondas Taqman utilizadas sí amplificaron IL-10 e IL-12 en linfocitos T estimulados con fitohemaglutinina).

De las tres citocinas expresadas en nuestro modelo (gráfica 8), la infección por RSV es el estímulo que produce la mayor expresión relativa de IL-6 (4 veces *vs* el control, 2.79 veces *vs* LPS y 2.1 veces *vs* Poli I:C). Tanto para la IL-6 como para TGF- β , el estímulo de Poli I:C resultó en el mayor incremento relativo de la expresión (19.56 y 5.63 veces respectivamente *vs* el control). La infección

por RSV generó casi el doble de la expresión relativa de IL-6 que las células estimuladas con el LPS (6.15 veces y 3.12 veces respectivamente vs el control). El LPS produjo un incremento marginal de los niveles del mensajero de TGF- β (1.36 vs control): en cambio, la infección por RSV no elevó la expresión de dicho mensajero. Tomando en cuenta que de las citocinas estudiadas, nuestro modelo no expresa IL-10 ni IL-12, la infección por RSV genera el incremento en la expresión relativa de IL-4 (citocina tipo Th2) y de IL-6, pero no es así con TGF- β .

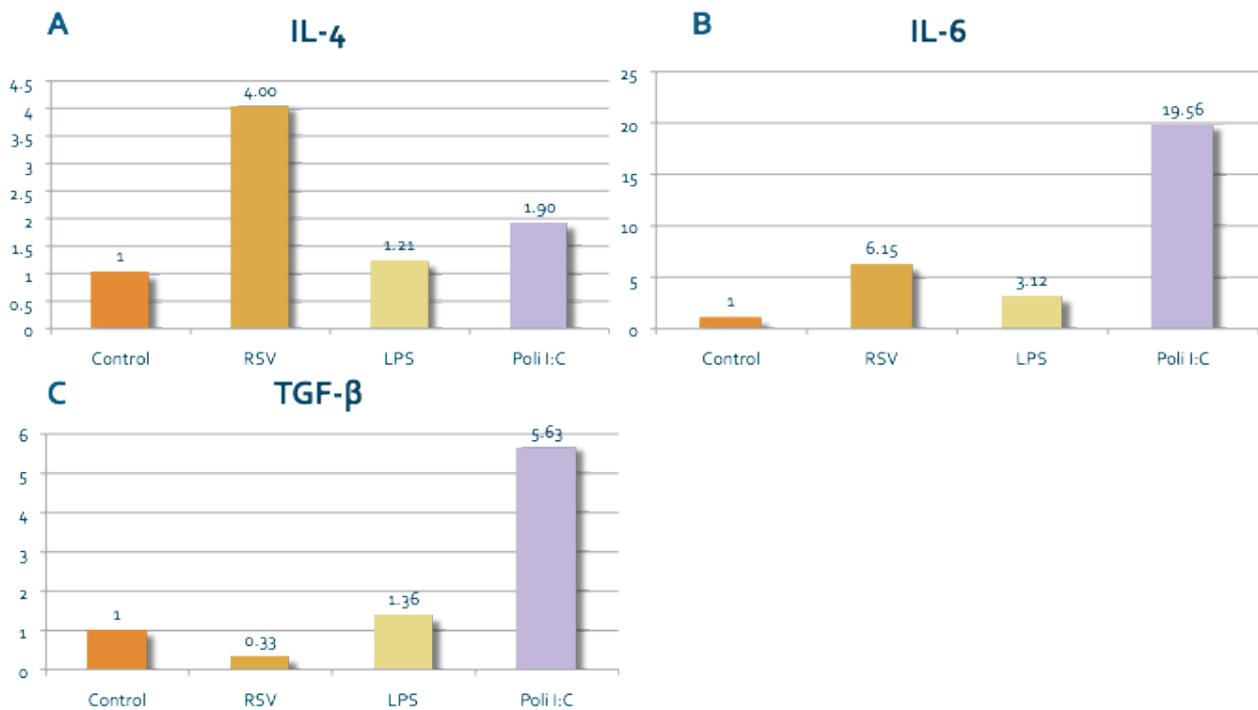


Figura 8. Expresión relativa del mRNA de citocinas en células infectadas, estimuladas con LPS y con Poli I:C. A) IL-4, B) IL-6 y C) TGF- β .

Una vez descritas las características de nuestro modelo *in vitro*, decidimos realizar el silenciamiento de las moléculas adaptadoras MyD88 y Trif utilizando siRNA pequeños de doble cadena. Para lo cual se comparó la disminución en los niveles de expresión relativa de dichas moléculas posterior al silenciamiento mediante los siguientes métodos: siPORT NeoFx (Ambion), Lipofectamine LTX and Plus Reagent (Invitrogen), FuGENE HD (Roche) y nucleofección con el dispositivo Amaxa II. El silenciamiento para los primeros tres métodos se realizó por duplicado, utilizando para cada uno de los reactivos tres diferentes relaciones con respecto a la cantidad de siRNA utilizado (1:1, 2:1 y 1:2), 24 horas después de la transfección se cambió el medio de cultivo y un día después se extrajo el RNA.

