



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**ESTUDIO DE PARÁMETROS
INMUNOLÓGICOS DURANTE LA
ENFERMEDAD RESPIRATORIA VIRAL
EN UNA POBLACIÓN INFANTIL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

JOSÉ LUIS HERNÁNDEZ CRUZ

ASESOR: DR. EN C. JULIO RAÚL SANTIAGO CRUZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.
2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
ASUNTO: **VOTO APROBATORIO**
SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **TESIS**

Estudio de parámetros inmunológicos durante la enfermedad respiratoria viral en una población infantil

Que presenta el pasante: **José Luis Hernández Cruz**
Con número de cuenta: **09013186-2** para obtener el Título de: **Químico Farmacéutico Biólogo**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de enero de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Eliseo Hernández Baumgarten	
VOCAL	Dr. Julio Raúl Santiago Cruz	
SECRETARIO	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
1er SUPLENTE	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
2do SUPLENTE	MVZ. Angel Germán Martínez Sosa	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

AGRADECIMIENTOS OFICIALES

Quiero expresar mi agradecimiento a la UNAM y particularmente a la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán por darme la oportunidad de realizar una carrera.

Al Ph. D. Luis Manuel Terán Juárez por su apoyo a lo largo del trabajo, y al Laboratorio de Inmunoalergia y Asma, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, donde se realizaron los experimentos de este trabajo.

Al M.C. Antonio Popoca Cóyotl por la revisión y sus comentarios.

A los Técnicos Cesar Luis Rentería Rosales y Felipe Fuentes Arenas que tomaron las muestras usadas en este estudio.

Al M.C. José Luis Ramírez y Tinajero por el apoyo con el diagnóstico clínico de los casos de enfermedad respiratoria.

A la QFB Rosalía Montes Vizuet por la asesoría en la cromatografía líquida de alta presión.

A la QFB Elba Valencia Maqueda por su amable orientación durante las pruebas de Elisa.

A la Bióloga Anita Vega Miranda y al QC Eliseo Bibiano, por la asesoría en el trabajo de laboratorio.

Este trabajo se realizó con presupuesto del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y con apoyo de CONACYT (SEP 2003 CO2-45172).

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Quiero agradecer muy especialmente y con mucho amor y cariño a mi esposa Fanny, parte esencial en mi vida y a mi hijo Ernesto Isaac, por darme el motivo de superación. Agradezco a mis padres Angelina y Aquileo por su apoyo incondicional, a mis hermanos Lupe, Mini, Mauricio y Rosa por estar conmigo siempre. A mis parientes Josefa y Mateo. A mis primos Ángel, Carlos, Paty, Isra, Adán y Silvia por ser parte de mi familia. A mis amigos Javier, Isra, Moy y Toño por ser incondicionales. A mis amigas Ana Laura, Rocío y Tania por demostrarme el valor del trabajo. Al *Master* Julio Raúl, porque sin él no hubiera sido posible concluir este trabajo, a mis compañeros Felipe y Cesar por su apoyo incondicional y al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, en especial al Laboratorio de Inmunoalergia y Asma, y en particular al Ph. D. Luis Manuel Terán Juárez, por el apoyo y la oportunidad que me brindaron para hacer este trabajo.

Gracias a todos

ÍNDICE DE CONTENIDO

I Introducción.....	1
1. Importancia de las infecciones respiratorias agudas.....	1
2 Virus que causan enfermedad respiratoria aguda.....	2
2.1 Virus de la influenza.....	2
2.2 Virus de parainfluenza.....	4
2.3 Adenovirus.....	5
2.4. Virus sincitial respiratorio.....	7
2.5 Rinovirus.....	8
2.6 Coronavirus y otros virus emergentes.....	10
3 Infección Viral en vías respiratorias.....	11
3.1 Vías respiratorias altas.....	11
3.2 Vías respiratorias bajas.....	12
4 Mecanismos de inflamación e inmunidad innata.....	14
5 Los neutrófilos.....	15
5.1 Características del neutrófilo.....	15
5.2 Adherencia y marginación de los neutrófilos.....	17
5.3 Diapédesis del neutrófilo.....	18
5.4 fagocitosis por el neutrófilo.....	19
6 Quimiotaxis.....	20
6.1 Quimiocinas y su clasificación.....	21
6.2 Quimiocinas CXC e IL-8.....	23
II Antecedentes.....	24
III Justificación.....	26
IV Objetivos.....	26
1.1 Objetivo General.....	26
1.2 Objetivos específicos.....	26
V Hipótesis.....	27
VI Material y métodos.....	27
1. Grupo de estudio.....	27
2. Toma de muestra.....	28
3. Procesamiento de la muestra.....	28
4. Conteo diferencial.....	29
5. Inmunofluorescencia.....	29
6. Aislamiento viral.....	30
7. RT-PCR.....	30
8. Separación de factores quimiotácticos por HPLC.....	32
9. Elisa.....	32
10. Ensayo de quimiotaxis.....	33
11. Análisis estadístico.....	35
VII Resultados.....	35
1 Inmunofluorescencia.....	35
2 Aislamiento viral.....	36
3 RT-PCR.....	36
4 Diagnóstico viral.....	37
5 Síntomas.....	38
6 Conteo diferencial.....	39

7	Identificación de los factores quimiotácticos de neutrófilos en secreciones respiratorias de niños con infección viral.....	41
8	Niveles de quimiocinas durante la infección viral respiratoria.....	42
9	Correlación entre niveles de quimiocinas y cantidad de neutrófilos en secreción nasal.....	44
VIII	Discusión.....	45
IX	Conclusiones.....	48
X	Bibliografía.....	50
XI	Apéndice.	
	Carta de consentimiento informado.....	63

ÍNDICE DE TABLAS (IDEM.)

Tabla 1. Número de células en muestras de aspirados nasales de niños con infección viral respiratoria.....	40
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS (IDEM.)

Figura 1 Frecuencia de infecciones respiratorias agudas por grupos de edad en México.....	1
Figura 2. Estructura del virus de la influenza.....	3
Figura 3. Estructura de los virus de parainfluenza.....	5
Figura 4. Estructura de los adenovirus.....	6
Figura 5. Estructura del virus sincitial respiratorio.....	7
Figura 6. Estructura de los rinovirus.....	8
Figura 7. Coronavirus, metapneumovirus humano y bocavirus.....	10
Figura 8. Aparato respiratorio alto y bajo.....	11
Figura 9. Mecanismos de inflamación en la mucosa respiratoria durante la infección viral..	13
Figura 10. Aspectos de un neutrófilo.....	16
Figura 11. Receptores celulares que participan en la migración transepitelial del neutrófilo.	17
Figura 12. Diapédesis de neutrófilos.....	19
Figura 13. Mecanismo de la fagocitosis por neutrófilos.....	20
Figura 14. Quimiotaxis del neutrófilo.....	21
Figura 15. Clasificación de las quimiocinas.....	22
Figura 16. Estructura de las quimiocinas CXC.....	24
Figura 17. Toma de muestra mediante trampa de vacío en medio de transporte viral.....	28
Figura 18. Esquema del ELISA.....	33
Figura 19. Purificación de neutrófilos.....	34
Figura 20. Inmunofluorescencia para el diagnóstico viral.....	35
Figura 21. Aislamiento de virus en cultivo de células.....	36
Figura 22. Electroferograma de una PCR para detección de rinovirus.....	37
Figura 23. Frecuencia de virus detectados en 30 muestras clínicas de niños con infección respiratoria.....	37
Figura 24. Porcentajes de infecciones virales detectadas en los niños de acuerdo con el género y con la edad.....	38
Figura 25. Síntomas presentados por una cohorte de niños escolares con enfermedad respiratoria viral.....	39
Figura 26. Reclutamiento de neutrófilos en secreción nasal de niños con infección respiratoria.....	40
Figura 27. Porcentajes de células en muestras de aspirados nasales de niños con infección viral respiratoria.....	41
Figura 28. Quimiotaxis e inmunorreactividad de las fracciones de cromatografía líquida de alta presión.....	42
Figura 29. Niveles de IL-8 en sobrenadantes de aspirados nasales de niños con infección viral respiratoria.....	43
Figura 30. Niveles de ENA-78 en sobrenadantes de aspirados nasales de niños con infección viral respiratoria.....	43
Figura 31. Niveles de GRO-alfa en sobrenadantes de aspirados nasales de niños con infección viral respiratoria.....	44
Figura 32. Correlación entre los niveles de IL-8 y la cantidad de neutrófilos en muestras de aspirados nasales de niños con infección viral respiratoria.....	44
Figura 33. Correlación entre ENA-78 y cuenta de neutrófilos.....	45
Figura 34 Correlación entre GRO-alfa y cuenta de neutrófilos.....	45

ABREVIATURAS

ACE. enzima convertidora de angiotensina.
AN. aspirado nasal.
arg. aminoácido arginina.
ARN. ácido ribonucleico.
BSA. albúmina sérica bovina.
CAR. receptor de adenovirus y coxsackievirus.
CD. cúmulo de diferenciación.
CXCR, receptor de quimiocina tipo CXC.
DAF. factor acelerador del decaimiento.
DNA. ácido desoxirribonucleico.
dNTPs, trifosfatos de desoxirribonucleótidos.
ELISA. *análisis inmunoabsorbente (linked) enzimático*.
ENA. proteína derivada del epitelio y activadora de neutrófilos.
EPOC. enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
ERV. enfermedad respiratoria viral.
Fc. fracción constante.
FcγRIIa. Receptor IIa de la fracción cristalizable de inmunoglobulinas G.
FcγRIIb. Receptor IIb de la fracción cristalizable de inmunoglobulinas G.
Fig. figura.
fMLP. fenilmetionil-leucil-fenilalanina.
GCP. proteína quimiotáctica para granulocitos.
glu. aminoácido glutamina.
GM-CSF. factor estimulante de colonias granulocito-macrófago.
GRO. oncogén regulado por el crecimiento.
HA. hemaglutinina.
HMPV. metapneumovirus humano.
HPLC. cromatografía líquida de alta precisión.
ICAM. molécula de adhesión intercelular
IFA. inmunofluorescencia.
IFN. interferón.
Ig. Inmunoglobulina.
IL. Interleucina.
INER. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.
IRA. infección respiratoria aguda.
ITAM. motivos activados de manera inmune a través de tirosina.
IVR. infección viral respiratoria.
JAM. molécula de adhesión de uniones.
kDa. kilodaltones.
LDL. lipoproteína de baja densidad.
leu. aminoácido leucina.
LFA. antígeno asociado a función de linfocitos.
LPS. lipopolisacárido.
MAC. antígeno de macrófago.
MEM. medio esencial mínimo.
mRNA. ácido ribonucleico tipo mensajero.
NA. neuraminidasa.
NADPH. nicotinamilo adenín dinucleótido fosfato.

NK. célula asesina natural.
PAF. factor activador de plaquetas.
PBS. buffer salino de fosfatos (*phosphate buffer saline*).
PCR. reacción de polimerasa en cadena.
PECAM. molécula de adhesión plaquetaria a célula endotelial.
PMN. fagocitos polimorfonucleados.
RAGE. receptor de productos finales de glicación.
ROS. especie reactiva de oxígeno.
RPM. revoluciones por minuto.
RPMI. medio Rosewell Park Memorial Institute.
RSV. virus sincitial respiratorio.
RT. retrotranscripción.
RT-PCR. retrotranscripción en secuencia con una reacción en cadena de polimerasa.
SARS. síndrome respiratorio agudo severo.
SFB. suero fetal bovino.
SINAIS. Sistema Nacional de Información en Salud.
SINAVE. Sistema nacional de vigilancia epidemiológica.
SPSS. paquete estadístico para las ciencias sociales.
TA. temperatura ambiente.
TBE. amortiguador de tris borato EDTA.
TNF. factor de necrosis tumoral.
VCAM. proteína de adhesión celular vascular.
VLA. antígeno de expresión tardío.
VP. proteínas virales.
WHO. World Health Organization.

RESUMEN

Antecedentes: Los neutrófilos desempeñan funciones claves como primera línea de defensa durante la respuesta inflamatoria, además son esenciales para el desarrollo de la respuesta adaptativa. Sin embargo, los mecanismos moleculares mediante los cuales estas células son reclutadas al tejido respiratorio durante una infección viral respiratoria no han sido bien estudiados. **Objetivos:** El objetivo principal de este trabajo fue estudiar el reclutamiento de neutrófilos y las quimiocinas que los reclutan, durante la infección viral respiratoria en el modelo natural de la infección. **Métodos:** Se realizó seguimiento durante un año a una cohorte de 45 niños escolares de 6 a 12 años de edad. Cuando presentaron síntomas respiratorios se tomó una muestra de aspirado nasal dentro de las primeras 24 hrs, la cual se llevó de inmediato al laboratorio para su estudio. Los virus causantes del cuadro se detectaron por aislamiento viral, inmunofluorescencia y retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa. Con las muestras se realizaron frotis y se tiñeron con Giemsa para contar las proporciones de células reclutadas en la secreción nasal. Las proteínas en los sobrenadantes de las muestras se separaron y cuantificaron por cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC) en fase reversa, a las fracciones se les realizó ensayos de quimiotaxis *in vitro*, y ensayos inmunoabsorbentes enzimáticos (ELISA) con anticuerpos específicos para detección de quimiocinas. **Resultados** De 60 cuadros respiratorios estudiados 30 presentaron infección viral; los virus detectados fueron los siguientes: 8 rinovirus, 6 virus de influenza A (estacional), 5 de parainfluenza, 5 virus sincitiales respiratorios, 3 de influenza B y 3 adenovirus. Los síntomas más comunes fueron síntomas de vías respiratorias altas, enseguida estuvieron los sistémicos, fiebre y malestar general, y los síntomas de vías respiratorias bajas fueron más raros. Las células reclutadas en la mucosa nasal durante la infección viral respiratoria fueron principalmente neutrófilos (82 %), seguidos de macrófagos (12 %) y linfocitos (5 %). Por HPLC se detectaron 8 picos de actividad quimiotáctica para neutrófilos en una mezcla de 20 muestras tomadas al azar, 3 picos correspondieron a las quimiocinas IL-8 (interleucina-8), ENA-78 (péptido activador de neutrófilos derivado de epitelio) y GRO- α (oncogén regulador del crecimiento alfa). También se observó que los niveles de estas quimiocinas se elevaron ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis) durante la infección respiratoria viral al comparar las muestras clínicas con muestras controles tomadas a los mismos niños en un periodo asintomático, además dichos niveles presentaron correlación estadística ($p < 0.05$, regresión lineal simple) con la cantidad de neutrófilos observada en las muestras. **Conclusiones.** Estos datos indican que las quimiocinas IL-8, ENA-78 y GRO- α tienen una función importante en el reclutamiento de los neutrófilos durante la infección viral respiratoria de niños. Estos resultados abren nuevas opciones en el tratamiento de las infecciones virales a través de la inmunomodulación de la respuesta del hospedero.

Palabras clave: patogénesis viral, inmunidad innata, neutrófilos, quimiocinas, péptido activador de neutrófilos derivado de epitelio 78, oncogén regulador del crecimiento alfa, interleucina 8.

ABSTRACT

Background: Neutrophils have critical roles as first defense line during immune response; in addition they are essential for developing adaptive immune responses. However, molecular mechanisms of neutrophil recruitment to respiratory tissues during respiratory viral infection have been not clarified. **Purpose:** Main purpose was to study neutrophil recruitment and chemokines recruiting neutrophils during a respiratory viral infection in the natural model system. **Methods:** A one-year following of a cohort of 45 children aged from 6 to 12 years old was made. When a child presented respiratory symptoms a nasal aspirate was taken during the first 24 hrs, and immediately transported to laboratory. Virus causing illness were detected by viral isolation, immunofluorescence, and retrotranscription coupled to polymerase chain reaction. Sample microaliquots were extended onto slides and stained with Giemsa in order to count cells recruited into nasal secretion. Sample supernatant proteins were separated and quantified by reversed phase high performance liquid chromatography (HPLC), and fractions were subjected to chemotaxis *in vitro* assays and enzyme-linked immunosorbent assays with specific antibodies to detect chemokines. **Results:** From 60 respiratory episodes, 30 presented viral infection, and detected viruses were as follows: 8 rhinovirus, 6 influenza A viruses (epidemic), 5 parainfluenza viruses, 5 respiratory syncytial viruses, 3 influenza B viruses, and 3 adenoviruses. Predominant symptoms were upper respiratory, in second place systemic, fever, and malaise; and lower respiratory symptoms were uncommon. Recruited cells into nasal mucosa during respiratory viral infection were mostly neutrophils (82%), followed by macrophages (12%), and lymphocytes (5%). By HPLC 8 peaks of chemotactical neutrophil activity were detected in a pool of 20 samples randomly taken, from these peaks 3 corresponded to IL-8 (interleukine 8), ENA (epithelium derived neutrophil activator peptide)-78 and GRO α (growth regulating oncogen alpha) chemokines. Levels of these chemokines in nasal aspirates were elevated ($p < 0.05$) during respiratory viral infection compared to control samples taken from same children at an asymptomatic period, chemokine sample levels showed significant correlation ($p < 0.05$) with neutrophil nasal numbers. **Conclusions:** These data indicate that chemokines IL-8, ENA-78, and GRO- α are responsible at least in part of neutrophil recruitment during respiratory viral infection in children. These results open new approaches for treatment of respiratory viral infections by immunomodulating the host response.

Key words: viral pathogenesis, innate immunity, neutrophils, chemokines, epithelium derived neutrophil activator peptide 78, growth regulating oncogen alpha, interleukin 8.

I. INTRODUCCIÓN

1. Importancia de las infecciones respiratorias agudas

Las infecciones respiratorias agudas tienen las mayores tasas de morbilidad y mortalidad en niños en todo el mundo, y tienen un alto impacto en relación con las horas de trabajo y de clases perdidas, así que las pérdidas en vidas y económicas a nivel mundial son enormes (Feigin y Cherry 2004, Miedema *et al.* 2001, WHO 2008). En México las infecciones respiratorias agudas (IRA) también son causa importante de mortalidad y morbilidad en niños, y el grupo de edad más vulnerable son los menores de 5 años (Fig. 1). En nuestro país, las IRA ocupan el primer lugar dentro de las 20 principales causas de morbilidad transmisible en el país con 3,217,059 casos notificados en el año 2009. Afecta por igual a hombres y mujeres, siendo más vulnerables los grupos de 0 a 4 años de edad. El nivel socioeconómico, la escolaridad de los padres, las condiciones de vida en las viviendas, el hacinamiento, la contaminación ambiental y el hábito de fumar de los convivientes, son factores de riesgo para IRA. En México, no hay programas integrales de detección y no se le da la importancia adecuada para su prevención, de otro modo se disminuiría de manera importante la frecuencia de dichos padecimientos (Sinave 2010, Wong-Chew *et al.* 2010).

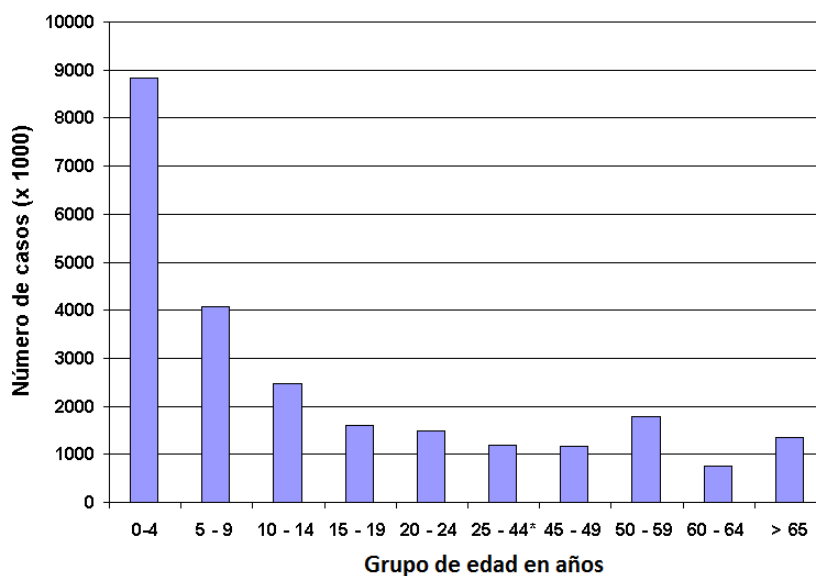


Figura 1. Frecuencia de infecciones respiratorias agudas por grupos de edad en México. *Los cuatro grupos que están incluidos en el rango de 25 a 44 años tienen aproximadamente una tasa de morbilidad similar a la graficada (Sinave 2010).

2. Virus que causan enfermedad respiratoria aguda

Todas las clases de organismos infecciosos son capaces de infectar el tracto respiratorio, pero los virus y las bacterias son las causas más comunes de infección y, en los lugares donde se han hecho estudios comparativos, los virus son los principales causantes de infección respiratoria (Feikin *et al.* 2012). Los virus que destacan como causantes de enfermedad respiratoria viral (ERV) son los virus de la influenza A y B, los virus de parainfluenza 1, 2 y 3, los adenovirus respiratorios (más de 47 serotipos) (hay dos serotipos que son gastrointestinales), el virus sincitial respiratorio, los rinovirus (más de 100 serotipos), los coronavirus (4 serotipos comunes, OC43, E229, NL63 y HKU1) (Pyrce *et al.* 2007), y los virus emergentes de reciente descubrimiento como el metapneumovirus humano y los bocavirus (van den Hoogen *et al.* 2001, Allander *et al.* 2005), que también han resultado frecuentes donde se han estudiado. Otro virus que causó gran preocupación en 2003 fue el coronavirus de origen animal que causó el brote controlado del SARS (síndrome respiratorio agudo severo) (Drosten *et al.* 2003). En particular el virus sincitial respiratorio es el principal causante de neumonías y junto con los virus de influenza y parainfluenza se presenta en una gran proporción de niños hospitalizados a causa de enfermedad respiratoria de la vía inferior. Por otra parte, los rinovirus son los principales causantes de los resfriados comunes y de los cuadros de tipo influenza (Hammit *et al.* 2012, Mermond *et al.* 2012, Adegbola 2012, Levine *et al.* 2012, Winther 2011, Proud 2008).

