



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA INFECCIÓN CON DIFERENTES CEPAS DEL
VIRUS DE INFLUENZA A EN LA POLARIZACIÓN DE
MACRÓFAGOS Y EN LA PROGRESIÓN DE DAÑO PULMONAR**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

VICTORIA LIZETH CAMPOS TOSCUENTO



MÉXICO, D.F. , AÑO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Enrique Ortega Soto**

VOCAL: **Profesor: Mónica Berenice Heras Chavarria**

SECRETARIO: **Profesor: Joaquín Zúñiga Ramos**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Sonia Mayra Pérez Tapia**

2º SUPLENTE: **Profesor: Rocío Gabriela Tirado Mendoza**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSÍO VILLEGAS”

ASESOR DEL TEMA:

DR. JOAQUÍN ALEJANDRO ZÚÑIGA RAMOS

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. CRISELDA MENDOZA MILLA

SUSTENTANTE (S):

CAMPOS TOSCUENTO VICTORIA LIZETH

ÍNDICE

- I. ÍNDICE
- II. RESUMEN
- III. INTRODUCCIÓN
 1. Antecedentes
 - 1.1 Estructura y propiedades del virus de influenza A
 - 1.2 Ciclo de replicación de los virus de influenza A
 - 1.3 Origen del virus de influenza pandémica humana A/H1N1
 - 1.4 Inmunopatogénesis de la infección por el virus de Influenza A/H1N1/pdm09.
 - 1.5 Respuesta Inmune mediada por macrófagos
- IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO
- V. OBJETIVOS
- VI. HIPÓTESIS
- VII. PROCEDIMIENTO EXPERIEMNTAL
- VIII. RESULTADOS
- IX. DISCUSIÓN
- X. CONCLUSIONES
- XI. REFERENCIAS
- XII. ANEXOS

Efecto de la infección con diferentes cepas de virus de influenza A en la polarización de macrófagos y en la progresión de daño pulmonar

RESUMEN

El virus de influenza pandémica (pdm) que se aisló en México en 2009 tiene una combinación particular de segmentos genéticos provenientes de virus que infectan aves, cerdos en América del Norte y virus estacional H3N2. Este virus tiene alto potencial pandémico y causa enfermedad respiratoria grave en individuos susceptibles. En este sentido se sabe que diversos factores del huésped como las co-morbilidades y una falta de regulación de la respuesta inflamatoria pueden contribuir al desarrollo de formas graves de la infección. Sin embargo los mecanismos de cómo el virus induce una respuesta inflamatoria exacerbada no se conocen con claridad. Por este motivo en este trabajo se analizó el efecto de los virus pdm A/H1N1 y estacional H1N1 (A/PR/8/34) en la regulación y el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Para ello se llevó a cabo la cuantificación por RT-PCR de la expresión de RNAm de genes asociados a fenotipos de macrófagos M1 o M2 en monocitos humanos infectados experimentalmente con los virus pdm A/H1N1 o estacional A/PR/8/34 en una cinética de 18 y 36 horas.

La infección experimental de monocitos humanos con el virus pdm A/H1N1, en relación con la infección por virus estacional A/PR/8/34, indujo una mayor expresión de RNAm de interleucinas asociadas con un fenotipo M1 en macrófagos, tales como TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Además el virus pdm A/H1N1 induce altos niveles de RNAm de IL-10 en etapas tempranas y tardías de la infección, la

cual podría tener un efecto patogénico al inhibir respuestas inflamatorias protectoras en etapas tempranas de infección.

Estos hallazgos sugieren que existen factores inherentes a la cepa del virus pdm A/H1N1 que inducen una mayor producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias, mediante la sobre-activación de macrófagos M1, lo cual podría contribuir con el desarrollo de un microambiente pro-inflamatorio y con la patogénesis de daño pulmonar mediada por la falta de regulación de la respuesta inflamatoria.

INTRODUCCIÓN

El brote pandémico del virus de Influenza A/H1N1 del 2009 (A/H1N1/pdm/09) causó problemas a los sistemas de salud en todo el mundo. Este virus fue identificado en México y se caracterizó por causar un síndrome respiratorio severo y muerte particularmente a personas dentro de un rango de edad poco común para estos virus: personas jóvenes y de mediana edad [1]. Los primeros estudios de infecciones experimentales con este virus en modelos animales, mostraron que la nueva cepa A/H1N1/pdm/09 es más patogénica que la cepa A/H1N1 estacional, además se demostró que el virus A/H1N1/09 tiene una mayor capacidad de replicación en tejido pulmonar bajo, provocando lesiones más graves en el tracto respiratorio y mayor persistencia en el tejido pulmonar. Adicionalmente se demostró que el virus pdm A/H1N1, a diferencia del virus estacional, tiene una mayor capacidad de inducir altos niveles de mediadores inflamatorios como IL-6, IL-8, MCP-1, entre otros [4].

Por otro lado, dado que el virus A/H1N1 tiene una combinación única de segmentos genéticos de linajes de virus porcinos clásicos euroasiáticos, aviares del norte de América y humanos [2, 3], su alta frecuencia de mutaciones y reordenamientos genéticos representan un desafío a los esfuerzos por controlar a estos virus.

En la actualidad, este virus continúa circulando en México y en varios países de diferentes continentes, causando formas graves de enfermedad respiratoria aguda y de rápida progresión en individuos susceptibles, además de un extenso daño pulmonar y falla de múltiples órganos [4].

Uno de los signos clínicos más frecuentemente observados en pacientes infectados con este virus, es el síndrome de dificultad respiratoria aguda grave (Neumonía grave) [1, 5], cuya morbilidad y la mortalidad reflejan las propiedades intrínsecas del virus pandémico, tales como un mayor potencial de replicación y efectos citopáticos sobre células epiteliales pulmonares en comparación con los virus de influenza estacional [6].

ANTECEDENTES

Estructura y propiedades de los virus de influenza A

Hay tres tipos de virus influenza: A, B y C. Los virus A y B son los más estudiados debido a que causan enfermedades en humanos, específicamente, el tipo A ha sido responsable de distintas epidemias en la historia de la humanidad a causa de sus continuos cambios antigénicos, mientras que el tipo C es más estable [7].

Las diferencias antigénicas mostradas por las proteínas estructurales de nucleocápside (NP) y de matriz (M1), son la base para clasificar a los virus de influenza en los tipos A, B y C. Los virus de influenza A se dividen en subtipos según las variaciones antigénicas de la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), existen 18 subtipos diferentes de hemaglutinina (H1 hasta H18) y 11 de neuraminidasa (N1 hasta N11) [9]. Evidentemente la combinación de estos diferentes subtipos de HA y NA genera docenas de subtipos de virus de influenza A.