En la figura 9 izquierda se observa el efecto del silenciamiento contra Trif utilizando siPORT. En las relaciones (reactivo:siRNA) de transfección 1:1 y 2:1 (carriles S1-S2 y S3-S4 respectivamente)

se observan los amplicones de menor intensidad en comparación con la relación de transfección 1:2 y con el control (carriles S5-S6, CO1-CO2). Para MyD88, la relación reactivo:siRNA 1:2 de siPORT así como los métodos de Lipofectamine LTX y Fugene HD no generó disminución en la expresión de MyD88 (dato no mostrado). Mediante PCR de punto final no se observó disminución en los niveles de expresión de Trif por ninguno de los métodos previamente utilizados (figura 6 derecha muestra siPORT 1:1 y 2:1). En el caso de la nucleofección, 24 horas posteriores al procedimiento se observaba un gran número de detritus celulares y escasas células viables en el cultivo. Tomando en cuenta los resultados obtenidos por PCR en punto final, decidimos utilizar el método de transfección con el reactivo de siPORT NeoFx (relación reactivo:siRNA de 2:1).

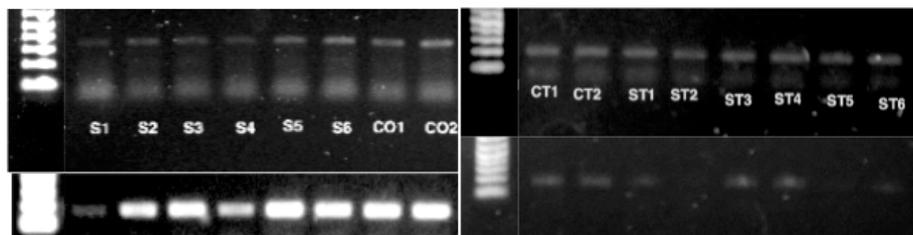


Figura 9. Resultados por duplicado del silenciamiento utilizando siPORT, relación reactivo:siRNA 1:1, 2:1, 1:2. Izquierda, silenciamiento contra MyD88. Derecha, silenciamiento contra Trif (control de carga GAPDH).

Ya establecido el método de transfección más eficiente, decidimos realizar la transfección y 24 horas después infectar con el RSV. Como controles de estímulo utilizamos paralelamente la estimulación con LPS y Poli I:C. Para evaluar el efecto del silenciamiento de MyD88 y Trif durante la infección por el RSV, se realizaron tres experimentos independientes. En las figuras 10-12 se muestra el experimento 1, en las figuras 13 y 14 se muestra el experimento 2, en el experimento tres la transfección contra MyD88 y Trif no fue exitosa.

En la figura 10 mostramos la expresión relativa de MyD88 en el primer experimento de silenciamiento y estímulo. En las células no transfectadas la infección por RSV incremento en un 69% la expresión de MyD88 en comparación con las células no infectadas, mientras que el estímulo con LPS y Poli I:C aumento la expresión relativa de MyD88 9.4 y 22.74 veces respectivamente. En las células silenciadas se logro disminuir la expresión relativa de MyD88 un 57.39% para las células infectadas con RSV, y un 97.55% y 97.80% en células estimuladas con LPS y Poli I:C respectivamente.

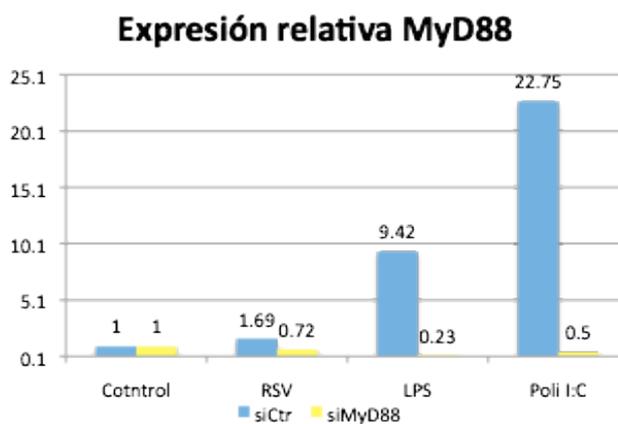


Figura 10. Experimento 1, expresión relativa del mRNA de MyD88 posterior a la silenciamiento y estímulo.

Para este mismo experimento los niveles de expresión relativos de Trif se muestran en la figura 11. En células no transfectadas la infección aumentó en un 16% la expresión relativa de Trif con respecto a las células no infectadas, los estímulos con LPS y Poli I:C incrementan 7.81 y 14.36 veces respectivamente la expresión de Trif. En este experimento la transfección de Trif también fue exitosa, ya que se logró una disminución del 71.55% en la expresión de Trif en células infectadas, en el caso de las células estimuladas con LPS y Poli I:C esta reducción fue del 96.41% y 98.25% respectivamente en relación con las células no transfectadas.