2.1 Virus de la influenza

Los virus de la influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*, y son virus que presentan 7 u 8 moléculas de RNA de cadena negativa, que se empacan en nucleocápsides helicoidales, las cuales están envueltas por una bicapa de lípidos que el virus toma de la célula que infecta, así que se dice que estos virus están envueltos (Fig. 2a). Presentan sobre la superficie de su envoltura dos glucoproteínas, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) (Fig. 2b), las cuales son responsables de la unión a las células y son útiles para la clasificación de los aislamientos. Estos virus como su nombre indica son los responsables de la influenza o gripe, una afección respiratoria aguda que también se asocia con síntomas generales, la enfermedad se produce por la destrucción de las células que recubren el tracto respiratorio y por el proceso inflamatorio desencadenado (White y Fenner 1994), aunque se

desconocen los detalles de las interacciones moleculares entre la célula hospedera, las células del sistema inmunitario y el virus.

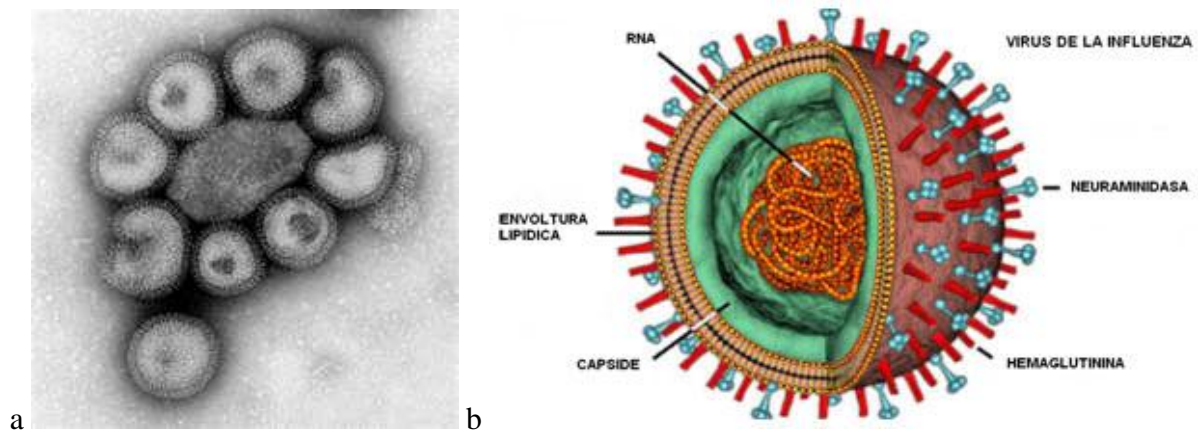


Figura 2. Estructura del virus de la influenza. a) Micrografía electrónica del virus. El virus es pleomórfico de aprox. 200 nm de diámetro y en la micrografía se aprecia el halo que forman las glucoproteínas virales en la superficie (Rangel 2012). b) Estructura del virus. En el esquema se indican el genoma (RNA) y las glucoproteínas virales (Gefor 2012).

El virus entra en la nasofaringe y mediante la HA penetra en las células susceptibles, cuyas membranas contienen receptores mucoproteicos específicos que contienen ácido siálico. El virus tiene que evadir en primer lugar a las secreciones respiratorias, y aunque estas contienen mucoproteínas que podrían atrapar e inhibir al virus, la infección no se bloquea porque la neuraminidasa vírica hidroliza las mucoproteínas, volviéndolas ineficaces (Wagner 2002). Una vez unido el virus a la célula, es internalizado por endocitosis mediada por receptores, dentro de la célula el cambio en el pH dentro de la vacuola endocítica, provoca la fusión de la membrana viral con la membrana vacuolar, de esta manera el RNA viral y las proteínas accesorias son liberadas en el citoplasma, el RNA es llevado al núcleo y se replica en él, produce mRNA y las proteínas virales se sintetizan en el retículo endoplásmico. Finalmente la descendencia viral se ensambla en el citoplasma y se libera fuera de la célula por gemación con lo cual el virus se propaga a otras células (Bouvier y Palese 2008).

Durante el periodo agudo de la enfermedad las células epiteliales ciliadas de la vía respiratoria superior son las primeras afectadas. La multiplicación del virus va seguida por la necrosis de las células infectadas y una extensa descamación del epitelio respiratorio, se cree que esto junto con la inflamación inducida es responsable de los signos y síntomas respiratorios de la infección aguda. La influenza es al principio una enfermedad sin complicaciones, los síntomas generales pueden ser fiebre, escalofríos, molestias generalizadas

(especialmente musculares), cefalea, postración y anorexia. Las principales complicaciones son pulmonares como la neumonía, y las exacerbaciones de enfermedad pulmonar crónica, (EPOC) y asma, así como aquellas relacionadas con la infección de individuos en un estado particular de inmunocompetencia o debilitante como lo son el niño pequeño y el prematuro, el adulto de la tercera edad, la mujer embarazada y pacientes inmunocomprometidos, con cáncer o con diabetes (Eccles 2005, Zimmerman y Middleton 2007, Meier *et al.* 2000). Todo esto debido posiblemente a mecanismos de inflamación que se expresan de manera inadecuada o se encuentran desregulados.

2.2 Virus de parainfluenza

Los virus de la parainfluenza pertenecen a la familia *Paramyxoviridae*, son virus envueltos con RNA de una cadena con sentido negativo (Fig. 3a). Presentan en su membrana dos glucoproteínas fundamentales para la infección, la HN, hemaglutinina-neuraminidasa, y la F, la proteína de fusión (Fig. 3). El primer paso en el ciclo de infección es la unión de las partículas virales a los receptores celulares, este proceso está mediado por la HN. La proteína F cataliza la subsecuente fusión de la envoltura viral con la membrana celular, así la nucleocápside es liberada en el citoplasma. Enseguida el RNA viral es replicado en el núcleo y las glucoproteínas son procesadas y transportadas del aparato de Golgi a la membrana plasmática donde los viriones hijos son armados y liberados por gemación (Vainionpää e Hyypiä 1994).

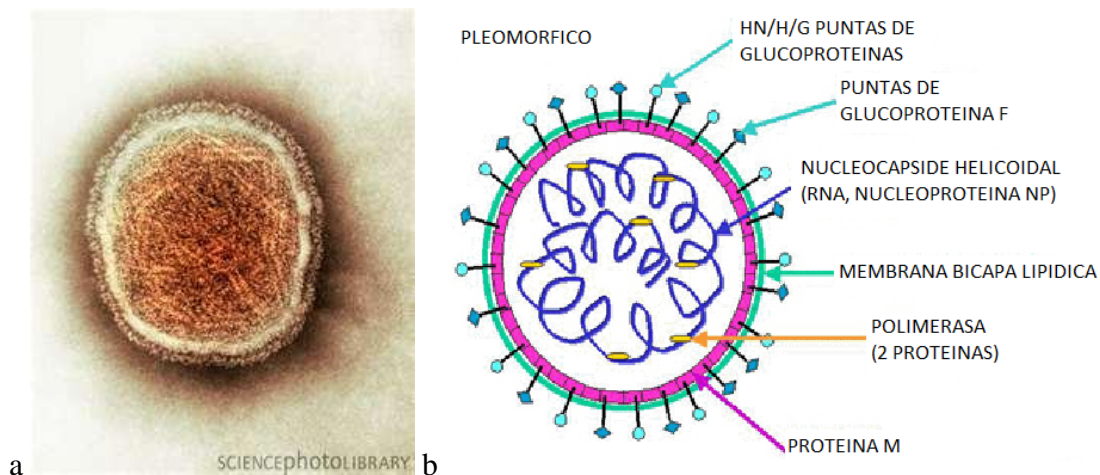


Figura 3. Estructura de los virus de parainfluenza. a) Micrografía electrónica de transmisión de un virus de parainfluenza humana. La banda que atraviesa numerosas veces el interior del virus es la cápside o cubierta de proteínas, dentro de la cápside se encuentra el RNA en espiral, rodeando esto se encuentra la envoltura de lípidos que presenta un halo de glucoproteínas (Science Photo Library 2012). b) Esquema que muestra los componentes del virus de la parainfluenza (University of South Carolina 2010).

La infección del virus ocurre a través de la superficie de la mucosa nasal y el primer síntoma es la rinorrea, seguido de tos y dolor de garganta, puede presentarse fiebre y malestar general, el curso de la enfermedad va de 3 a 4 días pero en niños puede presentarse complicación al pasar el virus al tracto respiratorio bajo, probablemente por aspiración de secreciones, provocando crup, bronquiolitis o neumonía (White y Fenner 1994), de manera incidental estas complicaciones del aparato respiratorio son de naturaleza inflamatoria.

2.3 Adenovirus

Los adenovirus son virus de DNA de doble cadena y sin envoltura, su cápside presenta simetría icosaédrica (Fig. 4a). La cápside está formada por 240 capsómeros de forma hexagonal llamados hexones, y 12 de forma pentagonal, llamados pentones, los pentones presentan una fibra. El virus se une a la célula hospedera a través de su hemaglutinina que en este caso es la fibra del pentón, un filamento asociado con las base del pentón de la cápside (Fig. 4b). Cada fibra contiene una perilla la cual se va a unir al receptor en la célula, el receptor es la molécula CD46 para los serotipos del subgrupo B y el receptor de adenovirus y coxsackievirus (CAR) para la mayoría de los demás serotipos. A continuación, se produce una interacción secundaria, en la cual un punto en la proteína de la base del pentón interactúa con una molécula de integrina. La unión a la integrina αv estimula la señalización celular e induce la polimerización de actina dando lugar a la introducción del virión en la célula hospedera a través de un endosoma. Es decir, el virus entra por endocitosis y luego la cápside entra casi completa al citoplasma, aunque se desconoce el mecanismo preciso (Smith *et al.* 2010).

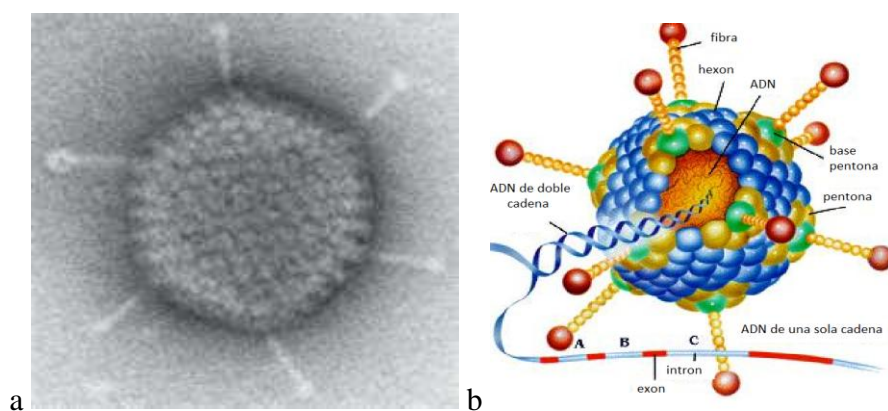


Figura 4. Estructura de los adenovirus. a) Micrografía electrónica de un adenovirus (Racaniello 2009). b) Principales estructuras de un adenovirus (Enciclopedia Médica en Línea 2012).

Con la ayuda de los microtúbulos celulares, el virus es transportado al complejo de poros nucleares en donde la partícula de adenovirus se acaba de desensamblar, con lo cual el ADN viral es liberado y entra en el núcleo a través del poro nuclear. Después de esto, el ADN se asocia con las moléculas de histona, se expresan los genes virales y se generan nuevas partículas virales. Finalmente el virus usa la maquinaria celular para producir cantidades suficientes de proteínas estructurales para empaquetar el material genético producido por la replicación del ADN. Una vez que los componentes virales han sido replicados, las partículas de virus son ensambladas y se liberan de la célula como consecuencia de la lisis celular inducida (Meier 2004).

Los adenovirus son transmitidos por contacto directo, por vía fecal-oral (los serotipos entéricos) o por inhalación. Estos virus tienen especial predilección por las células epiteliales, afectando a casi todas las mucosas. La infección se puede acompañar de tos, congestión nasal, fiebre y dolor de garganta, y se resuelve generalmente en 6 días, rara vez es mortal (White 1994).

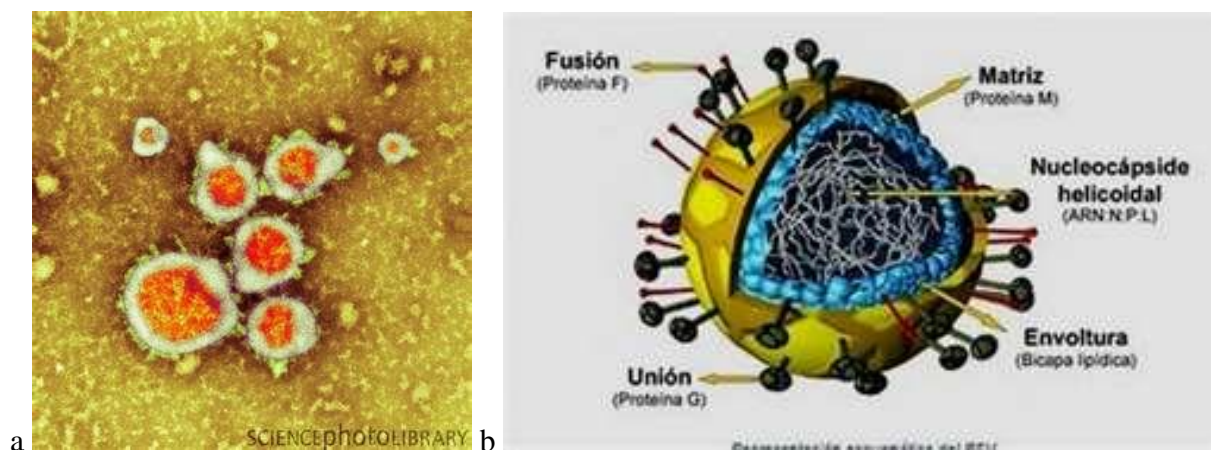


Figura 5. Estructura del virus sincitial respiratorio. a) Micrografía electrónica de transmisión del virus la cual ha sido coloreada de manera artificial para resaltar sus estructuras. Cada virión está compuesto por RNA encerrado en una cubierta proteínica o cápside (anaranjada), dentro de una envoltura de fosfolípidos (de color amarillo claro). La envoltura está cubierta por clavos de proteínas (verdes), las cuales capacitan al virus para entrar en la célula. Este virus es el más importante agente causal de bronquiolitis y neumonías en niños pequeños (Science Photo Library 2012). b) Esquema del virus mostrando sus principales estructuras (Castilla 2011).

2.4. Virus sincitial respiratorio

El virus sincitial respiratorio (RSV) es un virus de la familia *Paramyxoviridae*, es un virus envuelto, tiene un genoma de RNA de una sola cadena, con sentido negativo (Fig. 5a).

Al igual que el virus de la parainfluenza, el RSV contiene en la superficie de su membrana una proteína de fusión F, además de una glicoproteína principal de adherencia llamada G (Fig. 5b). Al ser de la familia de los paramixovirus el RSV tiene mecanismos similares de infección que el virus de parainfluenza, por ejemplo, la proteína F es la responsable de la fusión de membranas celulares y la consecuente aparición de sincitios o células gigantes multinucleadas (Smith et al. 2009).

La infección con RSV requiere de un contacto cercano con una persona que padece la infección, o con superficies que han estado en contacto con secreciones de personas infectadas durante algunas horas. Las rutas de entrada al cuerpo son primero los ojos y luego la nariz a través de aerosoles o contacto con las manos, el periodo de incubación va de los 4 a los 6 días. La infección ocurre primeramente en las vías respiratorias altas, en las células superficiales del epitelio respiratorio. Las células ciliadas de los bronquiolos, y los neumocitos tipo I de los alvéolos son los blancos principales del RSV. En seguida, se presenta necrosis de células epiteliales y un intenso reclutamiento principalmente de macrófagos, aunque también se presentan linfocitos T y neutrófilos en la zona afectada, la infección y el tejido dañado suelen aumentar la respuesta inmunitaria mediante la liberación de mediadores inflamatorios. Las células epiteliales dañadas, la secreción de moco y la acumulación de células inmunitarias suelen obstruir las vías aéreas, provocando estenosis bronquial de las mismas. Entre los principales síntomas se encuentran rinorrea, tos, dolor de garganta, fiebre, dolor de cabeza, y malestar general, y la enfermedad ocasionada puede variar de una simple resfriado común a la forma grave, neumonía o bronquiolitis. De hecho, este virus es la causa principal de bronquiolitis severa en niños pequeños a escala mundial, y representa un problema mayor en la tercera edad y personas inmunocomprometidas (Collins 2008).

2.5 Rinovirus

Los rinovirus son virus no envueltos de la familia *Picornaviridae*, y miden aproximadamente 30 nm. de diámetro (Fig. 6a). Presentan simetría icosaédrica (Fig. 6b). Estos virus contienen RNA de una sola cadena con sentido positivo. La cápside está formada por 60 copias de cada una de 4 proteínas virales (VP), de las cuales 3 se encuentran en la superficie: VP1, VP2 y VP3 (Fig. 6c); éstas son las responsables de que el virus se una a las células del epitelio respiratorio a través del receptor ICAM 1 y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL). VP4 se encuentra dentro de la cápside. Una vez enlazado, el virus penetra en la célula por endocitosis y a través de un poro en la membrana endosómica libera

su genoma en el citoplasma, para su replicación y posterior liberación (Kelly y Busse 2008, Rossman 1994).

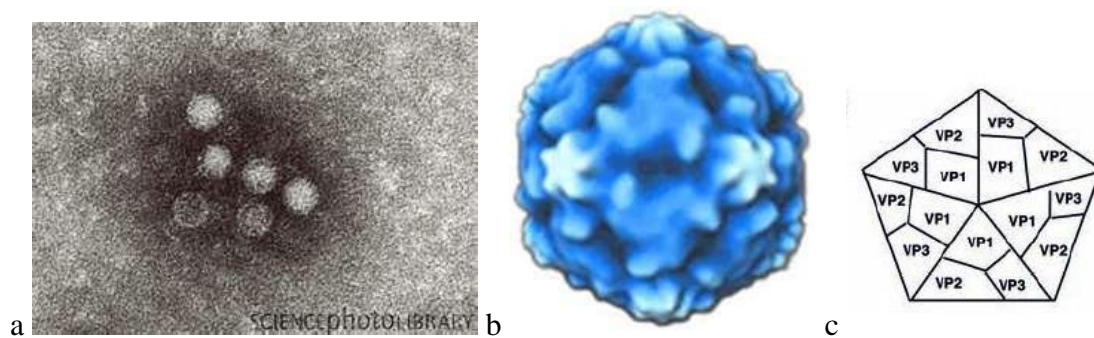


Figura 6. Estructura de los rinovirus. Los rinovirus constituyen la causa más común de infección en el ser humano y la razón más común de prescripción de antibióticos (Covington *et al.* 2004). a) Micrografía electrónica de transmisión de un rinovirus (Science Photo Library 2012). Las partículas virales miden alrededor de 30 nm de diámetro y presentan un aspecto de icosaedro. b) Imagen holográfica de un rinovirus, en la cual es evidente un patrón superpuesto entre un icosaedro (centrado en el eje de simetría trirradial) y un dodecaedro (simetría pentarradial). c) Esquema de la disposición de las proteínas VP1, VP2 y VP3 en la cápside, la imagen está centrada en el eje pentarradial. (b y c provienen de Dreschers *et al.* 2007.)

El rinovirus infecta principalmente el epitelio nasal, ya que su temperatura (de 33 a 35 °C) es óptima para su proliferación, solo las células epiteliales externas permiten la multiplicación del virus con poca citopatología, algunas son lesionadas y descamadas en el moco, las células más profundas no son afectadas. Los principales síntomas de la infección por rinovirus son rinorrea, congestión nasal dolor de cabeza, dolor de garganta y tos, y se cree que son causados principalmente por la respuesta del hospedero (White 1994, Pitkäranta. 2003). El virus también puede infectar las vías aéreas bajas provocando bronquitis en niños, la infección con rinovirus contribuye con el desarrollo de sinusitis y otitis media y ha sido identificado como una importante causa de exacerbaciones de asma en niños y un factor importante en el desarrollo de alergias (Gern 1999, Biagioli 1999, Papadopoulos 2000).

Se ha observado una importante infiltración de leucocitos polimorfonucleados (PMN) y mononucleados en las secreciones nasales de humanos infectados con el virus pero no así en infectados asintomáticos (Pitkäranta 2003), esto indica que la respuesta inflamatoria del hospedero tiene mucho que ver con la patogénesis del resfriado común. La IL-1 (interleucina 1 β), la IL-6 y la IL-8 se han encontrado aumentadas en las secreciones nasales de pacientes sintomáticos con resfriado por rinovirus, de estas citocinas la IL-8 es un importante factor quimiotáctico para neutrófilos (Kelly y Busse 2008, Terán *et al.* 1997, Zhu 1997). Además existe una correlación directa entre la severidad de la obstrucción nasal, rinorrea y los

síntomas totales con la concentración de IL-8 en las secreciones nasales (Papadopoulos 2000). Estos datos sugieren que la respuesta de la célula hospedera a la infección por rinovirus puede tener una función importante en el desarrollo de los síntomas del resfriado común (Kelly y Busse 2008, Turner 1990).