Los virus Influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*, son pleomórficos y con un diámetro aproximado de 100nm. Su genoma está compuesto por ocho segmentos de RNA de cadena sencilla con sentido negativo que codifican al menos 9 proteínas estructurales diferentes. Cada segmento de RNA se enrolla alrededor de proteínas nucleares (NP) y de proteínas de exportación nuclear (NEP). Al extremo de estas estructuras se encuentra un complejo de polimerasa (PB1, PB2 y PA), formando las ribonucleoproteínas virales (vRNP), las cuales codifican para once proteínas virales incluyendo proteínas no estructurales [8]. Por

otro lado, presentan una cubierta lipídica que obtienen al salir de las células que infectan, en esta se encuentran sus antígenos transmembranales principales HA y NA, y los canales iónicos (M2) (Figura 1) [9].

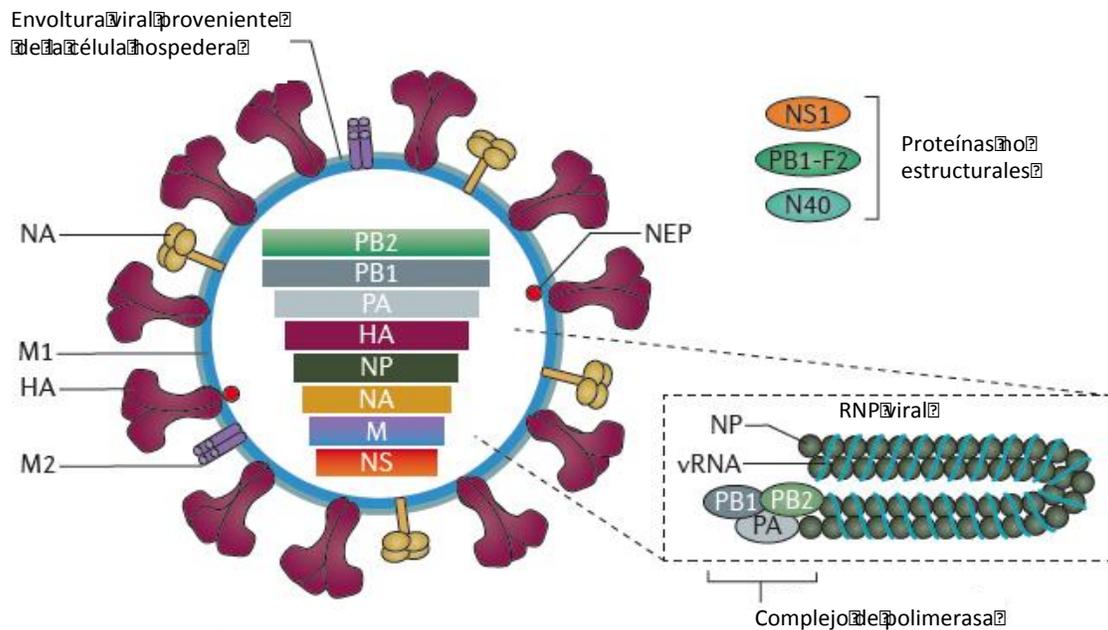


Figura 1. Esquema representativo de la estructura de los virus de Influenza [17].

La HA representa el 80% de la proteína viral total y está codificada por el segmento 4, mientras que la NA representa el 17%, y es codificada por el segmento 6. Estas se introducen en la envoltura viral y quedan expuestas como espigas de casi 10nm de longitud, con grupos de NA rodeados por HA [9]. La glicoproteína HA deriva su nombre de la capacidad que presenta para aglutinar eritrocitos uniéndose al ácido siálico presente en su superficie. Durante su procesamiento postraduccional, la proteína HA se corta en dos subunidades, HA1

y HA2, que permanecen unidas por un puente disulfuro. Para que la partícula viral sea infectiva es necesario separar a HA1 y HA2. Mientras tanto, la glicoproteína NA funge como enzima sialidasa, retira el ácido siálico de los glico-conjugados, facilitando la liberación de las partículas virales de la superficie de las células infectadas durante el proceso de gemación, este proceso impide la auto-agregación de los virones recién liberados. Además, se ha descrito que la NA ayuda a los virus a desplazarse a través de la capa de mucina en el aparato respiratorio para alcanzar a sus células blanco. Por otro lado, M2 es el componente antigénico menos abundante, cubriendo tan solo 16 a 20 moléculas por partícula viral, y no se encuentran asociado a balsas lipídicas. Por último, debajo de la membrana viral se encuentran las proteínas de matriz (M1) las cuales sostienen al núcleo viral [9].

Ciclo de replicación del virus de influenza A

El ciclo de replicación comienza con la adhesión de los virus a sus células blanco; el virus se une al ácido siálico de la superficie celular por medio del sitio receptor localizado en la proteína HA (Figura 2). El ácido siálico se une de dos maneras principales a los carbohidratos de las glicoproteínas: a través de uniones α -2,6 y α -2,3; lo cual es de gran importancia epidemiológica, puesto que particularmente los virus de influenza A que infectan a humanos reconocen preferencialmente uniones α -2,6, los virus de influenza aviar reconocen a la unión α -2,3 y los virus de influenza porcina reconocen ambos [10], lo que promueve la recombinación de virus que infectan distintas especies, tal es el caso de la aparición del virus pandémico A/H1N1/09.

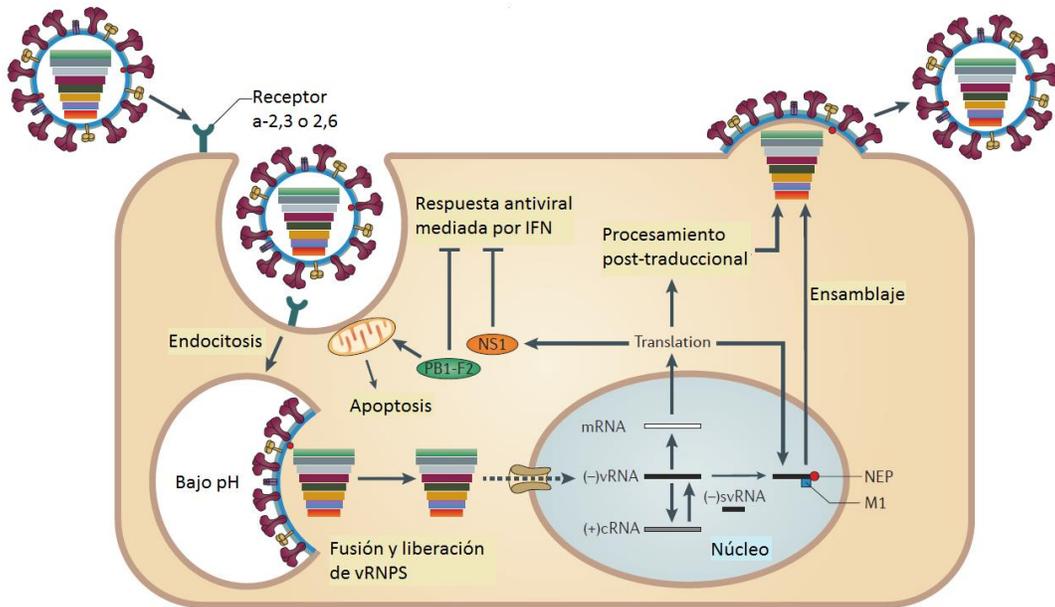


Figura 2. Ciclo de replicación del virus de los virus de Influenza [17].