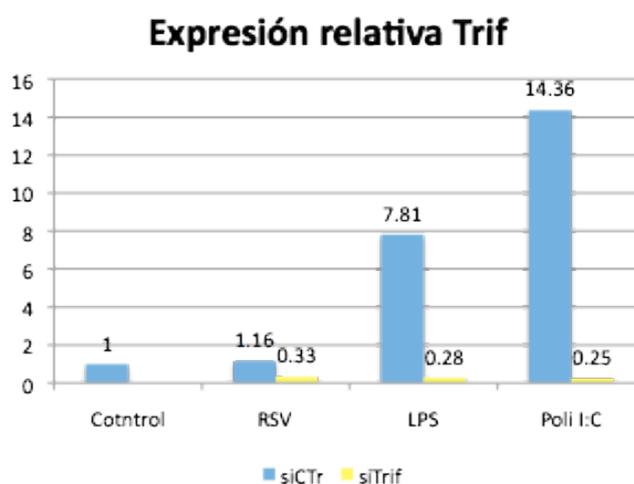


Figura 11. Experimento 1, expresión relativa del mRNA de Trif posterior a la silenciamiento y estímulo.

Con las dos gráficas anteriores podemos documentar el éxito de la transfección contra MyD88 y Trif. En congruencia con la figura 7, podemos establecer que la infección por el RSV indujo un incremento marginal en la expresión de MyD88 y Trif, sin embargo este incremento fue suficiente para generar un fenotipo o respuesta ante la infección (figura 8).

En la figura 12 mostramos el nivel de expresión del mRNA de citocinas en células transfectadas y estimuladas. En la infección por el RSV (figura 12A), el silenciamiento de MyD88 disminuyó la expresión relativa de IL-4 e IL-6 en un 98.41% y 48.51% respectivamente. En el caso de Trif, su silenciamiento se redujo un 28.89% la expresión de IL-4 y en un 66.91% los niveles de IL-6 con respecto a las células infectadas no transfectadas. En este experimento se observó que en la infección por el RSV, la vía de MyD88 se relaciona con el aumento de la expresión de IL-4. Para la IL-6 el silenciamiento por separado de ambas moléculas redujo parcialmente los niveles de expresión relativa de su mensajero, por lo cual pudiera existir la posibilidad de que IL-6 fuera estimulada por ambas vías. En el caso de TGF- β , las células infectadas por RSV no incrementan la expresión de este mensajero y el silenciamiento de MyD88 prácticamente no modifica su expresión, sin embargo el silenciamiento de Trif aumenta su expresión en 2.36 veces con respecto a las células infectadas y no transfectadas.

Durante la estimulación con LPS (figura 12B), el silenciamiento de MyD88 disminuyó la expresión relativa de IL-4, IL-6 y TGF- β en un 98.23%, 91.88% y 90.85% respectivamente. El silenciamiento de Trif redujo la expresión de IL-4 en 86.56%, IL-6 en 84.39% y TGF- β en 99.12%. En el caso de la estimulación con Poli I:C (figura 12C) el efecto del silenciamiento es más dramático que con RSV y LPS, ya que la interferencia de MyD88 disminuyó un 99.17% la expresión de IL-4, un 99.85% la expresión de IL-6 y un 99.61% la expresión de TGF- β . El silenciamiento de Trif genera un efecto muy similar, redujo la expresión de dichos mensajeros un 86.9%, 99.46% y 99.56% respectivamente.