2.6 Coronavirus y otros virus emergentes

Los coronavirus son virus envueltos de la familia *Coronaviridae*, con RNA de cadena sencilla de sentido positivo. La partícula viral presenta en su superficie dos glicoproteínas E1 y E2 (Fig. 7a). El coronavirus se une a la célula mediante un receptor de membrana denominado ACE 2 (enzima convertidora de angiotensina 2), y es internalizado por endocitosis (Jiang, Korteweg 2007). El virus se replica en el citoplasma y luego es liberado por exocitosis. El virus infecta el epitelio del tracto respiratorio alto, provocando coriza, congestión nasal, estornudos y dolor de garganta. Menos frecuentes son malestar general, fiebre y escalofríos (White 1994). Estos virus junto con los rinovirus causan la mayoría de los cuadros de resfriado común. En los últimos años se ha descubierto una nueva variedad de coronavirus que provoca el síndrome agudo respiratorio severo (SARS) (Drosten 2003).

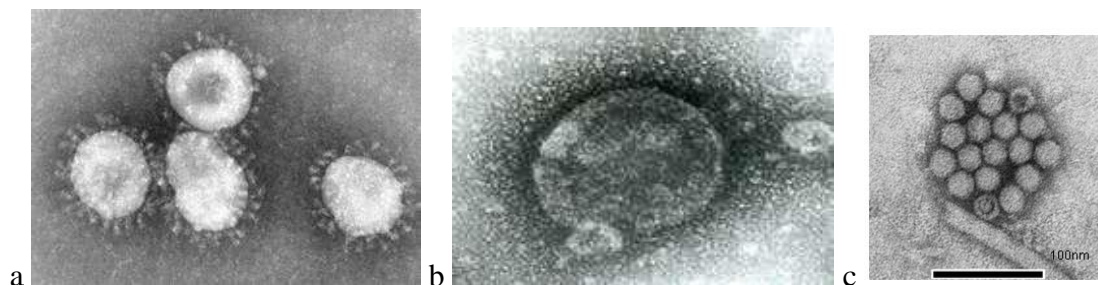


Figura 7. Coronavirus, metapneumovirus humano y bocavirus. Estos dos últimos virus han sido descubiertos recientemente, y en los lugares donde se han estudiado se ha demostrado que causan infección respiratoria con alta frecuencia. (University of South Carolina 2009, Pontificia Universidad Católica de Chile 2012, de Souza *et al.* 2009).

El metapneumovirus humano (hMPV) es un virus envuelto de la familia paramixovirus, con RNA de una sola cadena de sentido negativo, presenta tres glucoproteínas en su superficie, la de unión a la membrana G, la de fusión F y una pequeña proteína hidrofóbica SH (Fig. 7b). De reciente descubrimiento se sospecha que sus receptores en las células del hospedero involucran uno o más glucosaminoglicanos (Broor 2008).

Infecta tanto el tracto respiratorio bajo como el alto, puede pasar como un resfriado común o bien puede complicarse a neumonía. Sus principales síntomas son taquipnea, fiebre, tos, dolor de garganta hipoxia y malestar general, en el tracto superior puede provocar otitis media, y exacerba la sintomatología del asma (Kahn 2006). Los aspectos clínicos de este virus y los del VSR son muy similares.

El bocavirus es un virus recién descubierto no envuelto de la familia parvovirus, contiene una sola cadena de DNA con sentido positivo o bien puede ser negativo (Fig. 7c). Penetra dentro de la célula por endocitosis y su replicación es efectuada en núcleo y citoplasma celular. Infecta principalmente células del epitelio respiratorio, intestinal y ganglios linfáticos, presenta sintomatología típica de los virus respiratorios rinorrea, tos, dolor de garganta, dolor de cabeza y fiebre (Schildgen 2008).

3. Infección viral en vías respiratorias

3.1. Vías respiratorias altas

Las vías respiratorias superiores o altas del aparato respiratorio comprenden a aquellas estructuras que conforman el tracto recorrido desde la cavidad nasal hasta los bronquios y lo conforman la nasofaringe, orofaringe, laringe, tráquea, oído y senos paranasales (Fig. 8) (Camarek 2001).

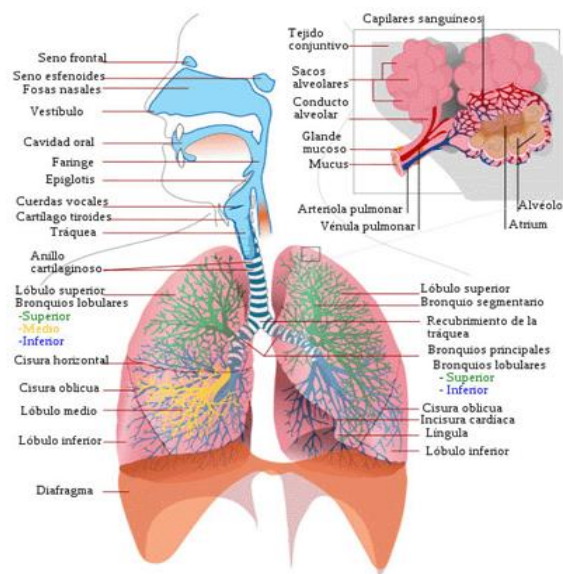


Figura 8. Aparato respiratorio alto y bajo. (Wikipedia 2012.) El aparato respiratorio representa una superficie de 70 m² de exposición que entran en contacto con el medio ambiente externo, por lo cual queda expuesto a numerosos agentes patógenos o contaminantes, y sus mecanismos de limpieza deben ser muy eficientes.

El resfriado común representa la inflamación de la mucosa nasal, es una infección muy frecuente y es la manifestación más clara de la infección de la vía respiratoria superior causada por numerosos virus. Entre los virus más frecuentes podemos encontrar a los rinovirus y a los coronavirus, aunque también contribuyen los virus de influenza, los de parainfluenza y los adenovirus (White y Fenner 1994).

La vía de ingreso es respiratoria, los virus se diseminan por contacto directo con secreciones infectadas mano a mano o a través de fomites, y posteriormente son inoculados en la mucosa nasal o conjuntival (Brooks, 2008)El periodo de incubación es de 1 a 4 días, la replicación viral se efectúa en células ciliadas del epitelio nasal y la nasofaringe. La excreción de virus aumenta al tercer y cuarto día de infección y suele desaparecer al quinto. Los síntomas suelen prolongarse hasta el séptimo u octavo día debido al edema e hiperemia de la mucosa y destrucción de células epiteliales (Shors 2009).

El epitelio respiratorio juega un papel importante en la regulación y en la respuesta inmune después de la infección viral a través de la producción de mediadores inflamatorios, citocinas y quimiocinas (Fig. 9). La producción de quimiocinas por células epiteliales en respuesta a la infección respiratoria viral lleva a un flujo de leucocitos a las vías aéreas y la liberación de mediadores químicos como elastasa y especies reactivas de oxígeno por neutrófilos, que causan daño en el epitelio, lo cual conlleva a una patología (Shors 2009, Patrick 2006, Tregoning 2010).

3.2 Vías respiratorias bajas

Se conocen como vías aéreas inferiores a los bronquios, bronquiolos respiratorios y alvéolos pulmonares (Fig. 8). La infección se caracteriza por ser un trastorno inflamatorio traqueobronquial que suele asociarse con una infección respiratoria generalizada. Se presenta durante los meses de invierno y en la mayoría de los casos suele ser de etiología viral. Siendo los virus mayormente implicados influenza, coronavirus, rinovirus, y el virus sincitial respiratorio (Camarek 2001)

El desarrollo de infección, implica un defecto en las defensas del hospedero, o bien de la virulencia del agente patógeno. La vía de llegada al parénquima pulmonar es por vía canalicular descendente por microaspiraciones o a través de material aerolizado como un estornudo (Shors 2009). Durante la infección, la mucosa traqueobronquial se encuentra hiperémica y edematosa, la inflamación temprana en la mucosa traqueobronquial progresa

rápidamente a la necrosis y luego se desprende. El material necrótico desprendido puede formar tapones que obstruyen parcial o totalmente las vías aéreas, lo cual aumenta la cantidad de secreciones bronquiales, la destrucción del epitelio respiratorio puede ser extensa en algunos casos como en el de influenza y mínima en otros como rinovirus (Shors 2009, White 1994, Tregoning 2010). A medida que la infección se disemina se activa la cascada inflamatoria. Las células infectadas producen citocinas y quimiocinas (PAF, leucotrienos, prostaglandinas, bradiquininas, e interleucinas) que activan a las células inflamatorias e inmunocompetentes. Los neutrófilos y células mononucleadas reclutadas al tejido respiratorio incrementan la producción de citocinas y quimiocinas. Las principales observaciones de este panorama se han realizado en modelos *in vitro* y en el modelo de ratón con los virus de influenza, RSV y rinovirus que han sido los más estudiados. Las observaciones se resumen en la Fig. 9. No obstante las observaciones en el modelo *in vivo* de la enfermedad son escasas.

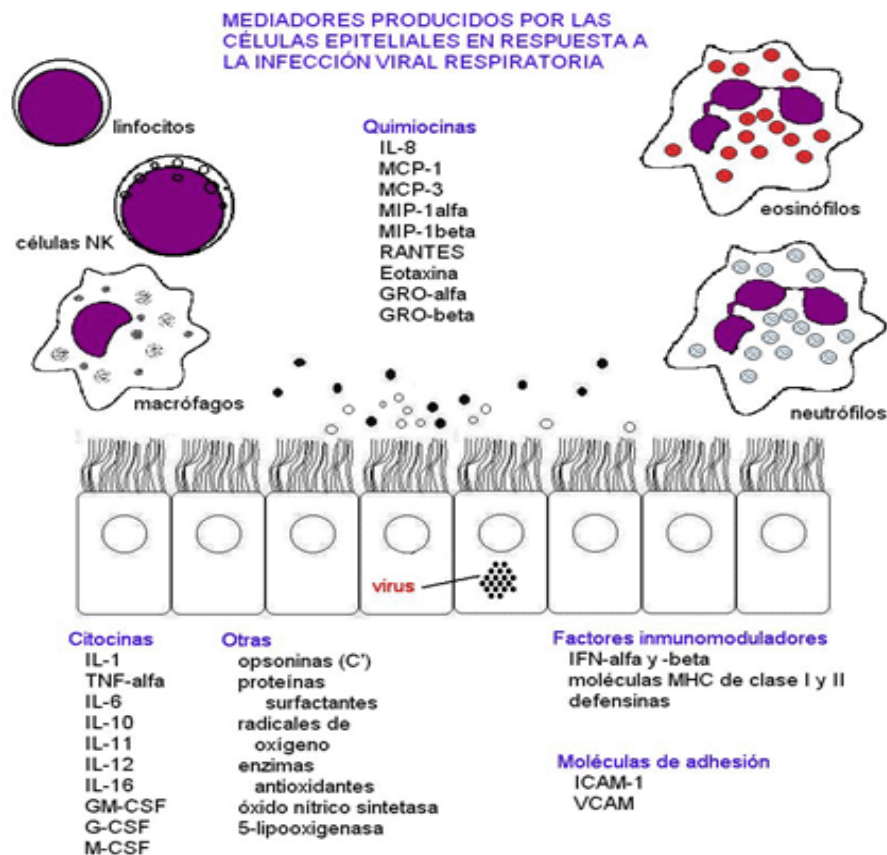


Figura 9. Mecanismos de inflamación en la mucosa respiratoria durante la infección viral. Se ha observado en modelos animales y en células respiratorias *in vitro* (líneas celulares y cultivos primarios) producción de un importante número de mediadores, los cuales se agrupan principalmente en citocinas, quimiocinas, otros factores quimiotácticos, moléculas de adhesión, opsoninas, especies reactivas de oxígeno y enzimas (Santiago 2009).

4. Mecanismos de inflamación e inmunidad innata

La inmunidad natural o innata representa la primera línea defensiva contra la invasión viral, entre sus principales funciones se encuentran:

- Reclutamiento y activación de leucocitos, principalmente fagocitos, a los sitios de daño;
- Activación de la cascada del sistema complemento;
- Activación y producción de moléculas opsonizantes;
- Producción de mensajeros químicos (citocinas) por una variedad de células además de los leucocitos;
- Identificación y remoción de sustancias extrañas en el organismo;
- Activación del sistema inmune adaptativo.

La inflamación es una de las primeras respuestas del organismo a la infección, esta es estimulada por medio de la liberación de factores químicos y sirve para establecer una barrera física contra la propagación de la infección. Así como para promover la restauración del tejido dañado (Roitt y Blostoff 2003).

Los factores químicos producidos durante la inflamación (cininas, histamina, serotonina, leucotrienos, citocinas, prostanoïdes, quimiocinas, etc.) causan vasodilatación, lo cual promueve la migración de células inmunológicas a sitios de infección, principalmente neutrófilos y macrófagos. Estos a su vez liberan otros mediadores químicos, para promover la quimiotaxis de células adicionales (Stites 2004).

Cuando el virus entra y se multiplica en las vías respiratorias, se desencadena el proceso inflamatorio. Hay producción de una gran cantidad de mediadores químicos, hay reclutamiento de neutrófilos y macrófagos a sitios de infección, además de linfocitos, eosinófilos, basófilos, células cebadas y células dendríticas. Se libera una gran cantidad de citocinas, quimiocinas, factores de complemento, prostaglandinas, neuropéptidos y enzimas lisosómicas. Entre los principales virus que causan infección en vías aéreas se encuentran los rinovirus, el virus sincitial respiratorio y el virus de la influenza., estos estimulan rápidamente a las células epiteliales y éstas segregan una gran cantidad de mediadores proinflamatorios

como son TNF-alfa (factor de necrosis tumoral alfa), IL-6 (interleucina 6), IL-8, IFN-I (interferón de tipo I) y GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos) (Becker, Koren 1993) (Noah, Becker 1993).

Esta respuesta inmediata produce cambios en las células endoteliales, como el aumento en la expresión de ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular) y un aumento en la permeabilidad vascular, edema, aumento en la cantidad de secreciones respiratorias y obstrucción aérea, así como disminución de la viscosidad del moco. (Folkerts 1998).

Cuando el neutrófilo llega a los sitios de inflamación fagocita y elimina los productos de la infección viral, también degrada tejido conectivo liberando proteasas y otros factores solubles que pueden actuar de manera adicional como quimioatrayentes. Así mismo libera el contenido de sus gránulos que contiene proteínas adicionales con un potencial altamente tóxico, éstas incluyen a las defensinas las cuales son muy tóxicas para virus y bacterias (Odeberg 1976, Message 2001). Una vez liberado el contenido de los gránulos el daño en el tejido aumenta. En modelos animales se ha demostrado que la proteína elastasa estimula a las glándulas productoras de moco para liberar cantidades excesivas de moco (Sommerhoff *et al.* 1990).

5. Los neutrófilos

5.1 Características del neutrófilo

Los neutrófilos son células de 9 a 10 micras de diámetro y son los leucocitos más abundantes en la sangre, alcanzan una concentración de 44 millones de células por mililitro, y representan de 50 a 75 % de todos los leucocitos; 5 % de los neutrófilos son células en banda y el resto posee núcleo segmentado (de 2 a 5 lóbulos) (Fig. 10a). Los neutrófilos poseen en su citoplasma gránulos, los cuales contienen una gran cantidad de sustancias tóxicas para los microorganismos y estos son clasificados en cuatro grupos: primarios o azurófilos que contienen mieloperoxidasa, BPI, catepsinas y defensinas; secundarios o específicos que contienen lactoferrina y catelicidina; terciarios que contienen gelatinasa y catepsina; y vesículas que contienen albúmina y fosfatasa alcalina (Faurischou, Borregaard 2003). Dentro de los gránulos primarios se dan reacciones químicas en las que se reduce el oxígeno en peróxido de hidrógeno estas sustancias pueden neutralizar a los virus, hongos y bacterias. Estos gránulos, llamados gránulos azurófilos, almacenan enzimas como la mieloperoxidasa y la elastasa. Dado que estos gránulos son los primeros en aparecer durante la diferenciación reciben el nombre de gránulos primarios. Los gránulos específicos o secundarios, son

formados en el estado mielocítico (casi al final de la fase mitótica) y continúan siendo producidos por algún tiempo durante la fase postmitótica. (Borregaard y Cowland 1997).

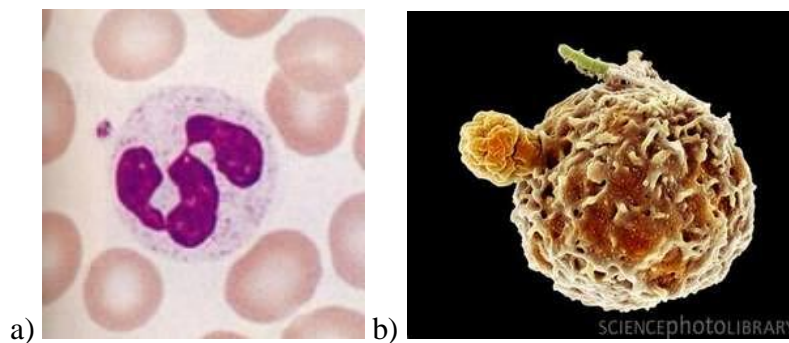


Figura 10. Aspectos de un neutrófilo. a) Fotografía con tinción de Wright, se ven los gránulos citoplásmicos, que bajo tinción con hematoxilina eosina no toman un color distintivo y por tanto se denominan neutrofilicos, y el núcleo que en este caso es trilobulado, teñido de color rojizo. b) Microscopía electrónica de barrido de un neutrófilo fagocitando una mycobacteria. (Science Photo Library 2012).

Los neutrófilos presentan actividad fagocítica (Fig. 10b) similar a los macrófagos y células dendríticas, y por esta razón tienen una función importante en la inmunidad innata contra patógenos como bacterias y virus. Durante la infección viral respiratoria (IVR), hay un gran reclutamiento de leucocitos hacia los sitios de la infección. Allí los neutrófilos, toman parte en la respuesta inmunitaria contra la IVR. Debido a la gran cantidad de agentes quimiotácticos, como quimiocinas, factores de la coagulación y del complemento (C5a) que son liberados por las células del epitelio respiratorio durante la infección viral respiratoria, los neutrófilos son la primera línea defensiva del sistema inmunitario. (Luster 2001, Ishikawa y Miyazaki 2005).

5.2 Adherencia y marginación de los neutrófilos

Cuando los virus invaden e infectan el tracto respiratorio, los neutrófilos llegan inmediatamente, en respuesta a la producción de la quimiocina IL-8, por parte de las células epiteliales y otros neutrófilos activados.

El primer paso, para la migración del neutrófilo de la circulación a los sitios de infección, es la adhesión a células del endotelio vascular. Este evento se considera que se lleva a cabo en tres partes: rodamiento, activación y firme adhesión (Zarbock 2008).

Además existen dos tipos de migración transendotelial y transepitelial. Durante la migración transendotelial, el neutrófilo se adhiere a las células endoteliales mediado por interacción entre integrinas VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$)(Antígeno muy tardío,) MAC-1($\alpha M\beta 2$)(Antígeno de macrófago) y LFA-1($\alpha L\beta 2$)(Antígeno asociado a función de linfocito), presentes en neutrófilos y miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas como son ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1(Proteína de adhesión celular vascular) y RAGE (receptor de productos finales de glicación avanzada) en la superficie del endotelio (Yonekawa y Harlan 2005).

La migración transepitelial está caracterizada por la adhesión del neutrófilo a la membrana epitelial basolateral, la adhesión esta mediada por el ligando CD11b/CD18, CD98 en la superficie del neutrófilo y por JAM-C (molécula de adhesión de uniones C), CD47 y DAF (factor acelerador del decaimiento [de complemento]) en la superficie epitelial (Fig. 11) (Zen, Parkos 2003).

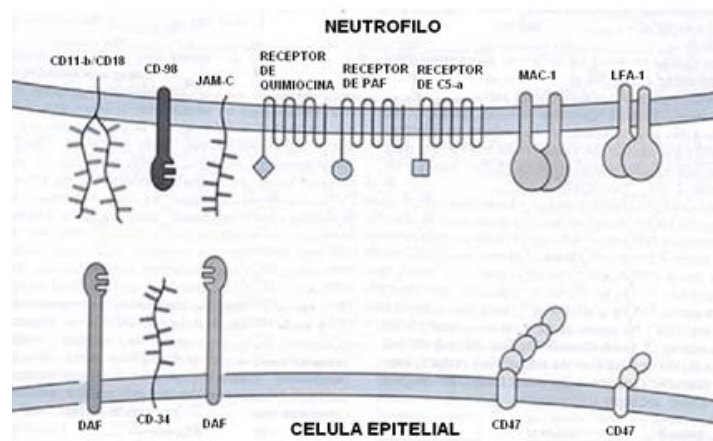


Figura 11. Receptores celulares que participan en la migración transepitelial del neutrófilo. (Roitt y Blostoff 2003.).

5.3 Diapédesis del neutrófilo

La diapédesis es el paso de elementos formes de la sangre a través de fenestraciones en los capilares para dirigirse al foco de infección sin que se produzca lesión estructural. La IL-8 es una quimiocina producida por células endoteliales estimuladas. En la migración transendotelial, las células endoteliales liberan IL-8, que va a inducir una rápida expresión de L-selectina en los neutrófilos, otras citocinas incluyendo GM-CSF y PAF (factor activador de plaquetas) también son liberadas por células endoteliales excitadas y pueden provocar la expresión de L-selectina (selectina de leucocitos). La expresión de L-selectina es requerida para el ingreso transendotelial. Como resultado de la estimulación con IL-8 y PAF, los

neutrófilos expresan en la superficie $\beta 2$ -integrinas de leucocitos, MAC-1 y LFA-1, las cuales estaban dentro de los gránulos específicos (Muller 2003). LFA-1 se enlaza a la molécula ICAM-1 y es importante como mediador reversible de la adherencia leucocito-endotelio (Reilly, Woska 1996).