Posteriormente a la adhesión, las partículas virales se introducen en la célula induciendo la endocitosis. En el endosoma, el precursor de la hemaglutinina viral HA0 es hendido a subunidades HA1 y HA2 a causa de un bajo pH, entre 5 y 6, lo cual también es importante para la activación de canales iónicos M2, los cuales acidifican el núcleo viral para liberar las vRNP de la matriz formada por las M1. La subunidad HA1 se mantiene anclada a la membrana viral, mientras que la subunidad HA2 correspondiente al péptido de fusión queda expuesta y se inserta a la membrana del endosoma. HA comienza a doblarse acercando a ambas membranas hasta tocarse y se crea un poro de fusión que conecta al núcleo viral con el citoplasma celular lo que permite la localización de las vRNP en el citoplasma [11]. Ya en el citoplasma, las vRNPs son transportadas al núcleo a

través del complejo proteico nuclear (NPC) para llevar a cabo la transcripción del genoma viral [12].

Durante la primera etapa de la replicación del genoma viral, se lleva a cabo la producción de RNA complementario (cRNA) de sentido positivo a partir de los segmentos completos de RNA de sentido negativo del genoma viral. El cRNA sirve como plantilla para la síntesis de copias fieles del RNA genómico con sentido negativo y para la producción de RNA maduro viral para la traducción de proteínas de manera simultánea. La transcripción y replicación del RNA viral (vRNA), y por ende de nuevos genomas, se realiza por la RNA polimerasa viral, la cual está constituida por las proteínas PB1, PB2 y PA. Para el inicio de transcripción utiliza como oligonucleótidos a los segmentos de RNA con complementariedad invertida en sus extremos, los cuales se doblan sobre sí mismos formando pequeñas asas de cuatro nucleótidos. Los fragmentos de vRNA negativo replicados en el núcleo se exportan en nuevos vRNP, formados con las nuevas proteínas derivadas de la traducción [13].

La síntesis de RNA mensajero (mRNA) viral a partir de vRNA (-) depende de la actividad de la RNA polimerasa II de la célula hospedera. El vRNA (-) tiene una cola de poli-T, que se transcribirá en una cola de poli-adenina en el mRNA viral, sin embargo no tiene una estructura de cubierta cap metilada en su extremo 5', necesaria para la transcripción. Para resolver esto, la proteína PB2 de la polimerasa, se une al cap de un pre-mRNA celular y la PB1 hace un corte de 10 a 15 nucleótidos para secuestrar el cap de este mRNA celular y unirlo al RNA viral negativo y utilizarlo como primer de la transcripción. Posterior a la transcripción, se

obtiene un RNA viral de sentido positivo, con una cola de poli-adenina y con una estructura cap. Este es exportado al citoplasma para la traducción de proteínas virales necesarias para la formación de los nuevos los vRNPs [13], que inmediatamente se asocian en grupos de ocho segmentos antes de la liberación de las partículas virales, requisito para que éstas completen su ensamblaje.

Al madurar, el virus se libera por gemación. Los componentes virales individuales llegan por diferentes rutas. La nucleocápside se ensambla en el núcleo y se desplaza fuera de la superficie celular. Las glicoproteínas NA y HA se sintetizan y maduran en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi. La proteína M1 sirve como puente para unir la nucleocápside a los extremos citoplasmáticos de la glicoproteínas. Durante esta secuencia de eventos la HA se escinde en HA1 y HA2 si la célula hospedera posee la enzima proteolítica adecuada. La HA retira sus terminales en el ácido siálico en la superficie de la célula blanco, para seguir con su proceso de infección en otros blancos, proceso que depende de la actividad enzimática de la NA que corta la unión HA-membrana celular, además de eliminar el ácido siálico de las glicoproteínas de la membrana viral para evitar que las partículas virales se conjuguen entre ellas. Los mecanismos por los cuales los componentes virales migran a la membrana celular todavía no se conocen, aunque se sabe que las proteínas virales membranales HA, NA y M2 tienen señales de migración en su extremo y se cree que las demás son reclutadas por M1 [14].

Origen del virus de influenza pandémica humana A/H1N1

Debido a la naturaleza segmentada del genoma viral, cuando una célula sufre una infección concurrente por virus diferentes de un determinado tipo, se pueden ensamblar mezclas de los segmentos del gen progenitor de los viriones. Este fenómeno, denominado reordenamiento genético, puede producir cambios súbitos en los antígenos de la superficie viral, creando un virus recombinante al que no se tiene previa inmunidad. Por ejemplo, la inserción de un nuevo subtipo de HA a un virus de influenza dirigido a humanos está asociado a pandemias.

Otra variación antigénica que se puede presentar es la llamada deriva génica, proceso por el cual cambios en aminoácidos de las proteínas HA y NA se seleccionan, creando nuevas cepas virales que no difieren radicalmente entre ellas. Por lo general, estos cambios son los responsables de la generación de virus estacionales con nuevas características estructurales, pero a pesar de ser cambios menores, son suficientes para evadir la inmunidad adquirida por vacunas desarrolladas en contra de un virus estacional específico [15].

Como se mencionó previamente, se sabe que la HA de influenza A/H1N1 tienen la capacidad de unirse tanto al ácido siálico $\alpha 2,3$ como al $\alpha 2,6$, reconocidos preferencialmente por los virus de influenza aviar y humana respectivamente [16]. Los puercos tienen los dos receptores en la tráquea y son susceptibles a la infección por ambos virus, por lo que se propone que son el receptáculo ideal para la recombinación de virus humano y aviar por reordenamiento genético, dando como resultado la generación de nuevos virus potencialmente pandémicos [17], además

de dirigir la infección a células alveolares epiteliales en el tracto respiratorio tanto superior como inferior en los humanos.

En 1918 surgió una epidemia de influenza en el mundo que infectó a un tercio de la población mundial, y provocó la muerte de aproximadamente 100 millones de personas. Todos los virus de influenza A que han causado pandemias desde ese año, incluyendo el virus H1N1 de 1977 y 2009, así como la mayoría de las infecciones por influenza A en el mundo han sido causados por descendientes del virus pandémico de 1918 [2]. Con respecto al virus H1N1 pandémico del 2009, los test preliminares de los CDC indicaron que este virus fue resultado de un nuevo rearrreglo que contenía elementos genéticos de virus de influenza encontrados en cerdos, aves y humanos [2]. Los datos de la composición genética del virus de Influenza A/H1N1/pdm/09 muestran que este resultó del rearrreglo de los virus porcino H1N2 y el reciente H3N2 de Norte América, es decir de un re-arreglo triple entre virus aviares, humanos y porcinos más un componente porcino Euro-asiático relacionado a aves (Figura 3). Como resultado este virus posee los genes PB2 y PA de un virus con origen aviar de Norte América, el gen de PB1 de un virus H3N2 de origen humano, genes HA (H1), NP y NS de un virus de origen porcino clásico y genes NA (N1) y M de un virus de origen porcino relacionado a aves de Eurasia, con esto la descripción de este virus se ajusta a un re-arreglo cuádruple. No obstante, el gen PB1 de origen humano y el PB2 de origen aviar han circulado en cerdos desde 1997 a 1998 (cuando el triple re-arreglo fue descrito por primera vez) y probablemente haya sido objeto de adaptación a los cerdos [3].