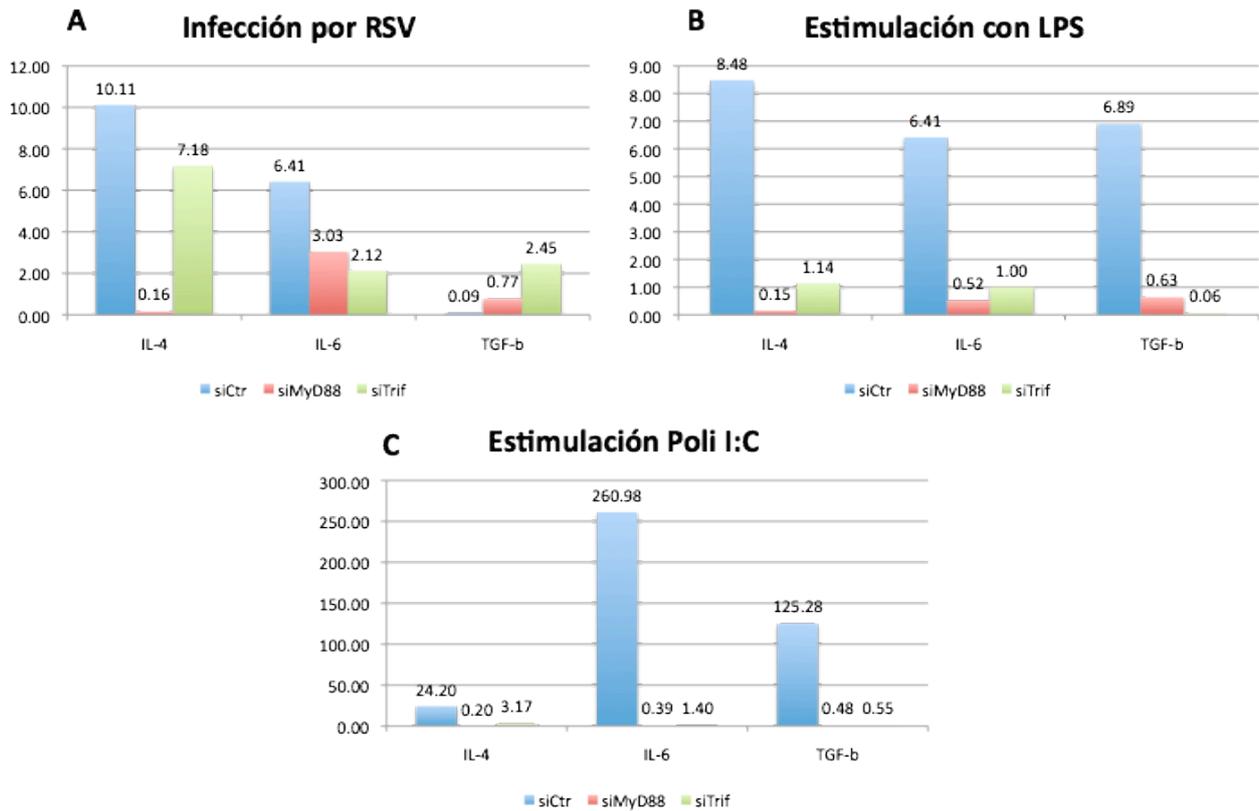


Figura 12.. Experimento 1, expresión relativa del mRNA de IL4, IL6 y TGF-β en célula transfectadas contra MyD88 y Trif.

Para el segundo experimento únicamente el silenciamiento de MyD88 fue exitoso (figura 13A), ya que se logró la reducción en los niveles de expresión de dicha moléculas en las células infectada en un 99.99% con respecto a las no transfectadas, en el caso de las células estimuladas con LPS y Poli I:C, la disminución fue del 98.57% y 99.77%. En el caso del silenciamiento contra Trif (figura 13B), únicamente las células infectadas con RSV mostraron una reducción del 64.49%, mientras que en las células estimuladas con LPS y Poli I:C aumento en la expresión relativa de Trif.

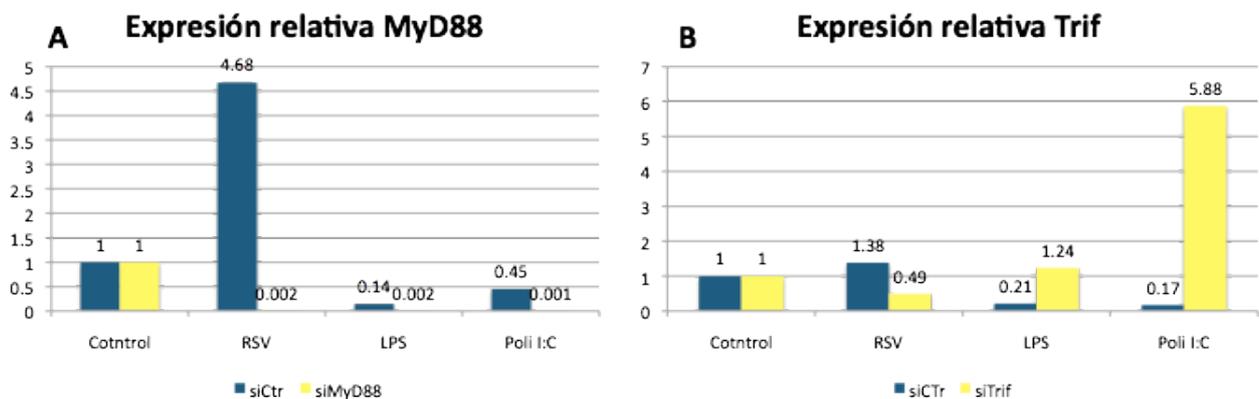


Figura 13. Experimento 2, expresión relativa de MyD88 y Trif posterior a la silenciamiento y estímulo.

Para este experimento, la transfección con los interferentes de MyD88 en las células infectadas con el RSV o estimuladas con LPS y Poli I:C lograron una reducción casi total de la expresión de IL-4, IL-6 y TGF- β (figura 14A-C). Sin embargo en las células transfectadas contra Trif e infectadas se detectó un aumento de IL-4 de 65%, mientras que IL-6 y TGF- β disminuyeron 50.95% y 31.91% con respecto a las células infectadas pero no transfectadas.