PECAM-1 (molécula de adhesión plaquetaria a célula endotelial) es una molécula de adhesión que también se expresa en los bordes intercelulares de células endoteliales, del mismo modo también se expresa en neutrófilos. PECAM-1 es una molécula transmembranal que va a servir como un pegamento homofílico, esto es que su ligando puede ser otro PECAM-1. Así se enlaza el PECAM-1 de neutrófilos con el PECAM-1 del endotelio, guiando a los leucocitos a los bordes de las células endoteliales, provocando un aumento en la avidéz de enlace de las $\beta 2$ -integrinas (Mueller y Weigl 1993, Mamdouh y Chen 2003).

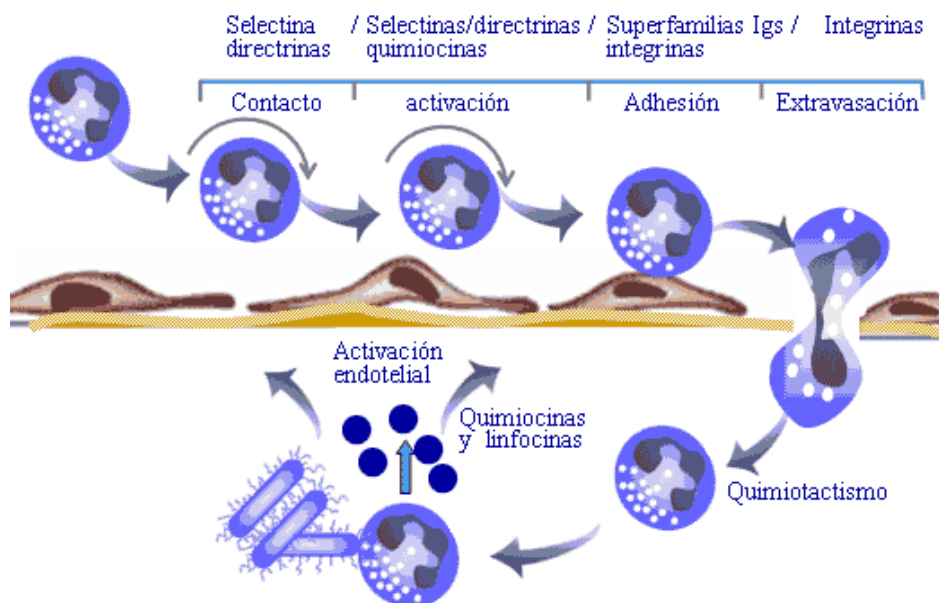


Figura 12. Diapédesis de neutrófilos. Proceso de migración de un leucocito del torrente sanguíneo hacia un foco inflamatorio. Se observan las principales etapas de la diapédesis o extravasación de estas células.

La transmigración endotelial de los neutrófilos es rápida, y es iniciada por una muesca en el endotelio. El neutrófilo se polariza extendiendo un pseudópodo (Fig. 12) entre las células endoteliales y manteniendo el núcleo y los gránulos en el lado luminal, en la trasmigración los neutrófilos cruzan la frontera del endotelio sin requerir de un gradiente quimiotáctico. Los neutrófilos van a tener entonces un contacto muy estrecho con las células endoteliales, esto es muy importante, ya que de este modo se evita, la entrada excesiva de líquidos tisulares hacia los vasos sanguíneos, finalmente los neutrófilos se acomodan, poco a

poco entre la membrana basal y las células endoteliales antes de entrar de lleno al tejido conectivo (Mueller 2009) (Kvietys 2001).

5.4 Fagocitosis por el neutrófilo

La fagocitosis es el proceso mediante el cual el neutrófilo, se une y fagocita partículas extrañas como virus, bacterias o incluso células infectadas por virus. Para que un neutrófilo pueda fagocitar un virus, éste debe ser primero opsonizado, es decir se le pegan moléculas que facilitan el proceso y que por tanto se llaman opsoninas. Estas moléculas pueden ser proteínas del complemento, anticuerpos o proteínas surfactantes. Las principales opsoninas son las inmunoglobulinas de tipo G (IgG) y el factor C3b del complemento.(Lee 2003) Los principales receptores de opsoninas en los neutrófilos son los receptores de Fc (fracción cristalizable de IgG) y el subgrupo de integrinas $\beta 2$; los receptores que unen IgG con mayor afinidad son el Fc γ RIIA (receptor II A de Fc gama) que es un polipéptido sencillo con ITAM (motivos activados de manera inmune a través de tirosinas), y Fc γ RIIIb que es un receptor anclado en la membrana mediante un glicosil fosfatidil inositol y que también contiene ITAM (Tsuboi *et al.* 1998). Una vez unidos los complejos virus-opsoninas con los receptores correspondientes, el virus se hunde en una depresión en la célula, o bien se forman pseudópodos que envuelven el microorganismo para internalizarlo en el proceso de la fagocitosis (Fig. 13). Con esto se forma una vacuola dentro de la célula con el microorganismo envuelto, dicha vacuola se denomina fagosoma, el próximo paso es la destrucción de la partícula viral, lo cual ocurre cuando el fagosoma se une con el lisosoma, una vacuola llena de enzimas y moléculas bactericidas. Existen dos vías para la eliminación de los microorganismos, la oxidativa y la no oxidativa. En la oxidativa los gránulos azurófilos se unen a la vacuola y se da el proceso conocido como estallido respiratorio que conlleva a la generación de especies reactivas de oxígeno. Las principales enzimas que actúan en el estallido respiratorio son la NADPH oxidasa y la mieloperoxidasa. En la eliminación no oxidativa toman parte defensinas contenidas en los gránulos primarios, y enzimas activas como lactoferrinas y lisozimas contenidas en los gránulos secundarios; además en el citosol existe una proteína con actividad antimicrobiana denominada calprotectina (Warren y Harrison 2003).

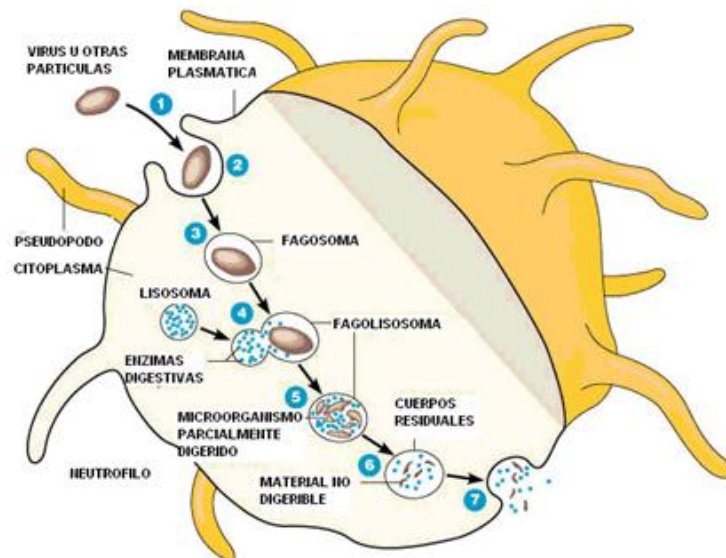


Figura 13. Mecanismo de la fagocitosis por neutrófilos.

6. Quimiotaxis

La quimiotaxis es la migración de una célula de un lugar a otro, por lo general mediante un gradiente de concentración de factores quimiotácticos (Fig. 14), como una característica de la respuesta inmunitaria innata, y muchas veces implica diapédesis. Durante la quimiotaxis la célula migra fuera de los vasos sanguíneos por medio de una gran variedad de moléculas de adherencia como las selectinas y las integrinas ya mencionadas. La quimiotaxis es controlada por señales internas y externas que activan cascadas complejas de transducción de señales, dando por resultado la remodelación altamente dinámica y localizada del citoesqueleto en la célula que lleva en última instancia a la migración dirigida (Wong, Heit 2010, Rojas-Dotor 2009). Durante la quimiotaxis los quimioatrayentes provocan un gran número de cambios en el neutrófilo, estos incluyen una polimerización localizada de la actina-F en el sitio de la corteza celular mas cercana a la fuente de quimoatrayente. Existe un cambio morfológico en la célula caracterizado por alargamiento del citoplasma y formación de pseudópodos. Recientemente se ha descubierto que las especies reactivas de oxígeno (ROS) son fundamentales para la formación de pseudópodos, necesarios para la migración así como para la eliminación de patógenos (Hattori *et al.* 2010). Entre los quimioatrayentes se encuentran moléculas muy variadas que van desde proteínas del complemento (C5a) activadas a metabolitos bacterianos como péptidos formilados (fMLP) o lipopolisacárido (LPS), metabolitos del ácido araquidónico (leucotrieno B₄) y quimiocinas, citocinas quimiotácticas que presentan homogeneidad bioquímica (Rollins 1997).

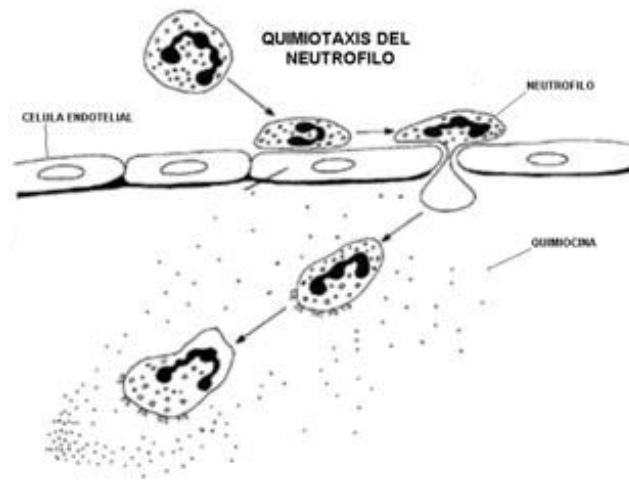
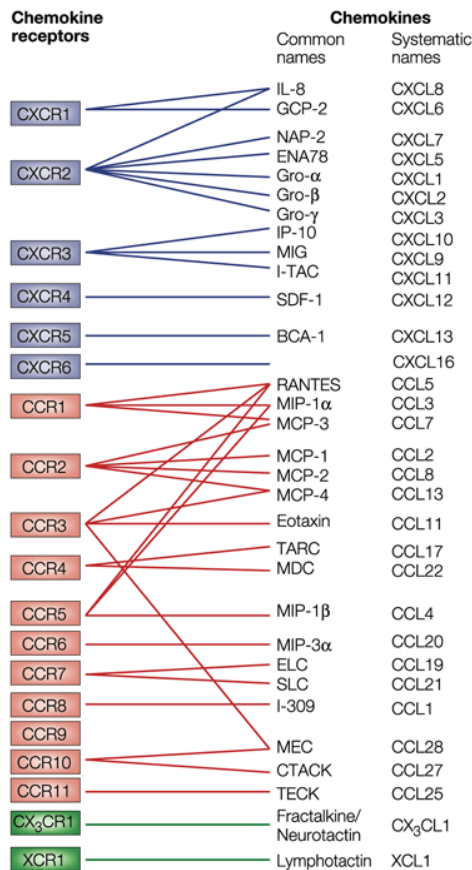


Figura 14. Quimiotaxis del neutrófilo.

6.1 Quimiocinas y su clasificación

Las quimiocinas constituyen una familia de citocinas con actividad principalmente quimiotáctica, claves en fenómenos biológicos tan diversos como organogénesis, angiogénesis, hematopoyesis, metástasis de tumores, inflamación, desarrollo de la respuesta inmunitaria adaptativa e incluso actividad antiviral directa. Estas proteínas presentan homología estructural con la IL-8, y bioquímicamente son polipéptidos de bajo peso molecular (de 8 a 14 kDa –kilodaltones) estructural y funcionalmente relacionados, codificados por genes localizados en los cromosomas 4 y 17. Las quimiocinas presentan 4 residuos de cisteína, altamente conservados, y la posición de estas cisteínas es la base de la clasificación de las quimiocinas. Las quimiocinas se agrupan en 4 subfamilias, CXC o α , CC o β , CX3C o δ , y CX o γ . La figura 15 muestra una tabla de su clasificación. Las familias más extensas corresponden a las CXC y a las CC, las primeras atraen neutrófilos y las segundas atraen basófilos y monocitos de manera preferente. (Mahalingam et al. 2001, Shields 2011, Meyer-Hoffert *et al.* 2003, Rollins 1997 Graves y Jiang 1995, Proudfoot 2002). Las quimiocinas también incrementan la expresión de moléculas de adhesión como son las integrinas CD11b/CD18 (receptores para complemento) y CD11c/CD18; además, la IL-8 induce una rápida activación de la NADPH oxidasa, generando la formación de peróxido de hidrógeno en los fagocitos (Detmers 1991).



Nature Reviews | Immunology

Figura 15. Clasificación de las quimiocinas. (Proudfoot 2002.)

Los receptores de las quimiocinas forman una familia con estructura y funciones similares. Ellos son miembros de la superfamilia de receptores con siete regiones transmembranales acoplados a proteína G, todos tienen un extremo N-terminal extracelular sobre la superficie celular, tres dominios extracelulares y tres dominios intracelulares así como un C-terminal en el citoplasma. Uno de los dominios intracelulares de los receptores de quimiocina se acopla con la proteína G heterotrimérica, y con la unión entre el ligando y el receptor la proteína G inicia una cascada de transducción de señales (Proudfoot 2002, Ransohoff 2009).

6.2 Quimiocinas CXC e IL-8

Las quimiocinas CXC son las quimiocinas más potentes para neutrófilos, y pueden reclutar y activar a los neutrófilos en los procesos inflamatorios. Estas quimiocinas tienen la característica de presentar una secuencia única denominada ELR la cual representa a los aminoácidos Glu-Leu-Arg (Sachse 2005). La IL-8 es la quimiocina CXC más extensamente estudiada, fue inicialmente caracterizada como un factor con potente actividad

quimioatrayente para neutrófilos, macrófagos y linfocitos. La IL-8 es producida por distintos tipos de células, incluyendo linfocitos T, células asesinas naturales (NK), fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, hepatocitos y condrocitos, en respuesta a una amplia variedad de estímulos que incluyen: lectinas, lipopolisacáridos, antígenos virales, infección viral, cristales de uratos así como citocinas proinflamatorias (IL-1 y TNF). (Paccaud y Schifferli 1990).

Además de la actividad quimiotáctica, algunos miembros de la familia CXC inducen activación y degranulación selectiva de neutrófilos, tal es el caso de la IL-8, el oncogén regulador del crecimiento (GRO α), el péptido 2 activador de neutrófilos (NAP-2), el péptido activador de neutrófilos derivado de células epiteliales (ENA-78) y la proteína quimiotáctica 2 de los granulocitos (GCP-2) (Abbadie 2005, Noah 2000). La quimiocina oncogén regulador del crecimiento alfa (GRO α) es una quimiocina de la familia CXC que induce quimiotaxis de neutrófilos, degranulación, y un incremento en la concentración de calcio intracelular (Anja *et al* 1999, Santiago *et al* 2008). ENA-78 pertenece a la familia CXC y su potencia para atraer neutrófilos es menor a la de GRO α , se ha descubierto que su concentración se encuentra elevada durante la infección por rinovirus (Donninger *et al.* 2003). La figura 16 presenta un esquema de la estructura de las quimiocinas CXC.

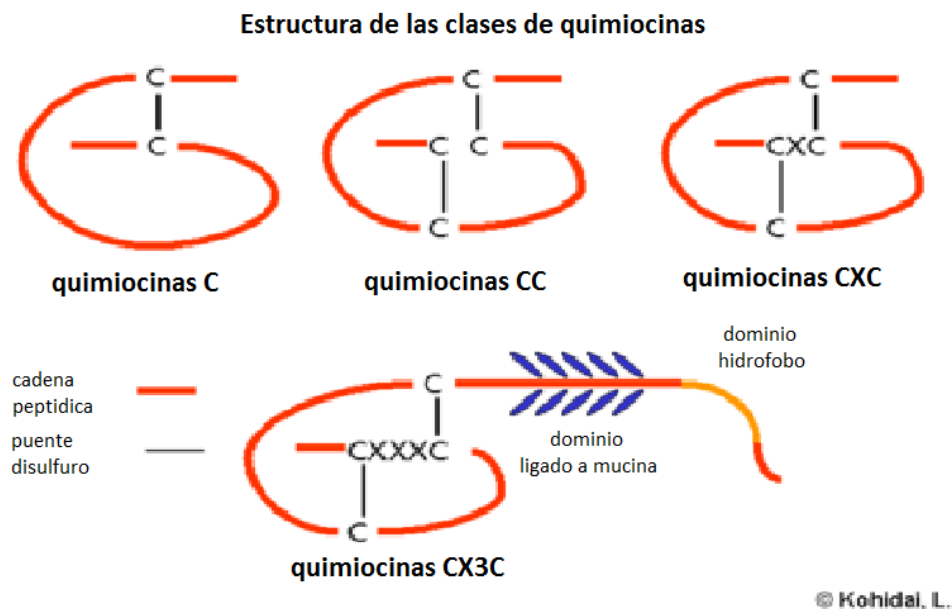


Figura 16. Estructura de las diferentes clases de quimiocinas. Se representa la ubicación de las cisteínas conservadas, en la mayoría de los casos cuatro, y los enlaces disulfuro formados entre ellas. La cadena peptídica se representa en anaranjado, los puentes disulfuro en negro, C, cisteína; X cualesquier aminoácidos (www.AllergyCases.org).

II Antecedentes

El resfriado común es un síndrome respiratorio de origen viral caracterizado, por estornudos, rinorrea, dolor, sequedad faríngea y, en algunas ocasiones, síntomas generales como fiebre y cefalea (Crofton 1981). Es la enfermedad infecciosa más común del género humano, afecta a personas de todas las edades y razas del mundo. Las tasas de infección son más altas en personas adultas, pero en los niños se pueden presentar complicaciones serias como otitis media. Estudios llevados a cabo en comunidades rurales informan que los niños escolares tienen resfriados tres veces más que los adultos de familias en las cuales no hay niños escolares y que la presencia de estos, en un núcleo familiar, duplica el número de resfriados sufridos por los adultos y niños preescolares pertenecientes a dicha familia (Kelly y Busse 2008, Vernom 1983). La frecuencia más elevada se presenta entre los 2 y 4 años de edad cuando hay varios niños en la familia y entre los 5 y 8 años cuando 1 solo niño asiste a la escuela. La incidencia disminuye después de los 9 años (Crofton 1981).

En los climas fríos y templados, el resfriado común es más frecuente y los cambios bruscos de temperatura juegan un papel importante, pero hay que precisar que el frío por sí mismo no inicia un resfriado (Crofton 1981), solo propicia la infección modificando la eficacia del mecanismo mucociliar, importante mecanismo de defensa inespecífico del aparato respiratorio. Hay otros factores predisponentes como son: condiciones de hacinamiento, conglomeraciones humanas, convivencia de numerosas personas en lugares cerrados, además las condiciones ambientales como smog, polvo, tabaquismo (fumador pasivo), entre otros. también pueden alterar los mecanismos defensivos (Trigg 1994).

Pese a que la influenza es una enfermedad estacional en zonas templadas como la República Mexicana. El virus está circulando todo el año en diferentes partes del mundo. Las epidemias de gripe ocurren prácticamente cada año; las pandemias con efectos devastadores ocurren a intervalos impredecibles, el siglo pasado ocurrieron tres (1918, 1957 y 1968). En zonas templadas, la gripe suele ocurrir en el invierno y la primavera.

Los virus respiratorios son los principales agente causales de exacerbaciones de asma, entre los que destacan los rinovirus. Además, la infección de vías bajas de niños por el RSV se asocia con desarrollo de asma años después aunque se desconocen los mecanismos (Busse 1999, Terán 1997).

Desde hace algunos años se han empezado a estudiar las quimiocinas y sus funciones en la defensa y en el origen de los síntomas durante diferentes enfermedades en las cuales participan los mecanismos de inflamación. Entre las primeras quimiocinas estudiadas se encuentran la IL-8, que esta asociada al reclutamiento de neutrófilos como ya se mencionó. Específicamente, las quimiocinas de la familia CXC son las responsables del reclutamiento de neutrófilos, de ahí la importancia del estudio de sus funciones durante la infección viral respiratoria (Luster 2001, Matzokura 1996). En este estudio se seleccionaron IL-8, GRO-alfa y ENA-78 por su conocida capacidad de atraer neutrófilos y porque se han implicado en diferentes modelos de inflamación (McKay 2005, Fibbi *et al.* 2010, Ryu y Min 2006, Terui *et al.* 2000, MacDermott 1999, Papi *et al.* 2006).

III Justificación

Los neutrófilos son la primera línea defensiva de la respuesta inmunitaria contra una infección, son las células más abundantes en el torrente sanguíneo y están entre las primeras células y las más abundantes en llegar a la mucosa respiratoria durante una infección viral, el mecanismo por el cual destruyen virus y bacterias es por fagocitosis y por liberación del contenido de sus gránulos, los cuales contienen sustancias químicas oxidantes y proteínas catiónicas. Al liberar el contenido de sus gránulos de manera excesiva se cree que provocan daño extensivo en el tejido, y la sintomatología aumenta. Además, si el paciente padece alguna enfermedad crónica, como el asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la enfermedad se agrava. Dado que la infección viral respiratoria es una enfermedad inflamatoria, es importante estudiar los mecanismos por los cuales se regula el proceso inflamatorio, ya que de este modo se pueden buscar enfoques terapéuticos para controlar el daño que provoca, y ofrecer una mejor calidad de vida al paciente que sufre una infección viral respiratoria.

IV OBJETIVOS

1.1. Objetivo general

Identificar las proteínas quimioatrayentes de neutrófilos durante la enfermedad viral respiratoria y estudiar su posible función en la patogénesis de la misma.

1.2. Objetivos específicos

Identificar los virus que causan cuadros respiratorios en una cohorte de niños escolares de 6 a 12 años de edad (reacción en cadena de la polimerasa e inmunofluorescencia en muestras nasales).

Determinar las principales poblaciones de leucocitos reclutados en la mucosa nasal de niños con enfermedad respiratoria viral (ERV) (tinción de Giemsa de frotis de secreciones nasales).