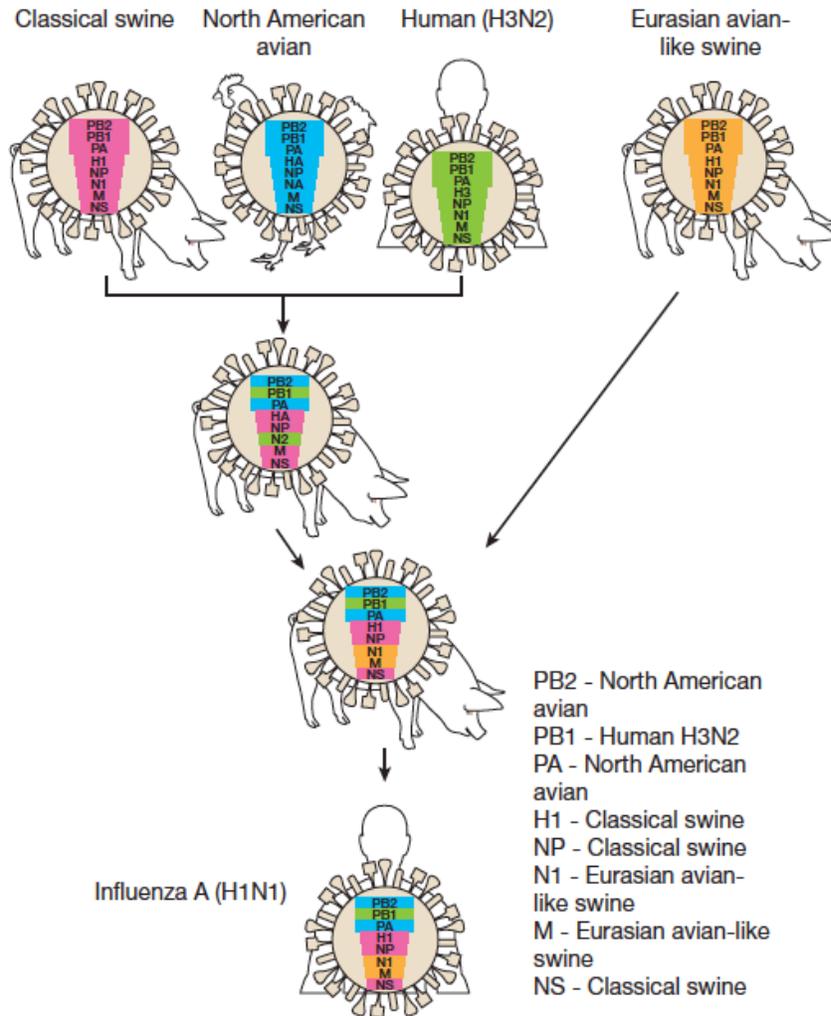


Figura 3. Origen del virus de Influenza A/H1N1 pandémico del 2009 [3].

Inmunopatogénesis de la infección por el virus de Influenza A/H1N1/pdm09

Los virus de influenza infectan principalmente el tracto respiratorio superior. Los síntomas típicos se presentan de manera súbita e incluyen escalofríos, cefalea y tos seca, seguidos poco después por fiebre elevada, dolor muscular generalizado, malestar y anorexia; síntomas que corresponden a cualquier cepa de la influenza

A ó B. En contraste, la influenza C rara vez causa resfriado común. Por otro lado, un incremento de la secreción de las mucosas, ayudan a arrastrar a los agentes hacia las vías respiratorias inferiores.

Una parte de los individuos infectados con el virus pandémico del año 2009 desarrollaron formas graves de neumonía, asociada en muchos de los casos, a la falla de otros órganos, principalmente el riñón. Posteriormente, la progresión clínica hacia formas graves de la enfermedad se ha asociado con diferentes factores del huésped como son la presencia de comorbilidades como obesidad, diabetes, EPOC, entre otras, además de presentar fenómenos inflamatorios poco regulados y también factores virales de patogenicidad.

Hasta ahora no se conocen totalmente los mecanismos relacionados con los factores del huésped y de la cepa viral que determinan el desarrollo y la patogénesis de la neumonía grave asociada a la infección con el virus A/H1N1/pdm/09.

Durante las infecciones por virus respiratorios la respuesta inmune inflamatoria tiene un papel crucial para el control de la etapa aguda de la infección. Sin embargo, cuando los mecanismos de control y regulación de esta respuesta antiviral e inflamatoria están ausentes o no se regulan de manera adecuada, sumado con una consecuente producción elevada de mediadores inflamatorios como citocinas y quimiocinas, paradójicamente, puede contribuir a la patogénesis de la enfermedad causando daño a distintos tejidos y determinando un desenlace grave de la enfermedad [18, 19].

En otros estudios se ha demostrado que los factores genéticos del huésped influyen en la susceptibilidad y la progresión clínica de la enfermedad. En un estudio reciente de asociación genética de casos y controles, entre pacientes que desarrollaron neumonía grave por el virus pandémico y sus contactos intradomiciliarios, se encontraron cuatro polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP) en genes de los cromosomas 1 y 17 que se asocian significativamente con la gravedad de la enfermedad, alguno de los cuales codifican a proteínas del complemento y receptores involucrados en el procesamiento de complejos inmunes, lo cual sugiere que estos genes pueden conferir riesgo debido a un incremento en la activación de la inmunidad del hospedero [20]. En apoyo a esta hipótesis, recientemente se describió que adultos jóvenes con neumonía grave por el virus A/H1N1 pandémico presentan mayor tendencia al depósito de complejos inmunes y activación del complemento en tejido pulmonar y tracto respiratorio [21]. Con esto se demuestra que en la patogénesis de la infección por el virus de Influenza A/H1N1 pandémico están implicados factores tanto genéticos del hospedero como patogénicos propios del virus [7].

Así mismo, se ha descrito que durante la infección primaria por virus de Influenza A, las células T CD8+ tienen un papel determinante en el control de la infección a través de diferentes mecanismos efectores como citotoxicidad y apoptosis de células infectadas, limitando de manera eficaz su capacidad de replicación y por lo tanto la gravedad del daño [22, 23]. Por el contrario, durante la infección por el virus A/H1N1 pandémico parece ser que la respuesta a través de las células T puede contribuir con el curso clínico de la neumonía grave. En estudios

previamente realizados en el laboratorio, se observó que los pacientes con neumonía grave, asociada a la infección por el virus pandémico A/H1N1 pandémico, presentan una distribución de subpoblaciones efectoras de células T periféricas polarizada hacia Th1, en comparación con sujetos expuestos al virus que no desarrollaron neumonía y con sujetos sanos. También se demostró que el virus pandémico A/H1N1 tiene la capacidad de inducir mayores niveles de diferentes citocinas y quimiocinas proinflamatorias como IL-8, TNF- α , IFN- γ , IL-6, CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), entre otras, en suero y lavados bronquioloalveolares (LBA) de pacientes con formas graves de neumonía, en comparación con una cepa de influenza A/H1N1 estacional (PR/8/34) y una cepa H3N2 [4, 24].