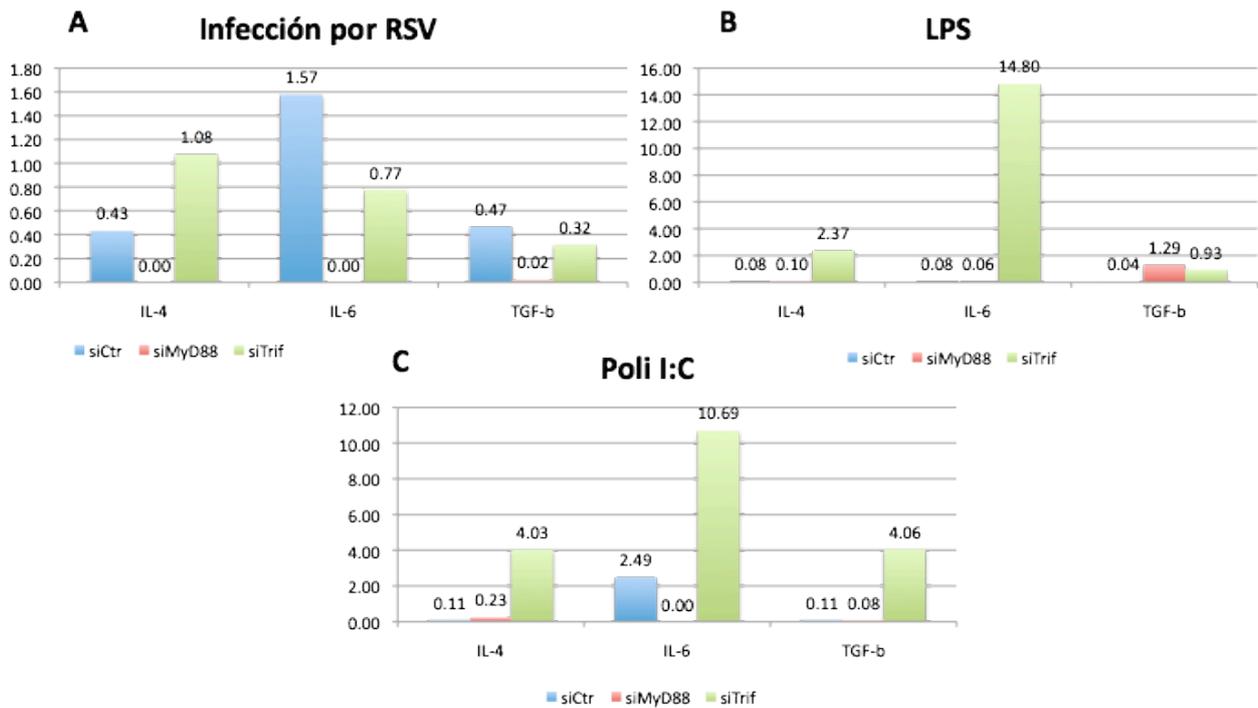


Figura 14. Experimento 2, expresión relativa del mRNA de IL4, IL6 y TGF- β en célula transfectadas contra MyD88 y Trif.

DISCUSIÓN.

Antes que se realizara este trabajo de tesis no se había reportado el uso de la línea celular J774A.1 como modelo de infección *in vitro* en células presentadoras de antígenos por el RSV. Pero contábamos con el antecedente de que esta línea celular había sido utilizado en experimentos con el Newcastle disease virus, el cual también es miembro de la familia *Paramyxoviridae* [45]. Sin embargo se ha reportado que estas células tienen una actividad menor de los promotores de citocina que otros sistemas [45-47].

Durante el desarrollo de esta tesis demostramos tanto por observaciones de los cambios morfológicos como por RT-PCR, que los monocitos/macrófagos J774A.1 son permisivos a la infección por el RSV. Durante la infección por el RSV en células J774A.1 logramos observar la presencia de vesículas intracelulares electrolúcidas adyacente a la membrana celular. Aunque no podemos asegurar que este sea un evento único de la infección, sí es un evento que se visualiza con mayor notoriedad en células infectadas que en células estimuladas con LPS o Poli I:C.

Ya que documentamos la permisividad de las células a la infección por el RSV, analizamos el efecto de la infección en los niveles de expresión relativa del mRNA de MyD88 y Trif. La infección por RSV induce mayor expresión relativa de MyD88 que de Trif. Sin embargo, los niveles de expresión que se alcanzan con la infección son mucho menores a los que se alcanzan con la estimulación con ligandos clásicos de los TLR4 (LPS) y TLR3 (Poli I:C). Esta diferencias en magnitud entre el virus y los agonistas solubles no es comparable, y tampoco se relaciona con la capacidad del virus de generar o no una respuesta celular ante la infección. Es posible que los niveles de expresión MyD88 y Trif aunque son bajos, sean suficientes para inducir un fenotipo o respuesta al virus. Esta respuesta a la infección, en nuestro modelo *in vitro*, se caracterizó por un incremento relativo del mRNA de IL-4 e IL-6, sin incremento en la expresión TGF- β .