Identificar las quimiocinas que reclutan neutrófilos en las secreciones nasales de los mismos niños (cromatografía de líquidos de alta presión y ensayos de quimiotaxis).

Medir la concentración de las quimiocinas IL-8, GRO- y ENA-78 en secreciones nasales de niños con enfermedad respiratoria viral (ensayo inmunoabsorbente enzimático – ELISA).

V HIPÓTESIS

Dado que durante la enfermedad respiratoria viral, los neutrófilos están entre las principales células reclutadas al tejido, la concentración de factores quimiotácticos para estas células se verá aumentada, en las secreciones nasales de niños con ERV.

H₁: Los niveles de quimiocinas de secreciones de niños con ERV serán superiores a los niveles en los mismos niños durante estado asintomático libre de infección viral.

H₀: Los niveles de quimiocinas de secreciones de niños con ERV no presentarán diferencias con los niveles en los mismos niños en estado asintomático.

VI MATERIAL Y MÉTODOS

1 Grupo de estudio

Se realizó el seguimiento a lo largo del año a un grupo de 30 niños de la primaria “Rey Tizoc” localizada en Xochimilco D.F. (6-12 años) y en cuanto uno de los niños presentó sintomatología respiratoria se tomó una muestra de aspirado nasal (AN). La evaluación fue realizada por un médico del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Así mismo se realizaron mediciones diarias del funcionamiento pulmonar con ayuda de flujómetros (Assess 710FM), y se anotó una escala de los síntomas del siguiente modo:

ausente 0, leve 1, moderado 2 y severo 3. A los mismos niños se les tomó una muestra testigo durante un periodo asintomático. Para la participación de cada niño se solicitó al tutor o padre la firma de una carta de consentimiento informado (véase el Apéndice I). El estudio contó con la aprobación del Comité de Ciencia y Bioética del INER.

Los criterios de inclusión fueron síntomas de vías altas: estornudos, rinorrea, dolor de garganta; síntomas de vías bajas como dolor de pecho y tos; y síntomas generales como dolor de cabeza, malestar general, y fiebre.

Los criterios de exclusión fueron: niños bajo tratamiento médico y sin consentimiento autorizado.

2 Toma de muestra

Mediante succión suave, se tomaron 2 mL de muestra de secreción nasal (moco) en 3 mL de medio de transporte viral en una trampa diseñada para tal efecto (Fig. 17). El medio de transporte fue F12 (Gibco) suplementado con antibióticos (penicilina 1000 UI/mL y estreptomicina 1000 ug/mL) y albúmina sérica bovina 0.5 % (Sigma). Las muestras testigo se tomaron mediante lavados nasales, para esto se aplicaron 5 mL de solución salina fisiológica a una fosa nasal mientras se obstruye la otra, y se pidió al alumno que se “sonara” la fosa en un frasco de muestra limpio y estéril con 3 mL de medio de transporte, de los 5 mL usualmente se recuperan 2. Las muestras, tanto clínicas como testigo, se transportaron de inmediato y en frío al laboratorio para su estudio.



Figura 17. Toma de muestra mediante trampa de vacío en medio de transporte viral.

3 Procesamiento de la muestra

Una vez en el laboratorio, el tubo de muestra con 5 mL se lleva a 10 mL con amortiguador salino de fosfatos (PBS) (Na_2HPO_4 1g, KH_2PO_4 0.2 g, NaCl 8 g, c.b.p. 1 L agua destilada y desionizada, pH 7.0) frío. Un mL de la muestra se guarda a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ para la detección de rinovirus por reacción en cadena de polimerasa (PCR) y se separa otro mL para aislamiento viral en cultivo celular, este último se debe procesar de inmediato, el resto se centrifuga a 4000 g (5000 RPM) durante 10 min. a $4\text{ }^\circ\text{C}$.

El sobrenadante se guarda, para cuantificar quimiocinas por ensayo inmunoabsorbente enzimático (ELISA) y el botón se resuspende en 5 mL de PBS frío. Se centrifuga el tubo a 700 g durante 10 min a $4\text{ }^\circ\text{C}$. Se elimina el sobrenadante y el botón se resuspende de nuevo en 5 mL de PBS frío. Se deja reposar 1 min a temperatura ambiental (TA) y se eliminan los filamentos macroscópicos de moco que se depositan en el fondo del tubo. Se centrifuga de nuevo a 700 g 10 min. El botón se resuspende en 1.6 mL de PBS frío y se reparte en 2 tubos, uno para conteo diferencial y el otro para inmunofluorescencia.

4 Conteo diferencial

Se toman 100 μl del resuspendido y se impactan en citospín (Cytopro de Wescor), en un portaobjetos, a 30 g durante 2 min. Se deja secar la muestra, se fija con metanol frío durante 5 seg y se tiñe mediante la técnica de hematoxilina-eosina (hematoxilina de Harris), se coloca cada portaobjetos 5 seg. en hematoxilina y luego 7 seg. en eosina, se enjuaga en agua corriente y se deja secar. Los portaobjetos se montan y se observan en microscopio (Olympus CH30).

5 Inmunofluorescencia

Esta prueba se aplica a las células obtenidas del aspirado nasal o a los cultivos celulares que desarrollaron efecto citopático después de la inoculación con los aspirados. Se utilizó el estuche comercial “Panel respiratorio 1 monitoreo viral e identificación IFA kit” de Millipore que detecta: virus de influenza A y B, de parainfluenza 1, 2 y 3, adenovirus y virus sincitial respiratorio. De acuerdo con las instrucciones del proveedor, en un portaobjetos de 8 pozos cubierto de teflón (Electron Science Microscopy, núm. de cat. 63422) se colocan 25 μl de la muestra en cada pozo y se dejan secar a temperatura ambiente. Una vez seca la preparación se fija 30 min con acetona fría a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y se enjuaga con PBS a temperatura ambiente. Atención: se seca cuidadosamente el teflón después de cada lavado, para evitar que

el reactivo siguiente se extienda y se salga del pozo de reacción. Se coloca 1 gota del primer anticuerpo y se incuba a 37 °C durante 30 min en cámara húmeda, se lava 2 veces con PBS tween 20 al 1 %. Se coloca el segundo anticuerpo el cual está conjugado a isotiocianato de fluoresceína, se vuelve a incubar 30 min a 37 °C en cámara húmeda, y pasado el tiempo se vuelve a enjuagar dos veces con PBS tween 20 al 1 %. La preparación se deja secar a temperatura ambiente. Se leen las muestras bajo microscopio de fluorescencia (Olympus BX60).

6 Aislamiento viral

Con los aspirados nasales negativos a la inmunofluorescencia se intentó el aislamiento viral. Para lo cual se cultivaron células MDCK (Cat ATCC CCL-34) y Hep-2 (Cat. ATCC CCL-23) en cajas de 6 pozos (NUNC) con medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (penicilina cristalina 100 UI/mL y sulfato de estreptomicina 100 µg/mL). Las células se infectaron con las muestras cuando tenían entre 80 y 90% de confluencia. Para esto se retira el medio a las células, se lavan 2 veces con PBS, se les agregan 200 µl de muestra diluidos en 1 mL de medio MEM sin suero fetal bovino, para inocular las MDCK se adicionó al medio tripsina al 0.05%. Se pone la placa en una incubadora con agitación suave durante 2 h, y posteriormente se centrifuga a 100 g durante 50 min. Se retiró el medio y se agregó medio nuevo sin SFB. Se incubó durante 21 días a 37 °C con 5 % de CO₂ y atmósfera húmeda, o hasta observar efecto citopático presuntivo de infección viral. A las células desprendidas por la infección viral se les realizó el procedimiento de inmunofluorescencia para determinar el virus aislado.

7 RT-PCR

Todas las muestras se sometieron a una prueba de retrotranscripción acoplada a reacción en cadena de la polimerasas (RT-PCR) para la detección de rinovirus. El RNA de cada muestra se extrajo mediante el estuche de Qiasredder (Qiagen, cat 74106). Para esto, 500 µl de muestra se hacen pasar por una columna de lisis, y se centrifugan a 15,000 g durante 1 min, el lisado se pasa a una columna de separación y se centrifuga a 15,000 g por 15 seg, se desecha el filtrado y se lava 2 veces con buffer de lavado a 15,000 g durante 15 seg. Se recupera el RNA total mediante elución con 50 µl de agua estéril y libre de RNAsas a 10,000 rpm durante 1 min.

La retrotranscripción se realizó como indican Santiago *et al.* (2008). Para esto se usó la enzima Superscript® (Invitrogen, 18064-022) de acuerdo con las indicaciones del proveedor. De manera breve, se mezclaron en un tubo para PCR, 2 µl de muestra (aprox. 2 µg de RNA), 1 µl de oligo(dT)12-18 (0.5 µg/µl) (Invitrogen, 18418-012), 8 µl de agua libre de RNAsas y se incubaron en un termociclador (Genius, Techne) 10 min. a 70 °C, luego se pasaron a enfriamiento rápido en baño de hielo, con lo cual queda alineado el oligo(dT) con los RNAs que presenten cola de poliA, como es el caso del genoma de rinovirus. En el segundo paso se añadió 4 µl de amortiguador para primera cadena (*first strand buffer*), 2 µl de ditiotritol 0.1 M, 1 µl de mezcla de dNTPs 10 mM (Invitrogen, 18427-013), 1 µl de Superscript® y 1 µl de agua libre de RNAsas. Se corrió la mezcla en el termociclador durante 1 hr a 42 °C, cuando terminó la reacción el termociclador bajó la temperatura a 4 °C hasta que se guardaron los tubos a -20 °C o se corrió la PCR.

Para la PCR se mezclaron por cada muestra y testigo positivo, 17 µl agua destilada, 1 µl mix dNTPs, 2.5 µl buffer con MgCl₂, 1 µl de cebador OL26 sentido (5'GCACTTCTGTT TCCCC3'), 1 µl de cebador OL27 antisentido (5'CGGACACCCAAAGTAG3') (de Almeida *et al.* 2010), 0.5 µl de enzima Expand® (Roche, 1 732 641), encima de esta mezcla se coloca una lenteja de parafina para biología molecular y sobre ésta, 2 µl de cDNA obtenido en la RT. Se incubaba en el termociclador 2 min a 94 °C y después se aplican 30 ciclos de la siguiente secuencia: 94 °C 30 seg., 60 °C 30 seg. y 72 °C 40 seg. Finalmente un periodo de 4 min a 72 °C, y se programa el aparato para que conserve el tubo a 4 °C hasta que se saque. El amplímero se guarda a -20 °C hasta correr la electroforesis en agarosa.

Para la visualización de las bandas amplificadas, se corre una electroforesis en gel de agarosa 2 %, la cual se prepara calentando 0.6 g de agarosa en 30 ml de buffer TBE 0.5 X (45 mM tris-Borato, 1 mM EDTA, biotech.about.com) con bromuro de etidio 0.5 µg/mL, la concentración se reajusta a cada prueba porque el reactivo se degrada lentamente, el gel debe adquirir un tono rosado leve. El gel se coloca en su molde, se deja enfriar y una vez consolidado se coloca en la cámara, la cual se llena a nivel con buffer TBE 0.5 X. Por carril se colocan 5 µl de muestra mezclados con 2 µL de buffer de carga (0.2 % azul de bromofenol, 0.2 % xilen cianol, 30 % glicerol en buffer de Tris-EDTA, mobio.com), se reserva un carril para el marcador de pesos moleculares (escalera de 100, Amresco K180-250UL) y se corre la electroforesis a 100 V constantes (Power Pack 300, Bio-Rad).

8 Separación de factores quimiotácticos por HPLC

Se realizó un homogeneizado de 20 muestras (1.5 mL cada una), se liofilizó y se reconstituyó con 1 mL de agua destilada para aplicarlo a un equipo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC Hewlett Packard 1100) con una columna de fase reversa RP-8, la cual separa las proteínas de acuerdo con su afinidad a disolventes. Se usó un gradiente lineal de ácido trifluoroacético y acetonitrilo y una velocidad de flujo de 3 mL/min. Se colectaron fracciones a cada minuto de la corrida.

9 ELISA

Las fracciones colectadas de la HPLC primero y las muestras clínicas después, se sometieron a ensayo inmunoabsorbente enzimático (ELISA) para cuantificar las quimiocinas IL-8, GRO α y ENA-78. La cuantificación se realizó por ELISA en emparejado (Fig. 18), con anticuerpos monoclonales de R&D Systems. Para cada quimiocina, se realizó el siguiente procedimiento que consta de sensibilización de las placas para ELISA con el anticuerpo de captura, bloqueo de los sitios libres, captura del antígeno, unión del segundo anticuerpo biotinilado, unión del complejo estreptavidin-peroxidasa y revelado con la mezcla de sustrato cromógeno (Fig. 18). En primer lugar se sensibiliza la placa de ELISA (96 pozos, NUNC) con 100 μ L del anticuerpo de captura a una concentración de 2 μ g/mL en buffer de carbonatos, incubando a 4 °C toda la noche. Los anticuerpos de captura usados fueron para la IL-8, el MAB208; para GRO α , el MAB 275, y para ENA-78, el MAB654, los tres de R&D Systems. Al día siguiente, se lava la placa 4 veces con 300 μ L de PBS-Tween 20 al 0.05% por pozo, en el último lavado se escurre la placa sobre una toalla de papel. Se adicionan 300 μ L de una solución de albúmina sérica bovina al 1 % en PBS y se incuba durante 2 hrs. a temperatura ambiente. Se vuelve a lavar con PBS-Tween 4 veces. Se adicionan 100 μ L por pozo de cada muestra y estándares y se incuba a 4 °C durante toda la noche. Los estándares utilizados fueron para IL-8 el 208-IL, GRO α el 275-GR, y ENA-78 el 254-XB, de nuevo los tres de R&D Systems. Se vuelve a lavar con PBS-Tween 4 veces, se adicionan 100 μ L por pozo del anticuerpo biotinilado en una concentración de 1.5 μ g/ml y se incuba la placa durante 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos biotinilados fueron anti-IL-8 BAF 208, GRO α BAF 275, ENA-78 BAF254 los tres de R&D Systems. Se vuelve a lavar con PBS-Tween 4 veces, se adicionan 100 μ L por pozo de estreptavidín-peroxidasa (Sigma, S5512.) en una dilución 1:2000 y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente. Se vuelve a lavar con PBS-Tween 4 veces, se adicionan 100 μ L por pozo del sustrato-cromógeno

peróxido de hidrógeno-TMB (Sigma) y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente. Se detiene la reacción con 50 μ l de ácido sulfúrico 0.2 M por pozo y se lee a 450 nm en un lector de ELISA (Benchmark, Bio-Rad).

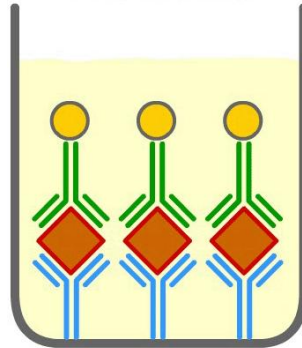


Figura 18. Esquema del ELISA. Se representan en el esquema de arriba hacia abajo la estreptavidín-peroxidasa (en amarillo), el anticuerpo biotinilado (en verde), la citocina a detectar o el estándar de la curva (en rojo) y el anticuerpo de captura (en azul), todo en el pozo de la caja múltiple de 96 (Laumer y Hammar 2012).

10 Ensayo de quimiotaxis

A las muestras de la HPLC también se les realizaron ensayos de quimiotaxis para determinar si las fracciones separadas presentaban factores quimiotácticos. Para esto se purificaron neutrófilos de sangre periférica humana, y los ensayos se realizaron en cámaras de Boyden (Neuroprobe, BW25). A un voluntario sano se le tomaron 8 mL de sangre periférica por punción venosa en condiciones asépticas. En tubo de centrifuga de 15 mL (Falcón) se colocaron 4 mL de Polymorphprep® (Axis-Shield, Noruega) y encima se colocaron los 8 mL de sangre total diluidos con 4 mL de PBS. Se centrifugó a 700 g durante 40 min a 20 °C. Con la centrifugación se forman 2 bandas blancas, la banda inferior está compuesta principalmente por neutrófilos (véase la Fig. 19).

Para preparar la curva estándar de neutrófilos, se llevan éstos a una concentración de 300,000 cel/mL de medio RPMI (Sigma) con 10 % de SFB (Invitro) y en una placa de 96 pozos se procede a poner por duplicado 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 μ l. Se añade 100 μ l por pozo de Triton X al 1% (Sigma) y se incuba 10 min. a 37 °C a continuación se le agrega el sustrato de la beta-glucuronidasa de los neutrófilos, el p-nitrofenol- β -D-glucurónico (Sigma) 100 μ l por pozo y se incuba a 37 °C por 18 hrs. Pasado el tiempo se detiene la reacción con 50 μ l de glicina (sigma) 0.4 M pH 10.3 por pozo y se lee a 460 nm en lector de ELISA.

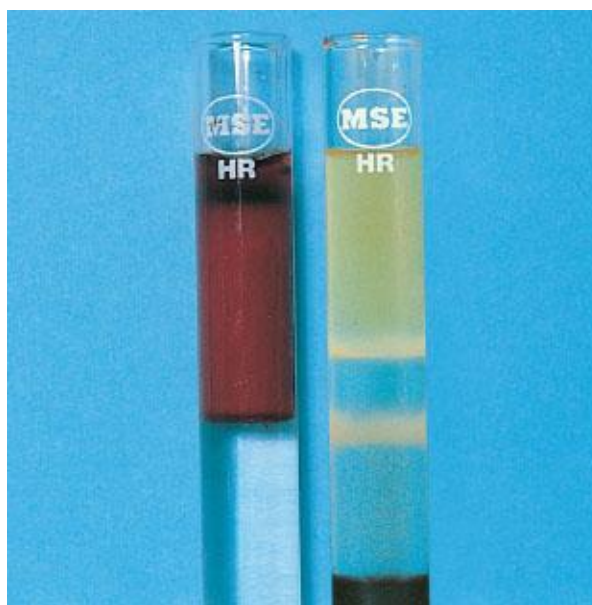


Figura 19. Purificación de neutrófilos. A partir de sangre periférica (a la izq.) se realiza una centrifugación en gradiente. Con esto se separan dos bandas de leucocitos (a la der.), una superior de células mononucleares, que queda abajo del plasma, y una inferior de células PMN que consiste principalmente en neutrófilos.

En un cámara de Boyden con pozo inferior de 4.7 mm de diámetro, se colocan 25 μ l de muestra en el compartimiento de la base, arriba de la muestra se coloca un filtro de policarbonato (Millipore) de 13 mm de diámetro y poros de 5 μ m de diámetro, se ensambla la cámara y en el compartimiento superior se colocan 100 μ l de la suspensión fresca de neutrófilos (30,000 cel). La cámara se incuba durante 1 hr a 37 °C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂. Pasado el tiempo se retira cuidadosamente la suspensión, se abre la cámara y se retira con cuidado el filtro, la suspensión de la cámara inferior se coloca en un pozo de una placa de 96 pozos, se añade 100 μ l por pozo de Triton X 1% en PBS y se incuba 10 min a 37 °C, a continuación se le agrega a cada pozo 100 μ l de p-nitrofenol- β -D-glucurónico y se incuba a 37 °C por 18 hrs. Pasado el tiempo se detiene la reacción con 50 μ l de glicina (Sigma) 0.4 M pH 10.3 por pozo y se lee la placa a 460 nm en lector de ELISA.

11 Análisis estadístico

Se analizaron los resultados mediante la prueba *t de Student* para buscar diferencias significativas entre grupos dependientes, y se utilizó la prueba de *Kruskal-Wallis* cuando se compararon grupos de resultados cuya distribución no se podía asumir que fuera normal. Se utilizó regresión lineal simple y la prueba de sumas de rangos de *Spearman* para buscar

correlaciones, entre niveles de quimiocinas, neutrófilos reclutados, escala de síntomas y otras variables. Se utilizó el programa SPSS 12.0.

VII RESULTADOS

Inmunofluorescencia.

Como primer paso se determinaron los virus causantes de las infecciones de los niños mediante tres técnicas conocidas, inmunofluorescencia indirecta, cultivo de tejidos y PCR. La inmunofluorescencia fue aplicada de manera directa a 30 frotis realizados con los aspirados nasales de los niños con sintomatología respiratoria, se encontraron 18 muestras positivas a virus. Los virus observados fueron: 4 virus de influenza A, 3 de influenza B, 5 de parainfluenza, 3 virus sincitiales respiratorios y 3 adenovirus. La Fig. 20 presenta dos muestras positivas una para el virus de la influenza y la otra para el virus sincitial respiratorio.

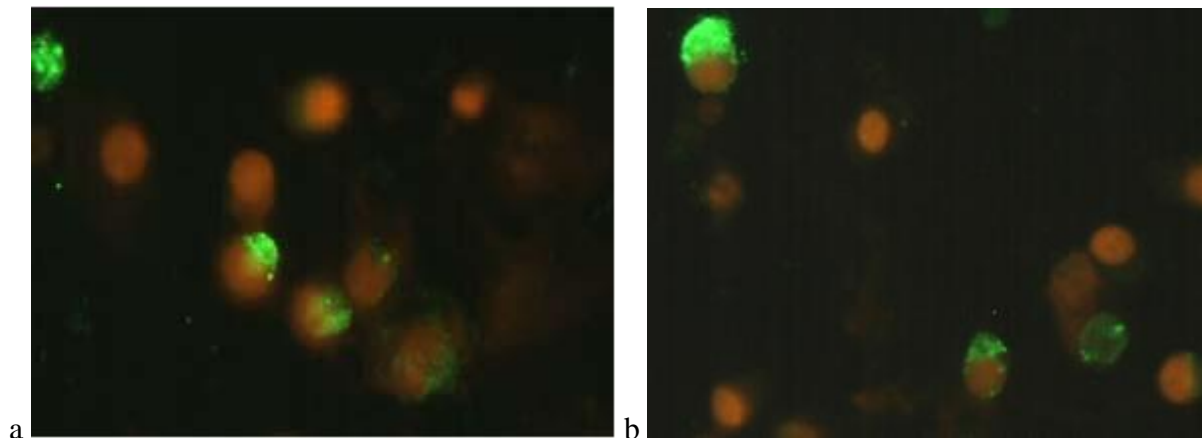


Figura 20. Inmunofluorescencia para el diagnóstico viral. Aspecto de dos muestras de aspirado nasal de niños con enfermedad respiratoria que salieron positivas a infección viral. a) Células infectadas por virus de influenza A estacional. b) Células positivas a virus sincitial respiratorio. Las células infectadas se ven de color verde limón brillante, los núcleos resaltan en rojo debido al azul de Evans.