Respuesta inmune mediada por macrófagos

Los macrófagos fueron descritos inicialmente por Élie Metchnikoff en el siglo XIX como células fagocíticas responsables de la eliminación de patógenos, el desarrollo del tejido y reparación de heridas en distintos organismos, desde invertebrados hasta vertebrados [26]. Hoy en día, más allá de las funciones clásicas descritas por Metchnikoff, sabemos que los macrófagos son una de las poblaciones celulares más pleiotrópicas del sistema inmune, presentes en todos los tejidos del cuerpo. Tienen funciones homeostáticas que incluyen reparación, remodelación y protección de tejidos, al poner en marcha mecanismos inmunes innatos e iniciar el desarrollo de respuestas inmunes específicas a través del procesamiento y presentación de antígenos, la expresión de moléculas co-estimuladoras y la producción de citocinas [27].

Los fagocitos mononucleares, como los macrófagos, son producto de un proceso denominado monocitopoyesis, que comienza con la generación de precursores mieloides en la médula ósea, el bazo y el hígado fetal a partir de células pluripotenciales. Los precursores mieloides comunes para el linaje granulocítico y monocítico, al ser estimulados con el factor estimulante de colonias de granulocito-macrófono (GM-CSF) y el factor estimulante de colonias de macrófono (M-CSF) e interactuar con el estroma de los órganos hematopoyéticos dan lugar a los promonoblastos y generan la progenie monocito-macrófono [27]. Los promonoblastos se diferencian a monoblastos y éstos a promonocitos que posteriormente se convierten en monocitos que abandonan la médula ósea, entran al torrente sanguíneo y se dirigen a los diferentes tejidos por el flujo de quimiocinas y factores atrayentes. En los tejidos los monocitos se convierten en macrófagos residentes con un fenotipo determinado por un microambiente tisular, la matriz extracelular (MEC), los productos de secreción y las moléculas de superficie de las células vecinas (Figura 4). Esta especialización contribuye al desarrollo de su heterogeneidad, la cual se ha definido como la propiedad de los macrófagos de expresar amplios rangos de fenotipos morfológicos y funcionales [28].

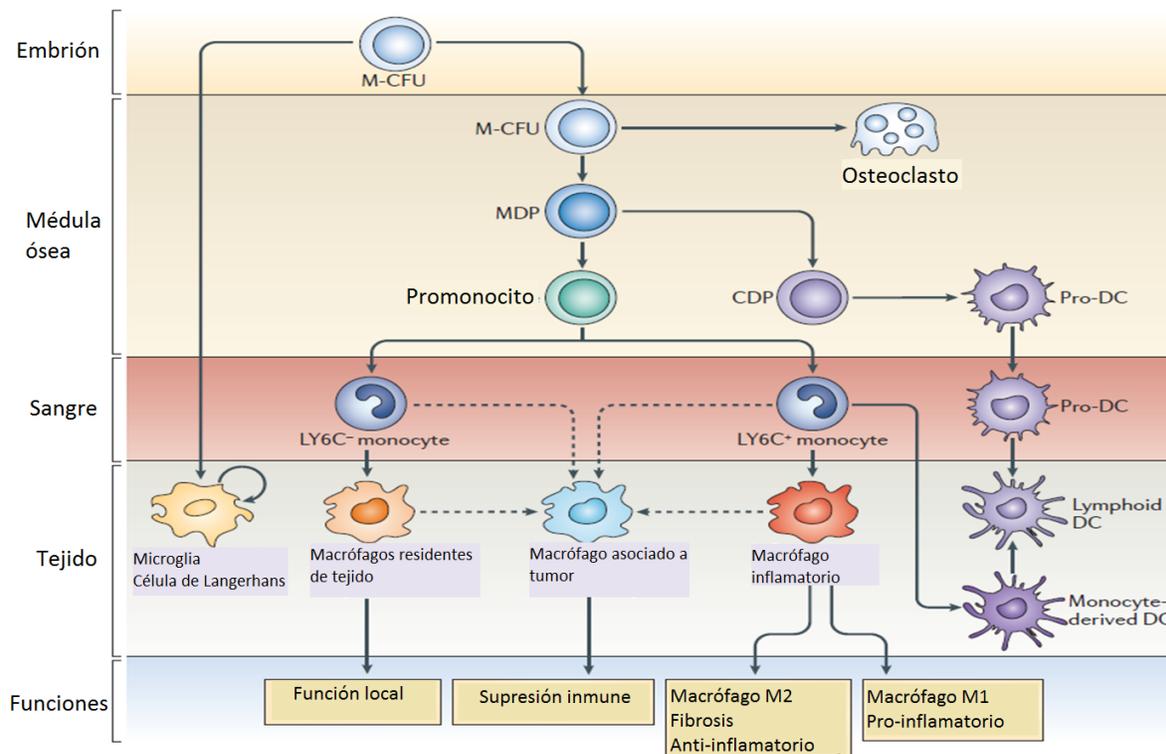


Figura 4. Origen de los macrófagos [45].

Por otro lado, los macrófagos tienen una notable plasticidad que les permite responder de manera eficiente a las señales ambientales y cambiar su fenotipo, su fisiología puede ser marcadamente alterada tanto por la respuesta innata como por la adaptativa. Por ejemplo, los macrófagos pueden responder a estímulos endógenos que se generan rápidamente después de una lesión o infección. Estos estímulos se producen típicamente por células de la respuesta inmune innata y pueden ejercer un efecto, aunque por lo general transitorio, sobre la fisiología de los macrófagos. Así mismo, responden a señales producidas por células de la respuesta adaptativa, que son más prolongadas que los estímulos inmunes innatos y generalmente dan lugar a alteraciones en macrófagos a más largo plazo. Además los macrófagos en sí pueden producir varios factores que influyen en

su propia fisiología. Durante la caracterización inicial de la activación de los macrófagos, la combinación de dos señales, interferón- γ (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α), dio lugar a una población de macrófagos que durante una infección aumenta su capacidad microbicida o capacidad tumoricida, así como la secreción de citocinas pro-inflamatorias y mediadores. Estos se denominaron macrófagos activados clásicamente o M1. Se sabe que IFN- γ puede ser producido por células del sistema inmune innato o adaptativo. Las células asesinas naturales (NK) son una fuente importante temprana de esta citocina, las cuales responden al estrés y las infecciones induciendo a macrófagos para secretar citoquinas pro-inflamatorias y producir una mayor cantidad de aniones superóxido, radicales de oxígeno y nitrógeno, favoreciendo una mejor resistencia contra la infección. Sin embargo, la producción de IFN- γ por las células NK es generalmente transitoria y por lo tanto no puede sostener una población de macrófagos activos durante mucho tiempo, en consecuencia la respuesta inmune adaptativa es necesaria para mantener a los macrófagos clásicos activados, lo cual se proporciona por la producción sostenida de IFN- γ por las células T helper 1 (Th1) [29].