La producción del mRNA de citocinas en nuestro modelo *in vitro* es limitado, ya que únicamente se detectamos la expresión de IL-4, IL-6 y TGF- β (utilizando como referencia el estímulo inducido por el LPS y Poli I:C), y no logramos detectar expresión de IL-10 ni IL-12, inclusive utilizando dosis 5 y 10 veces mayores de LPS y Poli I:C que las utilizadas para el resto de las citocinas. La infección de monocitos/macrófagos J774A.1 por RSV incrementa la expresión de IL-4 e IL-6, pero no de TGF- β . Aunque IL-6, no es propiamente una citocina tipo Th2, sí es considerada como un factor necesario para la diferenciación fenotípica de Th0 a Th2 [34, 35]. Por lo tanto la infección

por RSV en nuestro modelo induce la expresión de mRNA del perfil tipo Th2, mientras que no se induce un perfil antiinflamatorio o Th3 (TGF- β).

A pesar de que en el modelo utilizado, no se logró detectar la expresión de IL-10 ni IL-12, existe el antecedente en la literatura de que en las células J774A.1 se genera una menor producción de INF-I en comparación con las células RAW264 o macrófagos peritoneales [46]. No sería improbable considerar el hecho que en los monocitos/macrófagos utilizados presenten modificaciones epigenéticas que repriman la vía tipo Th1, adicionalmente hay que considerar que estas células provienen del líquido de ascitis de un ratón Balb/c con sarcoma reticular con lo cual su respuesta se encontrara sesgada hacia el tipo Th2 [45-47].

En el macrófago las dos principales vías productoras de INF-I son: MyD88 (vía IRF-7 con AP-1) y Trif (vía TAK1 con NF-kB, y la vía de IRF-3). Hay que tener en cuenta que de todos los TLR, el único que comparte ambas vías es el TLR4, en el cual ocurre primero la vía de MyD88 y posteriormente la de Trif (cuando se genera el endosoma) [28, 29]. En este trabajo, el silenciamiento de MyD88 disminuye considerablemente la expresión de IL-4 e IL-6 (mientras que no se modifica la de TGF- β).

El silenciamiento de Trif, no produjo una gran modificación en la expresión de IL-4. Sin embargo, en la IL-6 el silenciamiento de Trif y MyD88 logran disminuir su expresión relativa a niveles similares, lo cual nos hace considerar el hecho que la inducción de la expresión de IL-6 pudiera ser común para la vía de MyD88 y Trif. Otro hallazgo importante se observó en las células infectadas con RSV en las cuales al silenciarse Trif, aumentaron los niveles relativos de TGF- β con respecto a las células infectadas y no transfectadas. Por lo cual, es posible que la vía que activa IL-4 pudiera reprimir o antagonizar la expresión de TGF- β durante la infección por el RSV.

A pesar de que la cascada de señalización “río abajo” de MyD88 y Trif convergen en las moléculas TRAF6 y TAK1, la activación de ambas moléculas induce una expresión diferencial tanto en temporalidad, como en el tipo de citocinas inflamatorias expresadas [28]. En este estudio hemos detectado que la infección *in vitro* en macrófagos J774A.1 por el RSV genera un perfil tipo Th2. Sin embargo hay que ser cautos en esta aseveración, debido a las limitaciones de nuestro modelo.

En estudios previos se menciona que la vía de MyD88 induce la transcripción y producción de IL-6 [34, 48], en nuestro modelo, el silenciamiento de esta molécula adaptadora disminuyó parcialmente la expresión de IL-6 (al igual que durante el silenciamiento de Trif) y abolió casi por completo la

expresión de IL-4. Lo que sugiere que durante la infección *in vitro* por el RSV, la inducción de la expresión de IL-4 es dependiente de MyD88, la expresión de IL-6 pudiera ser dependiente tanto de MyD88 como de Trif, y que la expresión de TGF- β durante la infección esta siendo antagonizada por Trif o IL-4.

CONCLUSIONES.

Primero, el RSV es capaz de infectar *in vitro* a la línea celular de monocitos/macrófagos J774A.1, por lo cual se puede considerar como un modelo útil para el estudio de la infección por este virus.

Segundo, no pudimos verificar nuestra hipótesis dado que las células en las cuales realizamos nuestro estudio parecen no producir citocinas del tipo Th1.

Tercero, la señalización de los TLR en células J774A.1 a través de MyD88 o a través de Trif induce distintos patrones de citocinas, donde MyD88 parece favorecer la vía Th2

Cuarto, los macrófagos J774A.1 infectados por el RSV expresan el mensajero de IL-4 e IL-6, mientras que la inducción de TGF- β es mínima. Por lo cual El RSV parece inducir preferentemente la vía Th2 en células J774A.1.