Aislamiento viral

Con las 12 muestras negativas para la inmunofluorescencia, se intentó el aislamiento viral en cultivo de células, dado que este método amplifica cualquier virus infeccioso que se pudiera encontrar en la muestra. Con éste método se encontraron otras 4 muestras positivas a la infección, de las cuales 2 fueron del virus de influenza, y 2 del virus sincitial respiratorio. La Fig. 21 muestra un cultivo negativo y otro positivo para aislamiento de virus.

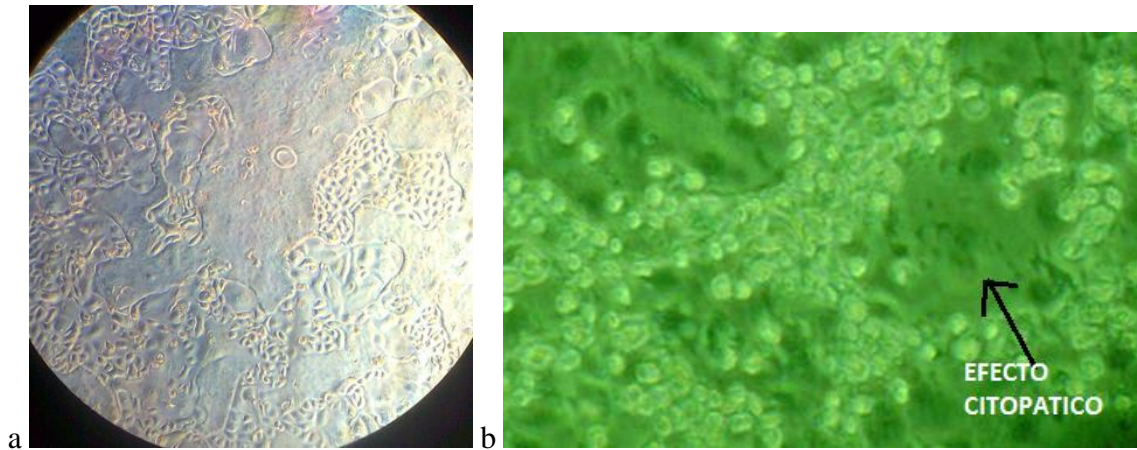


Figura 21. Aislamiento de virus en cultivo de células. a) Células MDCK y Hep-2 crecidas en monocapa combinada y negativas a virus. b) Efecto citopático de virus de influenza A en células MDCK, es evidente el redondeamiento y desprendimiento de células.

RT-PCR

Mediante la a prueba de RT-PCR complementamos las observaciones realizadas con la inmunofluorescencia para la detección de virus en las muestras clínicas. Esta técnica detectó rinovirus en 8 muestras de aspirados nasales. La Fig. 22 presenta un gel de agarosa con las bandas típicas para muestras testigo. Los cebadores OL26 y OL27 amplifican un segmento de 380 pb.

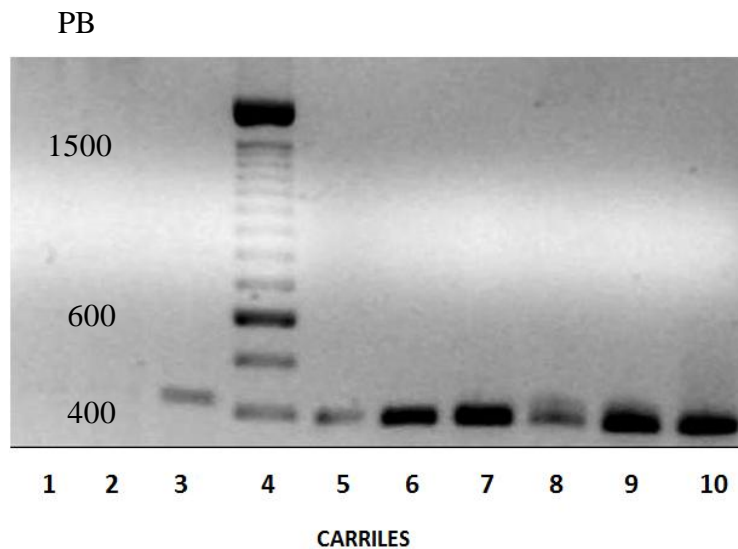


Figura 22. Electroferograma de una PCR para detección de rinovirus. El amplímero producido por la reacción tiene una longitud de 380 pb y su posición se indica con la flecha. En los carriles: 1 y 2 corrieron 2 muestras que salieron negativas; en el carril 3 corrió un control de un gen constitutivo, el de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (430 pb); el carril 4 muestra los marcadores de pesos moleculares, el estándar de 600 pb

se encuentra sobreteñido para resaltarlo; los carriles 5-9 corresponden a muestras positivas y el carril 10 es un control positivo, virus cultivado en el laboratorio.

Diagnóstico viral

En total se detectaron 30 virus en las muestras. Los virus más frecuentes fueron los rinovirus con 8 casos y los virus de influenza A con 6 (Fig. 23).

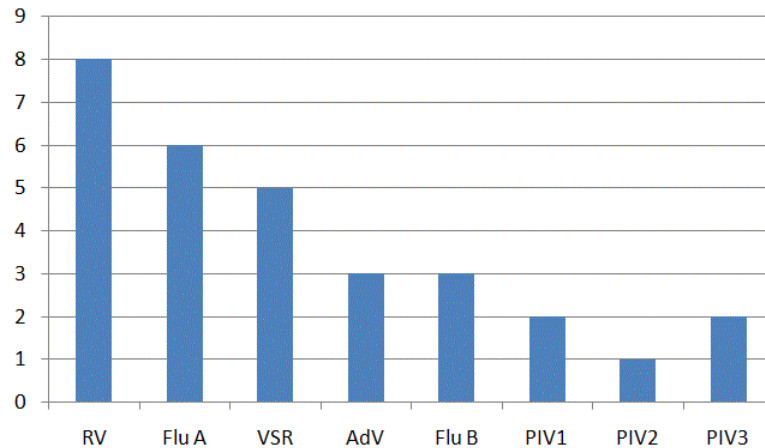


Figura 23. Frecuencia de virus detectados en 30 muestras clínicas de niños con infección respiratoria.

Además la mayor parte de las muestras provinieron de niñas como se presenta en la Fig. 24a. Y el grupo de edad con mayor número de virus identificados fue el de 7-8 años Fig. 24b

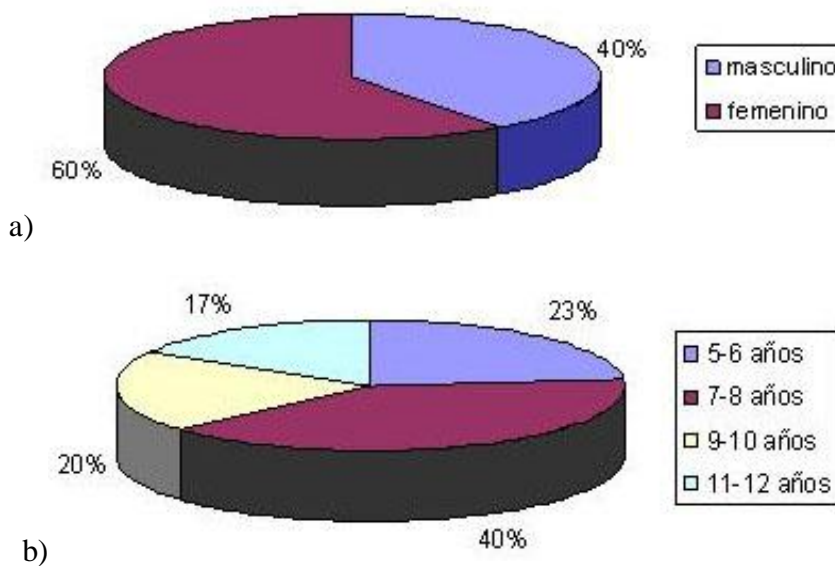


Figura 24. Porcentajes de infecciones virales detectadas en los niños de acuerdo con el género (a) y con la edad (b).

Síntomas

Los registros diarios de síntomas de los niños mostraron que hay mayor predominio de síntomas del tracto respiratorio superior: secreción nasal, congestión nasal, garganta inflamada y tos. Es decir, los síntomas de vías respiratorias altas fueron muy comunes. Por su parte los síntomas de vías bajas como sibilancias, dolor de tórax y dificultad al respirar fueron menos frecuentes. Y los síntomas sistémicos como fiebre malestar general fueron escasos en este estudio (Fig. 25).

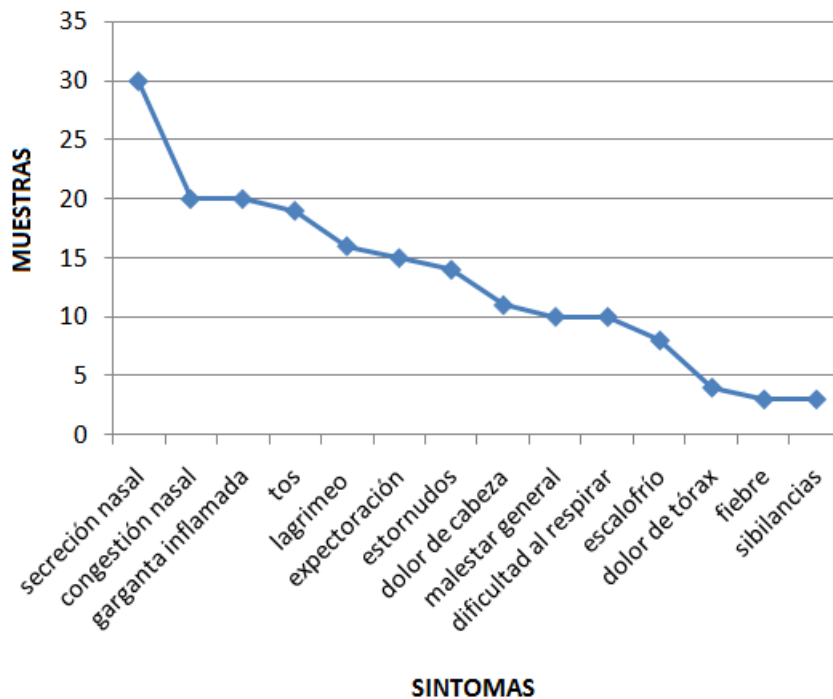


FIGURA 25. Síntomas típicos del resfriado, presentados por una cohorte de niños escolares con enfermedad respiratoria viral.

Conteo diferencial

Una vez que se contó con la información sobre los virus que produjeron los cuadros, se procedió a determinar los tipos celulares reclutados en la secreción nasal de los niños con ERV. Los resultados de la cuenta diferencial fueron: neutrófilos 81.7 %, linfocitos 12 % y macrófagos 5.4 %. Las células epiteliales se presentaron como un 0.8 % de las células presentes en la muestra. La Fig. 26 muestra una de las laminillas al microscopio y la Fig. 27 muestra los porcentajes de neutrófilos, macrófagos y linfocitos observados en las 30 muestras

de niños con infección viral comprobada. La Tabla 1 presenta la cantidad de células contadas por mL de muestra.

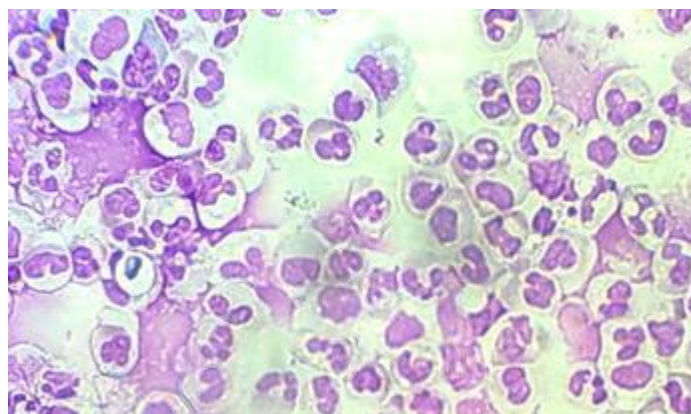


Figura 26. Reclutamiento de neutrófilos en secreción nasal de niños con infección respiratoria. Aspecto de una muestra de secreción nasal de un niño con infección por virus de la influenza A. La muestra se extendió en portaobjeto mediante citospín marca) y se tiñó con hematoxilina-eosina. Son evidentes los núcleos característicos de los neutrófilos (1000 aumentos).

Tabla 1. Número de células en 30 muestras de aspirados nasales de niños con infección viral respiratoria.

	Con virus células/mL (rango) (x 10 ³)	Asintomáticos células/mL (rango) (x10 ³)
Linfocitos	105 (0-430)	0.8 (0.6-8.0)
Neutrófilos	1,600 (35-6,600)	5 (2.2-12.4)
Macrófagos	235 (0-890)	2 (0.8-4.6)
Células epiteliales	17 (0-48)	5.8 (2.5-25)

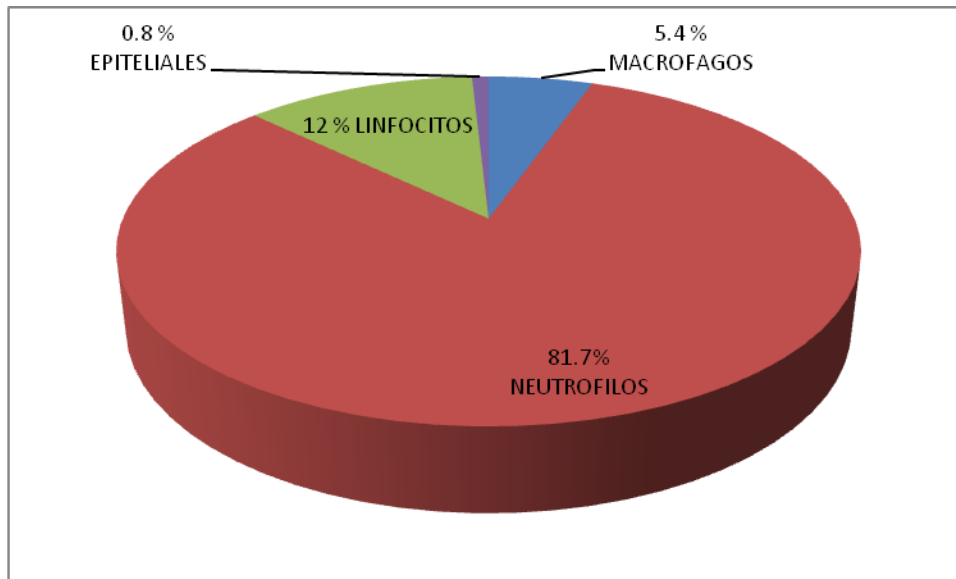


Figura 27. Porcentajes de células en 30 muestras de aspirados nasales de niños con infección viral respiratoria.

Identificación de los factores quimiotácticos de neutrófilos en secreciones respiratorias de niños con infección viral

Una vez caracterizadas las células reclutadas en la secreción nasal de los niños con ERV, se determinó la actividad de factores quimiotácticos y al mismo tiempo se les separó mediante la HPLC. Para esto se preparó un homogeneizado (*pool*) de 20 muestras y se corrió en la prueba. La Fig. 28 muestra la gráfica de los resultados de quimiotaxis de las fracciones de la cromatografía. En la gráfica se observa que hay al menos 6 picos de actividad quimiotáctica en el homogeneizado de muestras tomadas al azar, en comparación con tres picos que se observaron al probar las fracciones en quimiotaxis para macrófagos (datos no presentados). Al realizar los ELISA para IL-8, GRO-alfa y ENA-78, se observó inmunorreactividad positiva en dos de los picos. El pico de la fracción 29 dio positivo para GRO-alfa, y el 31 para IL-8 y a ENA-78 que se encontraron traslapadas en el cromatograma.

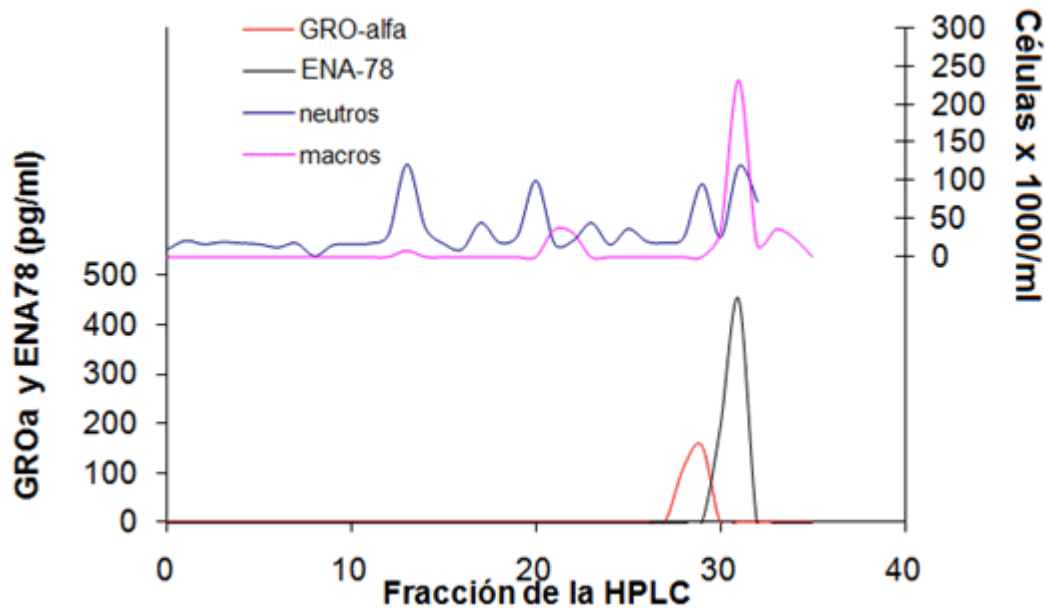


Figura 28. Quimiotaxis e inmunorreactividad de las fracciones de cromatografía líquida de alta resolución. En la parte superior se observa la quimiotaxis inducida por las fracciones, en azul la quimiotaxis de neutrófilos (neutros) y en violeta la de macrófagos (macros) en una prueba comparativa. Se observan 7 picos de actividad quimiotáctica para neutrófilos y para macrófagos de manera comparativa 3. En la parte inferior se observa la reacción positiva que dieron los picos 29 a GRO-alfa, y el 31 a ENA-78. IL-8 da reacción positiva en el pico 31, no obstante esta quimiocina ya se ha reportado con anterioridad que se produce en la mucosa respiratoria durante una infección viral (Teran *et al.* 1997).

Niveles de quimiocinas durante la infección viral respiratoria

Una vez confirmada la presencia de la IL-8, ENA-78 y GRO-alfa en el homogeneizado de muestras, el siguiente paso fue determinar los niveles de las quimiocinas en cada una de las muestras. El nivel de IL-8 para las muestras con infección viral fue en promedio de 651.8 pg/mL \pm 501.1 (promedio \pm desviación estándar) y para las muestras testigo de 78.31 pg/mL \pm 64.21 (Fig. 29). Para ENA-78 fueron de 11,749 pg/mL + 9,782 DE en las muestras de los niños con infección, y de 786 pg/mL \pm 845 en las muestras testigo (Fig. 30). Para GRO-alfa los niveles fueron de 2,635 pg/mL \pm 2,651 en las muestras con infección viral y de 443 pg/mL + 419 en las muestras testigo (Fig. 31). Con las tres quimiocinas se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre muestras con infección viral y muestras asintomáticas ($p < 0.05$ Kruskal-Wallis).

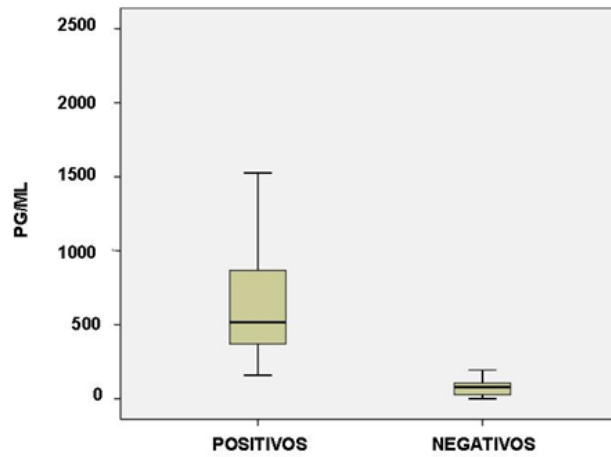


Figura 29. Niveles de IL-8 en sobrenadantes de aspirados nasales de niños con infección viral respiratoria. Las muestras clínicas (positivas) presentaron diferencia significativa comparadas con muestras asintomáticas (negativas) ($p < 0.05$, Kruskal-.Wallis).