TNF- α media la producción de IL-6 y su acción sobre las células B, y las células T vírgenes. Así mismo está implicado en la mejora de la maduración de los macrófagos tisulares y células dendríticas, lo cual posiblemente conduce a una mayor respuesta inflamatoria y la activación adicional de células presentadoras de antígenos. Así mismo, los macrófagos activados por la vía clásica (M1), tienen la capacidad de detonar mecanismos efectores como muerte de parásitos intracelulares, lisis de células tumorales, producción y secreción de IL-1 β , IL-6, IL-

12, IL-18, TNF- α , CCL3, CXL9 y CXCL10, así como producción de ROS, generación de ON en murinos, cambios fagolisosomales y aumento en la expresión de MHC II [27].

Por otro lado, estas citocinas pro-inflamatorias que son producidas por los macrófagos activados clásicamente y que componen la defensa del huésped, pueden causar graves daños. Por ejemplo, la IL-1, IL-6 e IL-23 se han asociado con el desarrollo y la expansión de TH17, la cuales producen IL-17, que a su vez se asocia con el reclutamiento de altos niveles de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en los tejidos, los cuales pueden contribuir a patologías autoinmunes.

En términos moleculares la activación de genes durante la activación clásica de los macrófagos se induce por una combinación de factores de transcripción. Estos incluyen transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT), activados por los receptores de IFN- γ y el factor-kappa B nuclear (NFkB), así como proteínas cinasas (MAPKs), en respuesta a ligandos de TLR o TNF- α .

En resumen, los macrófagos activados clásicamente son producto de una respuesta inmune mediada por la participación de una gran variedad de células, citocinas y mediadores que se producen por daño al tejido, aunque también se pueden generar de forma transitoria en respuesta a estímulos de estrés después de infecciones virales, por lo cual, algunos patógenos han desarrollado la capacidad de interferir con la señalización a partir de IFN- γ y prevenir la activación de macrófagos eficientemente [29].

De manera similar, los macrófagos activados alternativamente o M2, se pueden desarrollar en respuesta a las señales innatas o adaptativas. Una de las primeras señales para ser activados durante la lesión del tejido, se cree que es la IL-4, la cual se sabe que los basófilos y mastocitos producen tempranamente. Esta producción temprana de IL-4 convierte rápidamente a los macrófagos residentes en una población de células que están programadas para promover la curación de la herida; la IL-4 estimula la actividad de la arginasa en los macrófagos, lo que les permite convertir arginina a ornitina, un precursor de poliaminas y colágeno, contribuyendo así a la producción de la matriz extracelular [30].

En resumen los efectos de IL-4 en la generación de un fenotipo de macrófago activado alternativamente actúan de igual manera con los inducidos por IL-13, IL-10, glucocorticoides y TGF- β , compartiendo algunas propiedades funcionales generalmente involucradas en respuestas tipo Th2, como inmunoregulación y remodelación de tejido. Por otro lado, estos macrófagos también pueden ser perjudiciales al hospedero cuando su actividad es regulada inadecuadamente, generando autoinmunidad, por ejemplo, la fibrosis del tejido que se produce durante la esquistosomiasis crónica [30].

Como se ha descrito hasta ahora, la plasticidad de los macrófagos parece conservarse y responder a señales ambientales, a diferencia de las células T, que se someten a extensas modificaciones epigenéticas durante la diferenciación. Varios estudios *in vivo* sugieren que el fenotipo de una población de macrófagos puede cambiar con el tiempo, e independientemente del mecanismo, hay algunos

casos en los que un interruptor fenotípico en la población del macrófago se produce con el tiempo y se asocia con la patología específica [30].

En resumen, se sabe que en base a su actividad funcional los macrófagos pueden ser de tipo M1 o M2. Los macrófagos M1 son microbicidas y mantienen respuestas Th1 mediante la producción de citocinas pro-inflamatorias mientras que los macrófagos M2 son inmunomoduladores mediante el estímulo de una respuesta Th2, además de promover la remodelación de tejidos [31].

La mayoría de los genes característicos asociados a macrófagos activados alternativamente (M2) y clásicamente (M1) comparte la propiedad de ser regulados activa o inactivamente por la vía de señalización STAT6. STAT6 se activa por diferentes citocinas y en consecuencia un número de genes importantes en una respuesta inmune alternativa y/o clásica [33].

Entre los factores que regulan la vía de señalización STAT 6 también se encuentra la expresión de los supresores de la señalización de citocinas (SOCS), una familia de proteínas que regulan la producción de diversas citocinas [34, 35] mediante la regulación negativa de la vía JAK/STAT [35-37]. Se ha descrito que la inducción exclusiva de SOCS-3 sugiere un patrón de activación clásica de los macrófagos o la polarización M1 [38], que promueve la destrucción de los tejidos.

Al respecto, en estudios previos se ha especificado que la infección experimental del células epiteliales con virus de influenza A estacional H3N2 promueve de manera eficiente la expresión de SOCS-1 y SOCS-3, regulando la respuesta

inmune contra este virus a través de una vía de señalización dependiente de una proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS) [39].