Quinto, en células J774A.1 tanto MyD88 como Trif llevan, en forma independiente a la inducción de IL-6, lo cual podría explicar la pleiotropía de esta citocina.

Una limitación de este trabajo es que no se logró demostrar una disminución en los niveles de proteína de MyD88 y Trif, lo cual es importante ya que los niveles de expresión del mRNA no siempre equivale a la concentración al equilibrio de las proteínas de cuyos genes fueron silenciados.

Estos resultados preliminares podrían ser útiles para entender la patogenia del RSV y su propensión a desarrollar fenómenos tipo Th2. Lo anterior induce a pensar que un modelo de células presentadoras de antígenos, como son las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón, podrían ser un sistema más adecuado para evaluar la hipótesis propuesta. Sin embargo hay que reconocer que la transfección de cultivos primarios es mucho más difícil de lograr que con líneas celulares establecidas.

BIBLIOGRAFIA

1. Smit, J.J., B.D. Rudd, and N.W. Lukacs, *Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus*. J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1153-9.
2. Olson, M.R. and S.M. Varga, *Pulmonary immunity and immunopathology: lessons from respiratory syncytial virus*. Expert Rev Vaccines, 2008. **7**(8): p. 1239-55.
3. Smit, J.J., et al., *The balance between plasmacytoid DC versus conventional DC determines pulmonary immunity to virus infections*. PLoS One, 2008. **3**(3): p. e1720.
4. Gonzalez, P.A., et al., *Respiratory syncytial virus impairs T cell activation by preventing synapse assembly with dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 14999-5004.
5. Comas-Garcia, A., et al., *Mortality attributable to pandemic influenza A (H1N1) 2009 in San Luis Potosi, Mexico*. Influenza Other Respi Viruses, 2011. **5**(2): p. 76-82.
6. Glezen, W.P., et al., *Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus*. Am J Dis Child, 1986. **140**(6): p. 543-6.
7. Collins, P.L. and B.S. Graham, *Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis*. J Virol, 2008. **82**(5): p. 2040-55.
8. Lovato-Salas, F., et al., *Pandemic influenza A(H1N1) 2009 and respiratory syncytial virus associated hospitalizations*. J Infect, 2010. **61**(5): p. 382-90.
9. Noyola, D.E. and P.B. Mandeville, *Effect of climatological factors on respiratory syncytial virus epidemics*. Epidemiol Infect, 2008. **136**(10): p. 1328-32.
10. Bont, L. and J.L. Kimpen, *Immunological mechanisms of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis*. Intensive Care Med, 2002. **28**(5): p. 616-21.
11. Braciale, T.J., *Respiratory syncytial virus and T cells: interplay between the virus and the host adaptive immune system*. Proc Am Thorac Soc, 2005. **2**(2): p. 141-6.
12. Tripp, R.A., C. Oshansky, and R. Alvarez, *Cytokines and respiratory syncytial virus infection*. Proc Am Thorac Soc, 2005. **2**(2): p. 147-9.
13. Douville, R.N., et al., *Adult asthmatics display exaggerated IFN γ responses to human metapneumovirus and respiratory syncytial virus*. Biochem Cell Biol, 2007. **85**(2): p. 252-8.
14. Oshansky, C.M., et al., *The host response and molecular pathogenesis associated with respiratory syncytial virus infection*. Future Microbiol, 2009. **4**(3): p. 279-97.
15. Rudd, B.D., et al., *MyD88-mediated instructive signals in dendritic cells regulate pulmonary immune responses during respiratory virus infection*. J Immunol, 2007. **178**(9): p. 5820-7.
16. Oh, P.I., et al., *Palivizumab prophylaxis for respiratory syncytial virus in Canada: utilization and outcomes*. Pediatr Infect Dis J, 2002. **21**(6): p. 512-8.
17. Mejias, A. and O. Ramilo, *Review of palivizumab in the prophylaxis of respiratory syncytial virus (RSV) in high-risk infants*. Biologics, 2008. **2**(3): p. 433-9.
18. Simoes, E.A., et al., *A predictive model for respiratory syncytial virus (RSV) hospitalisation of premature infants born at 33-35 weeks of gestational age, based on data from the Spanish FLIP Study*. Respir Res, 2008. **9**: p. 78.
19. Bennett, B.L., et al., *Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis*. J Infect Dis, 2007. **195**(10): p. 1532-40.
20. Becker, Y., *Respiratory syncytial virus (RSV) evades the human adaptive immune system by skewing the Th1/Th2 cytokine balance toward increased levels of Th2 cytokines and IgE, markers of allergy--a review*. Virus Genes, 2006. **33**(2): p. 235-52.
21. Collins, P.L. and J.A. Melero, *Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years*. Virus Res, 2011. **162**(1-2): p. 80-99.
22. Tran, T.L., et al., *The nine C-terminal amino acids of the respiratory syncytial virus protein P are necessary and sufficient for binding to ribonucleoprotein complexes in which six*