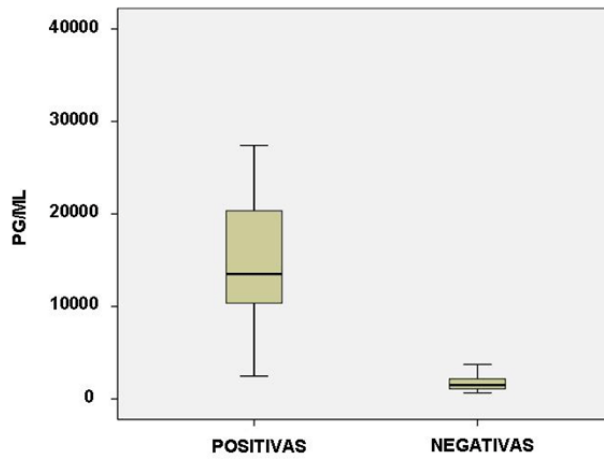


Figura 30. Niveles de ENA-78 en sobrenadantes de aspirados nasales de niños con infección viral respiratoria. Los niveles fueron más elevados cuando se compararon con muestras testigos de los mismos niños tomadas durante un periodo asintomático ($p < 0.05$, Kruskal-.Wallis).

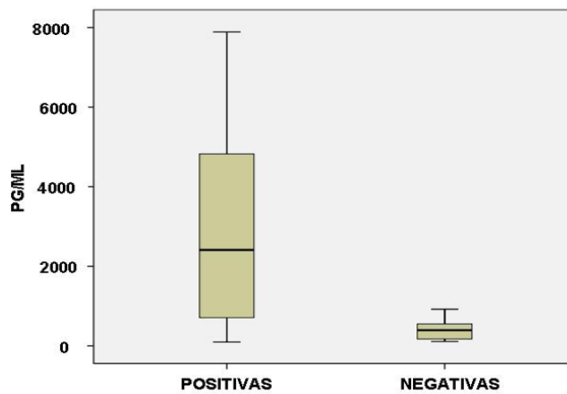


Figura 31. Niveles de GRO-alfa en sobrenadantes de aspirados nasales de niños con infección viral respiratoria. Los niveles fueron más elevados cuando se compararon con muestras testigos de los mismos niños tomadas durante un periodo asintomático ($p < 0.05$, Kruskal-.Wallis).

Correlación entre niveles de quimiocinas y cantidad de neutrófilos en secreción nasal

Con la idea de determinar la importancia de las tres quimiocinas, IL-8, GRO-alfa y ENA-78, en el reclutamiento de los neutrófilos durante la infección viral respiratoria. Se analizó la posible correlación entre los niveles de dichas quimiocinas y el número de neutrófilos presente en las muestras de secreción nasal de los niños con infección viral respiratoria. Las tres quimiocinas presentaron factores significativos de correlación con la cantidad de células (Figs. 32, 33 y 34).

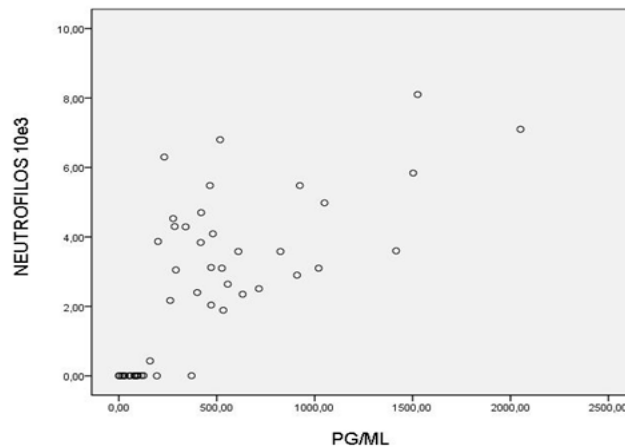


Figura 32. Correlación entre los niveles de IL-8 y la cantidad de neutrófilos en muestras de aspirados nasales de niños con infección viral respiratoria. Se encontró, un coeficiente de 0.750 con una $p < 0.001$.

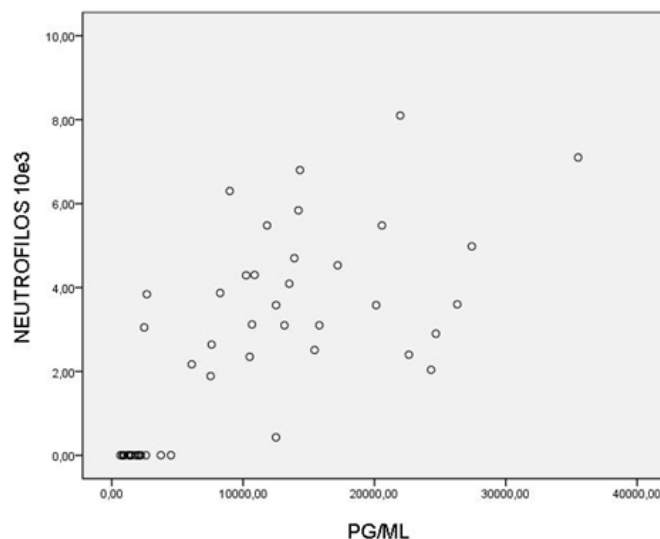


Figura 33. Correlación entre ENA-78 y cuenta de neutrófilos, se encontró un coeficiente de 0.697 y una p menor a 0.001.

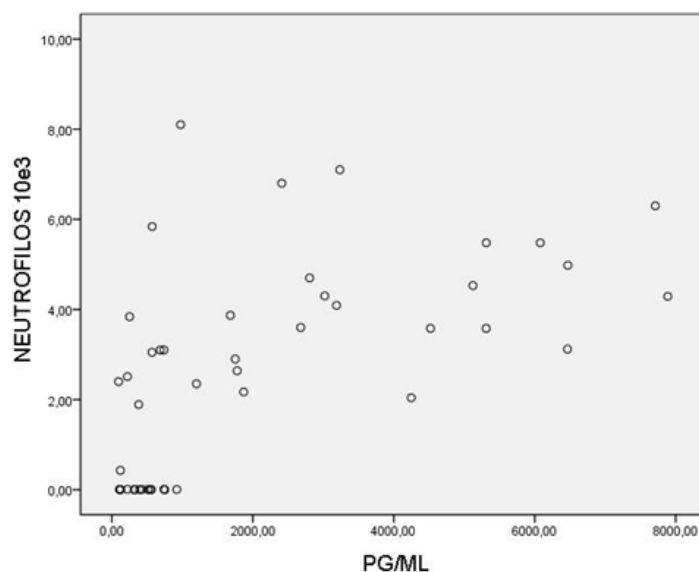


Figura 34. Correlación entre GRO-alfa y cuenta de neutrófilos. Se encontró un coeficiente de 0.590 y una p menor a 0.001.

VIII DISCUSION

De manera general, en este trabajo se estudió la importancia del reclutamiento de neutrófilos durante la infección viral respiratoria. Se encontró que los virus más frecuentes en un grupo de niños escolares fueron los rinovirus y los virus de influenza A. Por su parte, los neutrófilos fueron las células reclutadas en mayor proporción en las muestras nasales de niños con infección viral respiratoria. También se encontró que al menos tres quimiocinas se elevan durante la ERV: ENA78 y GRO α e IL-8. Este es el primer trabajo que informa sobre elevados niveles de ENA78 y GRO α , y confirma la observación de que IL-8 se eleva durante ERV. Estas quimiocinas que se caracterizan por reclutar neutrófilos en los ensayos *in vitro* en cámaras de Boyden (Rollins 1997, Luster 2001), así que este trabajo aporta datos que apoyan la importancia de los neutrófilos, durante la respuesta inicial del sistema inmunitario humano contra los virus respiratorios, así como la de las quimiocinas que reclutan neutrófilos.

En primer lugar, en este estudio se utilizaron técnicas de detección de virus ampliamente citadas en la literatura, que se sabe se complementan entre sí para detectar la mayor cantidad posible de muestras positivas en estudios de virus respiratorios. La técnica de inmunofluorescencia indirecta tiene una buena sensibilidad, es relativamente económica y rápida, y detecta una elevada proporción de virus en muestras respiratorias, en este trabajo con esta técnica se detectó la mayoría de los virus reportados (18/30) y combinada con el

aislamiento viral detectó 22 virus en el 33.3 % (22/60) de las muestras estudiadas, este dato se encuentra ubicado en la parte intermedia del rango de detección de otros trabajos que utilizan la inmunofluorescencia indirecta, los cuales informan que los virus causan elevados porcentajes de infección respiratoria; no obstante, dichos trabajos utilizan un mayor número de muestras. Al agregar los rinovirus (8) detectados por RT-PCR, el porcentaje de virus detectados se eleva a 50 % (30/60), valor aproximado al que observan Marcone *et al.* (2012) quienes hicieron un estudio etiológico bastante completo, la principal diferencia con este trabajo es que los autores estudiaron niños menores de 3 años con IRA. En el aspecto epidemiológico la contribución del presente trabajo es relativa pero no por ello deja de ser una significativa contribución, en primer lugar usa una muestra bastante menor que en trabajos previos, pero en cambio sugiere que los rinovirus también son importantes agentes causales de infección viral respiratoria en nuestro país lo cual no ha sido ampliamente confirmado, como se ha demostrado en otras latitudes (Feikin *et al.* 2012, Marcone *et al.* 2012, Alborzi *et al.* 2009, y Barbani y Gorgievski-Hrisoho 2009).

En nuestro grupo de estudio observamos un mayor número de muestras positivas a rinovirus e influenza, esto se puede deber a que ambos virus son muy frecuentes en la población pediátrica mexicana (Kelly y Busse 2008, Mermond *et al.* 2012). Cabe mencionar que un importante número de muestras permaneció negativo a la detección viral en nuestro estudio, esto tal vez se deba a que no se estudiaron otros virus que son frecuentes, principalmente coronavirus y los virus emergentes, metapneumovirus humano y bocavirus (Pyrce *et al.* 2007, Kim *et al.* 2010, Schildgen *et al.* 2008). Es lógico pensar que si se hubiera aplicado la detección de estos virus el número de muestras se hubiera aumentado substancialmente, aunque para estos virus no existen técnicas de inmunofluorescencia comerciales o las que se han probado son de baja sensibilidad, además el aislamiento de estos últimos virus es difícil (Greenberg 2007, Broor *et al.* 2008, Schildgen *et al.* 2008). Sólo existe un sistema comercial para la detección de un número mayor de virus respiratorios y que incluye al metapneumovirus y a los coronavirus, es una PCR múltiple (Seplex de Seegen) que discrimina los virus de acuerdo con las diferentes longitudes de los amplímeros sintetizados; sin embargo, este sistema es caro, laborioso y necesita de instalaciones más sofisticadas, lo cual hace inaccesible su aplicación práctica en la clínica. En los trabajos donde se ha estudiado un mayor número de muestras con técnicas más completas, se ha encontrado que los virus más frecuentes son los rinovirus y los virus de influenza A (Zhang *et al.* 2012, Albuquerque *et al.* 2012) como se observó en esta tesis.

En la mayoría de los reportes histopatológicos de la infección viral de vías bajas se describen infiltrados de PMN como componentes principales, sobre todo neutrófilos. Por ejemplo, los virus RSV (Bataki et al. 2005), influenza (Damjanovic et al. 2012), virus de parainfluenza (Srinivasan et al. 2011) y adenovirus inducen infiltrados de abundantes PMN; no obstante, son pocos los trabajos que estudian la mucosa nasal durante la infección viral (Turner et al. 2005). Dado que los neutrófilos aparecen en otros trabajos como una de las principales estirpes de leucocitos que se presenta durante la inflamación, y dado que la cantidad de estas células o su actividad correlacionan con la gravedad de los síntomas en el SARS (Tang et al. 2005), la exacerbación de asma por infección con rinovirus (Wark et al. 2002), y la bronquiolitis por RSV (Bataki et al. 2005), uno de los principales objetivos de este trabajo fue demostrar si estas células son reclutadas en la mucosa nasal durante la infección viral, y encontrar los factores quimiotácticos responsables de su reclutamiento. Las cuentas diferenciales de las muestras de secreción nasal de los niños de este estudio demostraron que la mayoría de las células reclutadas durante la infección viral fueron neutrófilos (Fig. 27), lo cual refuerza las observaciones previas. En cuanto a las quimiocinas que reclutan neutrófilos, son numerosas las referencias sobre la producción de IL-8 durante la infección por virus respiratorios; como ejemplos se mencionan algunos trabajos en modelos *in vitro* (Arnold et al. 1994, Wiehler y Proud 2007), animales de experimentación (Van Reeth 2000, Mejías *et al.* 2007) y en estudios en el ser humano (Noah y Becker 2000, Terán *et al.* 1997). Los datos del presente trabajo confirman la importancia de la IL-8, ya que en esta tesis también se observaron niveles aumentados de esta quimiocinas en las secreciones de los niños con la ERV. Acerca de otras quimiocinas que reclutan neutrófilos, los trabajos que han buscado las quimiocinas ENA-78 y GRO-alfa en el modelo natural de la ERV son limitados. En este trabajo se observó la presencia de estas dos quimiocinas en la cromatografía de HPLC (Fig. 28) de un homogeneizado de 20 muestras tomadas al azar, lo cual llevo a buscar sus niveles en las muestras individuales. En éstas se observaron significativos aumentos en los niveles de estas dos quimiocinas (Figs. 30 y 31). Además tales niveles correlacionaron significativamente con la presencia de los neutrófilos en las muestras de secreción nasal (Figs. 33 y 34) lo mismo que la IL-8. Juntos, estos resultados sugieren fuertemente la importancia de los neutrófilos y las quimiocinas que reclutan neutrófilos, en particular IL-8, ENA-78 y GRO α , en la defensa contra la infección por los diferentes virus respiratorios. Estos trabajos sugieren que las actividades microbicidas de los neutrófilos, lo mismo que sus actividades de procesamiento y presentación de antígenos son indispensables para el desarrollo de la

respuesta inmunitaria adaptativa, en particular la estimulación de linfocitos a través de la estimulación de los receptores de linfocitos T (TCR) y B (BCR) (Ishikawa y Miyazaki 2005).

Este trabajo además abre nuevas posibilidades relacionadas con el tratamiento de una enfermedad que es universal y para la cual no existen muchas alternativas, dos tipos de antivirales contra el virus de la influenza (Hayden 2006) y uno contra el RSV (Empey *et al.* 2010), y no existen vacunas suficientes, sólo vacuna contra el virus de la influenza estacional, ya que contra el virus pandémico la producción oportuna de la vacuna presenta obstáculos insuperables (de Jong y Sanders 2009). Se podrían diseñar fármacos que actuaran, por ejemplo, en la modulación de la producción de las quimiocinas que reclutan neutrófilos y así poder disminuir el reclutamiento masivo de éstas células, las cuales además son responsables de la mayor parte del daño en el sitio de reclutamiento, expanden la respuesta inflamatoria, y provocan la sintomatología típica de la enfermedad, y en cambio aumentar la estimulación de células innatas que se sabe desarrollan una respuesta antiviral más eficiente como las células asesinas naturales (NK) o las células T asesinas naturales (NKT). Esto se lograría a través de la inmunomodulación como se está intentando ya, en otros modelos de enfermedad como el cáncer y el asma (**Homey et al. 2002, Kelly y Busse 2008**).

IX CONCLUSIONES

Con base a las principales observaciones de este trabajo se concluye que:

1.- La población más abundante en secreciones nasales de niños con ERV son los neutrófilos, los cuales a pesar de que son la primera línea defensiva, se encuentran entre las células que más daño pueden causar, ya que su respuesta se encuentra relacionada con exacerbaciones de asma y EPOC, en complicaciones que pueden ser mortales.

2.- Los linfocitos y los macrófagos también constituyen proporciones significativas de las células reclutadas durante la infección viral respiratoria.

3.- Las quimiocinas ENA-78 seguida de GRO-alfa e IL-8 se encuentran elevadas durante una infección viral respiratoria en niños escolares.

4.- Los niveles de ENA-78, GRO α e IL-8 correlacionan con los neutrófilos reclutados en la mucosa nasal.

5.- Los datos presentados en este trabajo apoyan fuertemente la importancia de las quimiocinas que reclutan neutrófilos durante la respuesta inmunitaria temprana contra la infección viral, y abre la posibilidad de nuevas opciones en el tratamiento de infecciones virales, a través de la modulación de la respuesta del hospedero ante la infección, como se ha realizado en otros modelos de enfermedad.

X BIBLIOGRAFÍA

1. Abbadie C. 2005. Chemokines, chemokine receptors and pain. *Trends Immunol.* 26:529-534.
2. Adegbola RA. 2012. Childhood pneumonia as a global health priority and the strategic interest of the Bill & Melina Gates Foundation. *Clin Infect Dis.* 54:S89-92.
3. Alborzi A, Aelami MH, Ziyaeyan M, Jamalidoust M, Moeini M, *et al.* 2009. Viral etiology of acute respiratory infections among Iranian Hajj pilgrims, 2006. *J Travel Med.* 16:239-42.
4. Albuquerque MC, Varella RB, Santos N. 2012. Acute respiratory viral infections in children in Rio de Janeiro and Teresópolis, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 54:249-55.
5. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, *et al.* 2005. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep 6;102(36):12891-6.
6. Anja wuyts et al 1999 Isolation of the CXC chemokines ENA-78, GRO- α and GRO- γ from tumor cells and leukocytes reveals NH₂-terminal heterogeneity. *Eur J Biochem.* 260:421-429
7. Arnold R Humbert B, Werchau H, Gallati H y Konig W. 1994. Interleukin-8, interleukin-6 and tumour necrosis factor receptor type I release from a human pulmonary epithelial cell line (A549) exposed to respiratory syncytial virus. *Immunol.* 82:126-33.
8. Barbani MT, Gorgievski-Hrisoho M. 2009. Rapid detection of respiratory picornaviruses in nasopharyngeal aspirates by immunofluorescence assay. *J Clin Virol.* 45:245-8.
9. Bataki EL, Evans GS, Everard ML. 2005. Respiratory syncytial virus and neutrophil activation. 2005. *Clin Exp Immunol.* 140:470-7.
10. Becker S, Koren H.S. Henke D.C. 1993 Interleukin-8 expression in normal nasal epithelium and its modulation by infection with respiratory syncytial virus and cytokines tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6 *Am J Respir Cell Mol Biol* 8:20-27

11. Biagioli MC, Kaul P, Singh I, Turner RB. 1999. The role of oxidative stress in rhinovirus induced elaboration of IL-8 by respiratory epithelial cells. *Free Radical Biol Med.* 26:454-462.
12. Biagioli MC, Kaul P, Singh I, Turner RB. 1999. The role of oxidative stress in rhinovirus induced elaboration of IL-8 by respiratory epithelial cells. *Free Radic Biol Med.* 26(3-4):454-62.
13. Borregaard N, Cowland JB. 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 15:89:3503-21.
14. Bouvier NM, Palese P. 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26 Suppl 4:D49–53.
15. Brooks GF. 2008. Microbiología Médica de Jawetz VI Ed. México. Editorial Manual Moderno, pp. 485-493.
16. Broor S, Bharaj P, Chahar HS. 2008. Human Metapneumovirus: A new respiratory pathogen. *J Biosc.* 33:483-493.
17. Camarek DH. 2001. Histologia de Ham Edit Harla Mexico.
18. Castilla AJD. 2011. Investigan virus causantes de muertes infantiles: UV. Código Crítico, 2011. <http://codigocritico.com.mx/nota.php?id=5398>
19. Cherry JD, Nievas DJ. 2005. The Commun Cold. En: Fiegin RD, Cherry JD (eds.). Textbook of pediatric infectious diseases. V Edic. Philadelphia:WB Saunders Co., Vol 1:137-270.
20. Collins PL, Graham BS. 2008 Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Virol.* 82:2040-2055.
21. Crofton J. Douglas A. 1981. Respiratory diseases. III ed. Oxford Blackwell Scientific Publications.
22. Damjanovic D, Small CL, Jeyanthan M, McCormick S, Xing Z. 2012. Immunopathology in influenza virus infection: uncoupling the friend from foe. *Clin Immunol.* 144:57-69.
23. De Almeida MB, Zerbinati RM, Tateno AF, Oliveira CM, Romao RM, *et al.* 2010. Rhinovirus C and respiratory exacerbations in children with cystic fibrosis. *Emerg Infect Dis.* 16:996-9.
24. de Jong, Sanders. 2009. The future of influenza vaccines. *Brit Med J.* 339:815-6.
25. De Souza AV, Ribeiro FSFLV, Pannuti CS. 2009. Avaliação da prevalência de bocavírus humano em crianças com infecção respiratória aguda. Centro de Pesquisa Experimental. Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein, Sao Paulo, Brazil. <http://www.einstein.br/Pesquisa/pesquisa-experimental/linhas-de-pesquisa/infectologia/Paginas/avaliacao-da-prevalencia-de-bocavirus-humano-em-criancas-com-infeccao-respiratoria-aguda.aspx>

26. Detmers PA, Powell DE, Walz A, Clark-Lewis I, Baggiolini M, *et al.* 1991. Differential effect of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 and its homologues on leukocytes adhesion and phagocytosis. *J Immunol.* 147: 4211-4217.
27. Donninger H, Glashoff R, Haitchi HM, Syce JA, Ghildyal R, *et al.* 2003. Rhinovirus induction of the CXC chemokine epithelial-neutrophil activating peptide-78 in bronchial epithelium. *J Infect Dis.* 187:1809-17.
28. Dreschers S, Dumitru CA, Adams C, Gulbins E, 2007. The cold case: Are rhinoviruses perfectly adapted pathogens? *Cell Mol Life Sci.* 64:181-91.
29. Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt H-R, *et al.* 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 348:1967-76.
30. Eccles R. 2005. Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *Lancet Infect Dis.* 5:718–25.
31. Empey KM, Peebles RS Jr, Kolls JK. 2010. Pharmacologic advances in the treatment and prevention of respiratory syncytial virus. *Clin Infect Dis.* 50:1258-67.
32. Enciclopedia Médica en Línea 2012. Adenovirus. <http://www.ferato.com/wiki/index.php/Adenovirus>.
33. Faurschou M, Borregaard N, 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation *Microbes. Infect.* 5:1317-1327.
34. Feigin y Cherry 2004. Textbook of pediatric infectious diseases. V ed. Philadelphia:WB Saunders, 2005; Vol. 1:137-270.
35. Feikin DR, Njenga MK, Bigogo G, Aura B, Aol G, *et al.* 2012. Etiology and incidence of viral and bacterial acute respiratory illness among older children and adults in rural Western Kenya, 2007-2010. *PLoS One.* 7:e43656.
36. Fibbi B, Penna G, Morelli A, Adorini L, Maggi M. 2010. Chronic inflammation in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Int J Androl.* 33:475-88.
37. Folkerts G, Busse WW, Nijkamp FP, Sorkness R, Gern JE, 1998. Virus-induced airway hyperresponsiveness and asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 157:1708-20.
38. Gefor. 2012. Grupo de estudio para la formación y docencia en enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Virus de la gripe. Imágenes influenza virus. <http://www.gefor.4t.com/virus/influenza.html>
39. Gern JE, Busse WW. 1999. Association of rhinovirus infections with asthma. *Clin Microbiol Rev.* 12:9-18.
40. Graves DT, Jiang Y, Chemokines, 1995 A family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med.* 6:109-118.
41. Greenberg SB. 2007. Rhinovirus and coronavirus infections. *Semin Respir Crit Care Med.* 28:182-92.