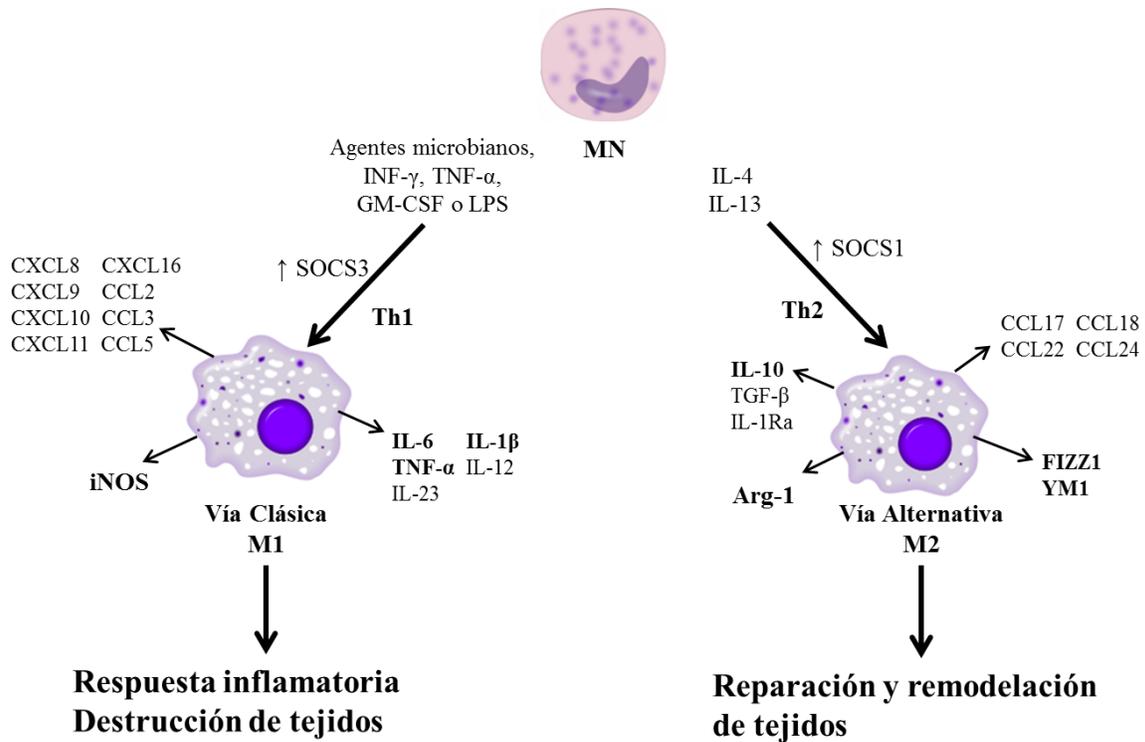


Figura 5. Mecanismos de polarización de macrófagos M1 y M2.

Por otro lado, en estudios recientes se ha descrito una nueva familia de proteínas ricas en cisteína conocida como moléculas de resistina o moléculas que se encuentran en la zona inflamatoria (FIZZ). Estas proteínas también han sido identificadas como resultado de una activación alternativa. Esta familia de proteínas está compuesta por cuatro miembros, aunque sólo Retnl α y Retnl β han sido identificados en humanos y son inducidos por citocinas Th2 [33].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Actualmente, los mecanismos mediante los cuales el virus pandémico A/H1N1 induce la producción de mayores niveles de citocinas pro-inflamatorias en relación con los virus de influenza estacional H1N1 (A/PR/8/34), así como el efecto del virus A/H1N1 en la polarización de macrófagos (M1 o M2) y su correlación con el daño, no se conocen con claridad. Por tanto, para establecer si las alteraciones de la regulación inmunológica observadas en la infección por virus pandémico A/H1N1 podrían atribuirse a factores virales, en este trabajo analizamos la capacidad de las cepas de virus pandémico A/H1N1 y H1N1 (A/PR/8/34) estacional para inducir la polarización de macrófagos M1 ó M2, y por ende la producción de citocinas y quimiocinas en relación a la expresión de SOCS-1, SOCS-3, IL-10, IL-6, IL-1b, TNF- α y Rcn1b, en un modelo de infección experimental con macrófagos humanos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los mecanismos celulares mediante los cuales el virus de influenza A/H1N1 induce la polarización de macrófagos M1 o M2.

Objetivos específicos

- 1) Establecer un modelo de infección experimental de macrófagos humanos con diferentes cepas de virus de influenza (A/PR/8/34 y A/H1N1).
- 2) Estudiar la expresión de genes reguladores de citocinas (SOCS-1, SOCS-3), interleucinas (IL-10, IL-6, IL-1 β), Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) y RenI β en macrófagos, como respuesta a la infección con dos diferentes cepas de virus de influenza y el efecto en la polarización a M1 o M2.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Aislamiento y titulación del virus de influenza estacional H1N1 (A/PR/8/34) y pandémico A/H1N1.

La cepa del virus de influenza A/H1N1 se obtuvo de pacientes con neumonía grave hospitalizados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias durante los diferentes brotes en la Ciudad de México. Mientras tanto, la cepa de virus estacional H1N1 (A/PR/8/34) se obtuvo de la ATCC. Posterior a su propagación en células MDCK, la infectividad del virus se evaluó por titulación.

Los títulos séricos de anticuerpos anti-A/H1N1 y H1N1 (A/PR/8/34) fueron analizados mediante un procedimiento de inhibición de la hemaglutinación (IH). Para el cual, se realizaron diluciones seriadas de alícuotas con 25 µl de suero en PBS, las cuales fueron mezcladas con una cantidad del virus A/H1N1 equivalente a 4 unidades de hemaglutinación. Las diluciones suero-virus fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 50µl de eritrocitos y después de 30 minutos de incubación se evaluó la actividad de IH. Finalmente los títulos de anticuerpos se establecieron tomando la lectura de la última dilución de suero en la cual no se encontró actividad de hemaglutinación.

2. Infección in vitro de células mononucleares (CMN) totales con el virus de influenza estacional H1N1 (A/PR/8/34) o el pandémico A/H1N1.

Se aislaron células mononucleares totales (CMN) a partir de 100 mL de sangre periférica anticoagulada con EDTA de 5 individuos sanos mediante centrifugación con gradiente de densidad por 20min/1500rpm utilizando una solución comercial

Lymphoprep (Axis-Shield, Oslo, Norway), la cual consiste en una mezcla de dos componentes, el diatrizoato de sodio mezclado con un polímero sintético de sacarosa soluble en agua; el primero forma soluciones de alta viscosidad y baja densidad, proveyendo de una densidad óptima para la separación entre suero y CMN en sangre, además de una osmolaridad adecuada para mantener la viabilidad de las células. Mientras que el polímero por si solo causa la aglutinación de eritrocitos, facilitando su sedimentación y separación de células mononucleares que quedan en la interface de entre el plasma y el medio por su menor densidad. Los mononucleares obtenidos se lavaron con medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) con el fin de eliminar restos del reactivo, del plasma y las plaquetas.

Se colocaron 9×10^6 CMN aisladas de cada individuo en placas de cultivo de baja adherencia (T75, Corning Life Sciences, Corning, NY), las cuales fueron tratados con del virus A/H1N1 pandémico o H1N1 estacional en relación célula;virus 1:5 (MOI:5), en medio cultivo RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) suplementado con suero bovino fetal al 10% (hormonas y factores de crecimiento) y L-glutamina 1% (Gibco BRL, Life Technologies), así como penicilina (0.6 mg/mL) y estreptomina (60 mg/ mL) (Gibco BRL, Life Technologies) de forma simultánea como inhibidores del crecimiento de contaminantes. Las placas fueron incubadas a 37°C en un ambiente con 5 % de CO₂ y saturación de humedad. Posteriormente las CMN totales se recolectaron 18 y 36 horas más tarde, seguido de lavados con una solución balanceada de sales fría (PBS).

Por otro lado se evaluó, con el mismo método de infección, la capacidad de infección de ambos virus, estacional PR8 y pandémico A/H1N1 en una cinética de tiempo donde se infectaron células de la línea A549 (epiteliales pulmonares) y macrófagos humanos con una MOI:1 y se evaluó el título viral de los sobrenadantes a través del tiempo con titulaciones después de 1, 2, 3, 5, 10, 15 y 24 hrs después de la infección. Esto permite establecer la viabilidad, capacidad infecciosa y capacidad de replicación viral. Todos los ensayos se realizaron por triplicado (**Anexo 1**).