- ribonucleotides are contacted per N protein protomer.* J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 1): p. 196-206.
23. Tran, T.L., et al., *The respiratory syncytial virus M2-1 protein forms tetramers and interacts with RNA and P in a competitive manner.* J Virol, 2009. **83**(13): p. 6363-74.
 24. Bossert, B., S. Marozin, and K.K. Conzelmann, *Nonstructural proteins NS1 and NS2 of bovine respiratory syncytial virus block activation of interferon regulatory factor 3.* J Virol, 2003. **77**(16): p. 8661-8.
 25. Ramaswamy, M., et al., *Specific inhibition of type I interferon signal transduction by respiratory syncytial virus.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **30**(6): p. 893-900.
 26. Guerrero-Plata, A., et al., *Differential response of dendritic cells to human metapneumovirus and respiratory syncytial virus.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. **34**(3): p. 320-9.
 27. Thompson, J.M. and A. Iwasaki, *Toll-like receptors regulation of viral infection and disease.* Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(7): p. 786-94.
 28. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.* Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
 29. Youn, H.S., et al., *Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR3 and TLR4 by resveratrol: molecular targets are TBK1 and RIP1 in TRIF complex.* J Immunol, 2005. **175**(5): p. 3339-46.
 30. Fitzgerald, K.A., et al., *LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF.* J Exp Med, 2003. **198**(7): p. 1043-55.
 31. Mitsuzawa, H., et al., *Recombinant soluble forms of extracellular TLR4 domain and MD-2 inhibit lipopolysaccharide binding on cell surface and dampen lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in mice.* J Immunol, 2006. **177**(11): p. 8133-9.
 32. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptor downstream signaling.* Arthritis Res Ther, 2005. **7**(1): p. 12-9.
 33. Sun, Y. and E. Pearlman, *Inhibition of corneal inflammation by the TLR4 antagonist Eritoran tetrasodium (E5564).* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(3): p. 1247-54.
 34. Kaiko, G.E., et al., *Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response?* Immunology, 2008. **123**(3): p. 326-38.
 35. Amsen, D., A. Antov, and R.A. Flavell, *The different faces of Notch in T-helper-cell differentiation.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(2): p. 116-24.
 36. Openshaw, P.J. and J.S. Tregoning, *Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection.* Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(3): p. 541-55.
 37. Lukens, M.V., et al., *Respiratory syncytial virus-induced activation and migration of respiratory dendritic cells and subsequent antigen presentation in the lung-draining lymph node.* J Virol, 2009. **83**(14): p. 7235-43.
 38. Wallet, M.A., P. Sen, and R. Tisch, *Immunoregulation of dendritic cells.* Clin Med Res, 2005. **3**(3): p. 166-75.
 39. Guerrero-Plata, A., et al., *Subversion of pulmonary dendritic cell function by paramyxovirus infections.* J Immunol, 2009. **182**(5): p. 3072-83.
 40. Kruijssen, D., et al., *Local innate and adaptive immune responses regulate inflammatory cell influx into the lungs after vaccination with formalin inactivated RSV.* Vaccine, 2011. **29**(15): p. 2730-41.
 41. Ii, M., et al., *A novel cyclohexene derivative, ethyl (6R)-6-[N-(2-Chloro-4-fluorophenyl)sulfamoyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242), selectively inhibits toll-like receptor 4-mediated cytokine production through suppression of intracellular signaling.* Mol Pharmacol, 2006. **69**(4): p. 1288-95.
 42. Monick, M.M., et al., *Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin.* J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 53035-44.
 43. Groskreutz, D.J., et al., *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): p. 1733-40.

44. ATCC. *J774 A.1 cell line*. 2012; Available from: <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=TIB-67&Template=cellBiology>.
45. Wilden, H., et al., *Expression of RIG-I, IRF3, IFN-beta and IRF7 determines resistance or susceptibility of cells to infection by Newcastle Disease Virus*. *Int J Oncol*, 2009. **34**(4): p. 971-82.
46. Schroder, K., et al., *Differential effects of CpG DNA on IFN-beta induction and STAT1 activation in murine macrophages versus dendritic cells: alternatively activated STAT1 negatively regulates TLR signaling in macrophages*. *J Immunol*, 2007. **179**(6): p. 3495-503.
47. Jin, M., et al., *Effects of chondroitin sulfate and its oligosaccharides on toll-like receptor-mediated IL-6 secretion by macrophage-like J774.1 cells*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011. **75**(7): p. 1283-9.
48. Amsen, D., C.G. Spilianakis, and R.A. Flavell, *How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made?* *Curr Opin Immunol*, 2009. **21**(2): p. 153-60.
49. Tayyari, F., et al., *Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus*. *Nat Med*, 2011. **17**(9): p. 1132-5.
50. Murawski, M.R., et al., *Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2*. *J Virol*, 2009. **83**(3): p. 1492-500.