42. Gu J, Korteweg C, 2007 Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Am J Pathol.* 170:1136-47.
43. Hammitt LL, Kazungu S, Morpeth SC, Gibson DG, Mvera B, *et al.* 2012. A preliminary study of pneumonia etiology among hospitalized children in Kenya. *Clin Infect Dis.* 54 Suppl. 2:S190-9.
44. Hattori H, Subramanian KK, Sakai J, Luo HR. 2010. Reactive oxygen species as signaling molecules in neutrophils chemotaxis. *Commun. Integr. Biol.* 3:278-281.
45. Hayden FG. 2006. Antivirals for influenza: Historical perspectives and lessons learned. *Antiviral Res.* 71:372-378.
46. Homey B, Müller A, Zlotnik A. 2002. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nat Rev Immunol.* 2:175-84.
47. Ishikawa F, Miyazaki S, 2005 New biodefense strategies by neutrophils. *Arch Immunol Ther Exp.* 53:226-233.
48. Kahn JS, 2006 Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev.* 19:546-557.
49. Kelly JT, Busse WW. 2008. Host Immune Response to Rhinovirus: Mechanisms in Asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 122:671-82.
50. Kim CK, Choi J, Callaway Z, Kim HB, Chung JY, *et al.* 2010. Clinical and epidemiological comparison of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in Seoul, Korea, 2003-2008. *J Korean Med Sci.* 25:342-7.
51. Kvietys PR, Sandig M, 2001 Neutrophil Diapedesis: paracellular or transcellular? *News Physiol Sci.* 16:15-19.
52. Laumer M, Hammar F. 2012. Comparison of indirect and direct ELISA. Chemgapedia. <http://www.chemgapedia.de/vsengine/topics/en/vlu/index.html>
53. Lee WL, Harrison RE, Grinstein S. 2003. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* 5:1299-306.
54. Levine OS, O'Brien KL, Deloria-Knoll M, Murdoch DR, Feikin DR, *et al.* 2012. The Pneumonia Etiology Research for Child Health Project: a 21st century childhood pneumonia etiology study. *Clin Infect Dis.* 54 Suppl. 2:S93-101.
55. Luster AD. 2001. Chemotaxis: Role in Immune Response. En: *Encyclopedia of Life Sciences* [online] Dec 12 2001. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. Disponible en www.els.net.
56. MacDermott RP. 1999. Chemokines in the inflammatory bowel diseases. *J Clin Immunol.* 19:266-72.
57. Mahalingam S, Clark K, Matthaei KI, Foster PS. 2001. Antiviral potential of chemokines. *Bioessays.* 23:428-35.

58. Mamdough Z, Chen X, Pierini LM, Maxfield FR, Muller WA. 2003. Targeted recycling of PECAM from endothelial cell surface-connected compartments during diapedesis. *Nature*. 421:748-753.
59. Marcone DN, Ricarte C, Videla C, Ekstrom J, Carballal G, et al. 2012. Rinovirus. Frecuencia en niños con infección respiratoria aguda, no internados. *Med. (Buenos Aires)* 72:28-32.
60. Matsukura S, Kokubu F, Noda H, Tokunaga H, Adachi M. 1996 Expresión of IL-6, IL-8, and RANTES on human bronchial epithelial cells, NCI-H292, induced by influenza virus. *J Allergy Clin Immunol*. 98:1080-1087.
61. McKay DM. 2005. Good bug, bad bug: in the case of enteric inflammatory disease does the epithelium decide? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 100:205-10.
62. Meier CR, Napalkov PN, Wegmüller Y, Jefferson T, Jick H. 2000. Population-based study on incidence, risk factors, clinical complications and drug utilization associated with influenza in the United Kingdom. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 19:834-42.
63. Meier O, Greber UF, 2004. Adenovirus endocytosis. *J Gene Med*. 6:152-63.
64. Mejías A, Chávez-Bueno S, Raynor MB, Connolly J, Kiener PA, et al. 2007. Motavizumab, a neutralizing anti-respiratory syncytial virus (RSV) monoclonal antibody significantly modifies the local and systemic cytokine responses induced by RSV in the mouse model. *Virol J*. 4:109.
65. Mermond S, Zurawski V, D'Ortenzio E, Driscoll AJ, DeLuca AN, et al. 2012. Lower respiratory infections among hospitalized children in New Caledonia: a pilot study for the Pneumonia Etiology Research for Child Health Project. *Clin Infect Dis*. 54 Suppl. 2:180-9.
66. Message SD, Johnston SL. 2001. The immunology of virus infection in asthma. *Eur Respir J*. 18:1013-1025.
67. Meyer-Hoffert U, Lezcano-Meza D, Bartels J, Montes-Vizuet AR, Schröder JM, et al. 2003. Th-2 and to a lesser extent Th-1 type cytokines upregulate the production of both CXC (IL-8 and GRO-alpha) and CC (RANTES, Eotaxin, Eotaxin-2, MCP-3 and MCP-4) chemokines in human airway epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 131:264-71.
68. Miedema CJ, Kors AW, Tjon A Ten WE, Kimpen JL. 2001. Medical consumption and socioeconomic effects of infection with respiratory syncytial virus in the Netherlands. *Pediatr Infect Dis J*. 20:160-3.
69. Muller WA, 2009. Mechanisms of transendothelial migration of Leukocytes. *Circ Res*. 105:223-30.
70. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM, 1993. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med*. 178:449-60.
71. Muller WA. 2003. Leukocyte-endothelial-cell interaction in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol*. 24:327-34.

72. Noah TL, Becker S. 1993. Respiratory syncytial virus-induced cytokine production by a human bronchial epithelial cell line. *Am J Physiol.* 265:L472-8.
73. Noah TL, Becker S. 2000. Chemokines in nasal secretions of normal adults experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Clin Immunol.* 97:43-9.
74. Odeberg H, Olsson I. 1976. Mechanisms for the microbicidal activity of cationic proteins of human granulocytes. *Infect Immun.* 14:1269-75.
75. Paccaud J, Schifferli JA, Baggiolini M, 1990. NAP-1/IL-8 induces upregulation of CR1 receptor in human neutrophil leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 166:187-92.
76. Papadopoulos N, Johnston SL. 2000. Rhinoviruses as pathogens of the lower respiratory tract. *Can Respir J.* 7:409-414.
77. Papi A, Luppi F, Franco F, Fabbri LM. 2006. Pathophysiology of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 3:245-51.
78. Patrick M, Johnston S. 2006 How Viral Infections Cause Exacerbation of Airway Disease *Chest* 130;1203-1210.
79. Phuong B. Tran & Richard J. Miller. 2003. Chemokine receptors signpost to brain development and disease. *Nat Rev Neurosci.* 4:444-445.
80. Pitkäranta A, Puhakka T, Mäkelä MJ, Ruuskanen O, Carpen O, *et al.* 2003. Detection of rhinovirus RNA in middle turbinate of patients with common colds by in situ hybridization. *J Med Virol.* 70:319-23.
81. Pontificia Universidad Católica de Chile 2012. Metapneumovirus humano. Virus respiratorios. <http://www.virus.med.puc.cl>
82. Proud D. 2008. Upper airway viral infections. *Pulm Pharmacol Ther.* 21:468-73.
83. Proudfoot AEI. 2002. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol.* 2:106-115.
84. Pyrc K, Berkhout B, van der Hoek L. 2007. Antiviral strategies against human coronaviruses. *Infect Disord Drug Targets.* 7:59-66.
85. Racaniello V. 2009. Viruses and obesity? En: Virology blog. About viruses and viral disease. <http://www.virology.ws/2009/01/30/viruses-and-obesity/>
86. Rangel D. 2012. Influenza estacional. Apuntes de Medicina. Educomputación, Chile. <http://www.educomputacion.cl/content/view/459/243/>
87. Ransohoff RM, 2009. Chemokines and chemokine receptor: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity.* 31:711-21.
88. Reilly PL, Woska JR Jr, Jeanfavre DD, McNally E, Rothlein R, *et al.* 1996. The native structure of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a dimer. Correlation with binding to LFA-1. *J Immunol.* 155:529-32.

89. Roitt I, Blostoff J. 2003. Immunology. VI ed. England, Edit Mosby.
90. Rojas-Dotor S, Perez-Ramos J, Rico-Rosillo MG. 2009. Chemotaxis and disease. *Rev Med Inst Mex Seg Soc.* 47:51-6.
91. Rollins BJ. 1997. Chemokines. *Blood.* 90:909-928.
92. Rossman MG, 1994. Viral cell recognition and entry. *Protein Sci.* 3:1712-25.
93. Ryu JS, Min DY. 2006. *Trichomonas vaginalis* and trichomoniasis in the Republic of Korea. *Korean J Parasitol.* 44:101-16.
94. Sachse F, Ahlers F, Stoll W, Rudack C, 2005. Neutrophils chemokines in epithelial inflammatory processes of human tonsils. *Clin Exp Immunol.* 140:293-300.
95. Santiago J, Hernández CJL, Manjarrez ZME, Montes VR, Rosete ODP, *et al.* 2008. Role of monocyte chemotactic protein-3 and -4 in children with virus exacerbation of asthma. *Eur Respir J.* 32:1243-1249.
96. Santiago J. 2009. Enfermedad respiratoria viral y mecanismos de reclutamiento de macrófagos en la mucosa nasal. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
97. Schildgen O, Müller A, Allander T, Mackay IM, Völz S, *et al.* 2008. Human Bocavirus: Passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin Microbiol Rev.* 21(2)291-304.
98. Science Photo Lybrary 2012. Virus de la parainfluenza humana <http://www.sciencephoto.com/media/117695/enlarge>. Neutrófilo fagocitando una bacteria de la tuberculosis, micrografía electrónica de barrido <http://www.sciencephoto.com/media/113696/enlarge>. Virus sincitial respiratorio /248980/enlarge. Rinovirus /249469/view.
99. Shields JD. 2011. Lymphatics: at the interface of immunity, tolerance, and tumor metastasis. *Microcirculation.* 18:517-31.
100. Shors T. 2009. Virus: Estudio molecular con orientación clínica. II ed. Edit. Panamericana México.
101. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (Sinave). 2010. Sistema de notificación semanal de casos nuevos. Acceso al cierre de 2010. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. México. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>
102. Smith EC, Popa A, Chang A, Masante C, Dutch RE. 2009. Viral entry mechanism: the increasing diversity of Paramyxovirus entry. *FEBS J.* 276:7217-7227.
103. Smith JG, Wiethoff CM, Stewart PL, Nemerow GR, 2010. Adenovirus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 343:195-224.
104. Sommerhoff CP, Nadel JA, Basbaum CB, Caughey GH. 1990. Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland Selous cells. *J Clin Invest.* 85:682-89.

105. Srinivasan A, Wang C, Yang J, Inaba H, Shenep JL, et al. 2011. Parainfluenza virus infections in children with hematologic malignancies. *Pediatr Infect Dis J.* 2011 30:855-9.
106. Stites P., Stobo D. 2004. Basic & Clinical Immunology. VII ed. LA Edit LMP.
107. Subauste MC, Jacoby DB, Richards SM, Proud D. 1995. Infection of a human respiratory epithelial cell line with rhinovirus: induction of cytokines release and modulation of susceptibility to infection by cytokine exposure. *J Clin Invest.* 96:549-557.
108. Tang NL, Chan PK, Wong CK, To KF, Wu AK, et al. 2005. Early enhanced expression of interferon-inducible protein-10 (CXCL-10) and other chemokines predicts adverse outcome in severe acute respiratory syndrome. *Clin Chem.* 51:2333-40.
109. Teran LM, Johnston SL, Schröder JM, Church MK, Holgate ST, 1997. Role of nasal interleukin-8 in neutrophil recruitment and activation in children with virus-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 155:1362-66.
110. Terui T, Ozawa M, Tagami H. 2000. Role of neutrophils in induction of acute inflammation in T-cell-mediated immune dermatosis, psoriasis: a neutrophil-associated inflammation-boosting loop. *Exp Dermatol.* 9:1-10.
111. Tregoning JS, Schwarze J, 2010. Respiratory viral infection in infants: Causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clin Microbiol Rev.* 23:54-98.
112. Trigg CJ, Tooley M, D'Souza MF, Herdman MJ, Thomas JM, 1994. Factors affecting the long-term variability of bronchial responsiveness in an adult general practice population. *Eur Respir J.* 7:703-9.
113. Tsuboi N, Asano K, Lauterbach M, Mayadas TN, 1998. Association between nasal secretion interleukin-8 concentration and symptom severity in experimental rhinovirus colds. *Clin Infect Dis* 26:840-846.
114. Tsuboi N, Asano K, Lauterbach M, Mayadas TN. 2008. Human Neutrophil Fcγ receptors initiate and play specialized non redundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases. *Immunity.* 28:833-46.
115. Turner RB, Bauer R, Woelkart K, Hulsey TC, Gangemi JD. 2005. An evaluation of *Echinacea angustifolia* in experimental rhinovirus infections. *N Engl J Med.* 353:341-8.
116. Turner RB. 1990. The role of neutrophils in the patogénesis of rhinovirus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 9:832-835.
117. University of South Carolina. 2009. Coronavirus, gripes y síndrome respiratorio agudo severo (SARS). Capítulo 25. Curso de Virología. Microbiología e Inmunología On-line. Escuela de Medicina, Universidad de Carolina del Sur. Auspiciado por el Insituto Politécnico Nacional, México. Traducida por Castillo SM y Santiago J. Clinica Corominas, Rep. Dominicana. <http://pathmicro.med.sc.edu/Spanish-Virology/spanish-chapter25.htm>

118. University of South Carolina. 2010. Virus de la parainfluenza, sincitial respiratorio y adenovirus. Capítulo 16. Curso de Virología. Microbiología e Inmunología On-line. Escuela de Medicina, Universidad de Carolina del Sur. Auspiciado por el Insituto Politécnico Nacional, México. Traducida por Castillo SM y Santiago J. Clinica Corominas, Rep. Dominicana. <http://pathmicro.med.sc.edu/Spanish-Virology/spanish-chapter16.htm>
119. Vainionpää R, Hyypiä T. 1994. Biology of parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev.* 7:265–75.
120. Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, *et al.* 2001. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med.* 7:719-24.
121. Van Reeth K. 2000. Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Vet Microbiol* 74:109-116
122. Van Woensel JB, Van Aalderen WM, Kimpen JL. 2003. Viral lower respiratory tract infection in infants and young children *Brit Med J.* 327(7405)36-40.
123. Vernom K. 1983. Infecciones Viricas del Aparato Respiratorio. En: Fishman AP, editor. Tratado de Neumología. Barcelona, McGraw-Hill Doyma, pp. 1053-1061.
124. Wagner R; Matrosovich M, Klenk HD. 2002. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol.* 12:159-66.
125. Wark PA, Johnston SL, Moric I, Simpson JL, Hensley MJ, *et al.* 2002. Neutrophil degranulation and cell lysis is associated with clinical severity in virus-induced asthma. *Eur Respir J.* 19:68-75.
126. Warren L, Lee Rene E. Harrison. 2003. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* 5:1299-1306.
127. White DE, Fenner FJ. 1994. Medical Virology. IV ed. San Diego, EU. Academic Press.
128. Wiehler S, Proud D. 2007. Interleukin-17A modulates human airway epithelial responses to human rhinovirus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 293:505-15.
129. Wikipedia 2012, Aparato respiratorio. http://es.wikipedia.org/wiki/Aparato_respiratorio.
130. Winther B. 2011. Rhinovirus infections in the upper airway. *Proc Am Thorac Soc.* 8:79-89.
131. Wong CH, Heit B, Kubes P. 2010. Molecular regulator of leucocyte chemotaxis during inflammation. *Cardiovasc Res.* 86:183-191.
132. Wong-Chew RM, Farfán-Quiroz R. Sánchez-Huerta JL, Nava-Frías M, Casasola-Flores J, *et al.* 2010. Frecuencia de virus respiratorios y características clínicas de niños que acuden a un hospital en México. *Salud Pública Mex.* 52:528-532.

133. World Health Organization (WHO). 2008. World Health Statistics 2008. París, Francia, pp. 18, 30.
134. Wuyts A, Govaerts C, Struyf S, Lenaerts JP, Put W, *et al.* 1999. Isolation of the CXC chemokines ENA-78, GRO- α and GRO- γ from tumor cells and leukocytes reveals NH₂-terminal heterogeneity. *Eur J Biochem.* 260:421-429.
135. Yonekawa K, Harlan JM. 2005. Targeting leukocyte integrins in human diseases. *J Leukoc Biol.* 77:129-40.
136. Zarbock A, Ley K. 2008. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am J Pathol.* 172:1-7.
137. Zen K, Parkos CA. 2003. Leukocyte-epithelial interactions. *Curr Opin Cell Biol.* 15:557-64.
138. Zhang G, Hu Y, Wang H, Zhang L, Bao Y, *et al.* 2012. High incidence of multiple viral infections identified in upper respiratory tract infected children under three years of age in Shanghai, China. *PLoS One.* 7:e44568.
139. Zhu Z, Tang W, Gwaltney Jr, Wu Y, Elias JA. 1997. Rhinovirus stimulation of interleukin-8 in vivo and in vitro-role of NF- κ B. *Am J Physiol.* 273:814-24.
140. Zimmerman RK, Middleton DB. 2007. Vaccines for persons at high risk. *J Fam Pract.* 56:S38-46.

APÉNDICE I

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimada señora/señor:

Le hacemos una cordial invitación para que su hijo(a) participe como voluntario en el proyecto de investigación biomédica “Enfermedad respiratoria viral, asma y mecanismos de reclutamiento celular”. El proyecto tiene como principal propósito conocer los problemas virales respiratorios y su repercusión en el asma, en los escolares de la escuela primaria “Rey Tizoc”, Xochimilco, D.F., México, a la cual asiste su hijo.

Para llevar a cabo el estudio le solicitamos a usted que nos autorice realizar a su hijo los siguientes procedimientos:

Aplicación de un cuestionario relacionado con datos generales del alumno, de su hogar, de su familia y el diagnóstico evolución y tratamiento del asma;

toma de peso y talla (somatometría);

medición de su capacidad pulmonar (flujometría) y espirometría con broncodilatador;

revisión médica integral, que incluye detección de patologías respiratorias y otras patologías;

toma de muestra nasal, la cual se realizará mediante succión suave con un capilar de silicón, no siendo agresiva para la mucosa nasal. Las personas que aplicarán el cuestionario y que realizarán los procedimientos son altamente capacitados por el INER.

pruebas cutáneas para la identificación de alergias, las cuales se realizarán en el INER por personal capacitado y bajo medidas de alta seguridad.

Los beneficios que obtendrá su hijo durante este proyecto serán: conocer su peso y talla, recibir atención médica oportuna, conocer, mediante pruebas de laboratorio, el virus que cause su cuadro clínico e identificar alergias. En caso de necesitar atención médica especializada se le canalizará al INER para recibirla. El examen médico, las pruebas de flujometría y de espirometría, pruebas cutáneas y de laboratorio NO tendrán ningún costo para usted; no obstante, lamentamos informarle que los costos de los medicamentos SÍ corren por su cuenta.

La información que nos proporcione usted o su hijo(a) será utilizada con propósitos académicos y de investigación, su manejo será de carácter estrictamente confidencial; la información será utilizada exclusivamente por los investigadores del estudio, nadie más podrá conocerla.

La participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted o su hijo tienen la libertad de no contestar las preguntas que les incomoden o pueden retirarse del estudio en cualquier momento. Además, su decisión de participar en el estudio NO tendrá ninguna consecuencia NI limitará sus derechos a ser atendido(a) en servicios de salud, educación o en cualquier otro servicio público de cualquier programa social.

Finalmente, si usted y su hijo aceptan participar en el estudio estarán colaborando con la solución a problemas importantes relacionados con la salud, el crecimiento y el desarrollo de los niños mexicanos.

CONSENTIMIENTO DE LA MADRE, PADRE O TUTOR

Xochimilco, D.F., a ____ de _____, de 200__.

Yo _____ tutor(a) de _____ (edad ____ años) alumno(a) de la Escuela Primaria “Rey Tizoc”, manifiesto que he recibido una explicación amplia y entendible de los procedimientos y de los beneficios esperados al participar en el proyecto mencionado. Así mismo doy mi autorización bajo libre albedrío para que a mi hijo(a) se le aplique el cuestionario correspondiente, sea evaluado por un médico y se le tomen las muestras necesarias de moco nasal para fines de la investigación. Expreso que mi participación es voluntaria y tengo el derecho de retirar a mi hijo del estudio en cualquier momento.

NOMBRE Y FIRMA DEL TUTOR
DEL

DR.LUIS MANUEL TERÁN
INVESTIGADOR RESPONSABLE

PROYECTO
JEFE DE INMUNOGENÉTICA Y ALERGIA

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS (INER)