3. Purificación de monocitos CD14+ por selección positiva

Las CMN totales recolectadas, se marcaron magnéticamente con microperlas recubiertas de manera específica con anticuerpos anti-CD14 (Milteny, Auburn, CA, USA). Posteriormente cada suspensión celular se cargó en columnas colocadas en un campo magnético que retiene las células marcadas magnéticamente, mientras que las fracciones no marcadas se eluyen y desechan. Para finalmente remover la columna del campo magnético, y las CD14+ purificadas puedan ser eluidas con H₂O libre de RNAsas.

Adicionalmente se determinó la pureza de extracción de monocitos mediante citometría de flujo usando anticuerpos monoclonales CD14-FITC Y CD3-PE (BioLegend, San Diego, CA, USA), obteniendo 97.6% de pureza (**Anexo 2**).

4. Extracción de RNA celular total.

Los monocitos CD14+ purificados de CMN totales, se lisaron y homogenizaron en un buffer desnaturizante de guanidina y tiocionato, generando un ambiente

hidrofóbico alrededor del RNA. Posteriormente se añadió etanol al 70% para proporcionar la adecuada unión selectiva del RNA total cargado a la membrana de sílice de columnas de adsorción con el sistema comercial de aislamiento de ARN (Qiagen, Valencia CA, EE.UU.), mientras los contaminantes y desechos celulares son arrastrados por una serie de lavados. Por último el RNA se eluyó con agua libre de RNAsas, proporcionándole de nuevo su recubrimiento hidratante.

Para la síntesis del DNA complementario (cDNA) se utilizó el kit SuperScript First-Strand cDNA Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), reacción que es catalizada por una enzima transcriptasa reversa que sintetiza una copia del RNAm a partir de un cebador antes de degradar el RNA molde, rellenando al mismo tiempo con una secuencia de dNTPs a fin de generar el DNA complementario.

5. Cuantificación de la expresión genética por PCR en tiempo real

Posterior a la síntesis de cada cDNA blanco, los niveles de expresión de ciertos marcadores de macrófagos M1 y M2 se analizaron por un método de amplificación y cuantificación por PCR en tiempo real utilizando ensayos TaqMan de Applied Biosystems. Utilizando como genes de expresión constitutiva cuyos niveles no cambian bajo las condiciones experimentales usadas, la expresión de β -actina y GAPDH, como controles endógenos. (Life Technologies/Applied Biosystems, Foster y, CA).

Los valores del ciclo umbral (CT) de cada gen diana fueron analizados mediante una comparación cuantitativa de la secuencia blanco, normalizada con una referencia interna (gen endógeno) y comparado contra un calibrador (Mock),

mediante el método comparativo CT ($2^{\Delta\Delta CT}$) del software SDS (Life Technologies/Applied Biosystems, Foster City, CA). Para validar el uso de éste método, se requirió demostrar que la eficiencia de amplificación de ambos genes usados (endógeno y blanco) era la misma. Por lo cual, previo al análisis se construyó una curva estándar para cada gen blanco y controles endógenos, a partir de diluciones seriales (1:2) hechas de una muestra de concentración conocida, obteniendo una eficiencia de amplificación mayor al 90% (Anexo2), además de una pendiente entre de -0.1 a 0.1 en un gráfico ΔCT (CT blanco-CT endógeno) v/s Log concentración, lo cual valida el uso del método ΔCT (**Anexo 3**).

Los resultados finales analizados del One-step RT-PCR para cada gen diana y los endógenos en las muestras correspondientes a cada condición de infección, se presentaron como unidades relativas de cuantificación (RQ) (**Anexo4**). Estos ensayos se realizaron por triplicado.

6. Análisis estadístico

La asociación entre las variables celulares y moleculares se determinó empleando la prueba estadística de T pareada con el programa Graph Pad Prism v4. Los valores con una $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

La infectividad y capacidad de los virus A/H1N1 pandémico y estacional PR8 se evaluó en modelos de infección experimental de células epiteliales A549 y macrófagos humanos en una cinética de tiempo por titulación mediante un procedimiento de inhibición de la hemaglutinación. Mediante este procedimiento demostramos que tras la infección de las células epiteliales y macrófagos a una MOI:1, el título viral aumento de manera significativa al paso del tiempo lo cual demuestra que el virus que utilizamos tenía la capacidad de infectar a las células y de replicarse activamente en ellas (**ver Figura Anexo 1**). Para la purificación de monocitos se llevaron a cabo ensayos de selección positiva con perlas inmunomagnéticas. El análisis de pureza realizado por citometría de flujo reveló un grado de pureza mayor al 95% (**ver Figura Anexo 2**). Se realizó un proceso de validación de la eficiencia de amplificación de las sondas Taqman el cual permitió establecer las curvas de amplificación adecuadas (**ver Figura Anexos 3 y 4**).

El análisis de expresión del RNAm de estos genes mostró que la infección con el virus A/H1N1 pandémico induce mayores niveles de expresión de TNF- α en relación a la infección con virus estacional PR8. Este fenómeno se observó en macrófagos infectados tanto 18 horas como a 36 horas posteriores a la infección, **Figura 6**.

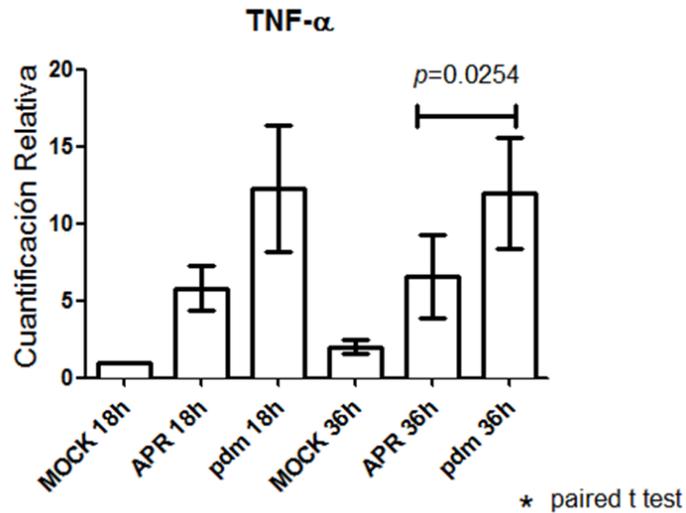


Figura 6. Expresión de RNAm de TNF- α en macrófagos infectados con virus estacional (PR8) y pandémico A/H1N1 a las 18 y 36 horas.

Como se observa en la **Figura 7**, la expresión de IL-6 también fue significativamente mayor en los macrófagos infectados por el virus A/H1N1 en relación con los macrófagos infectados con el virus estacional PR8. Esta capacidad de inducción de IL-6 por parte del virus pandémico A/H1N1 se observó tanto en macrófagos infectados durante 18 como a las 36 horas.

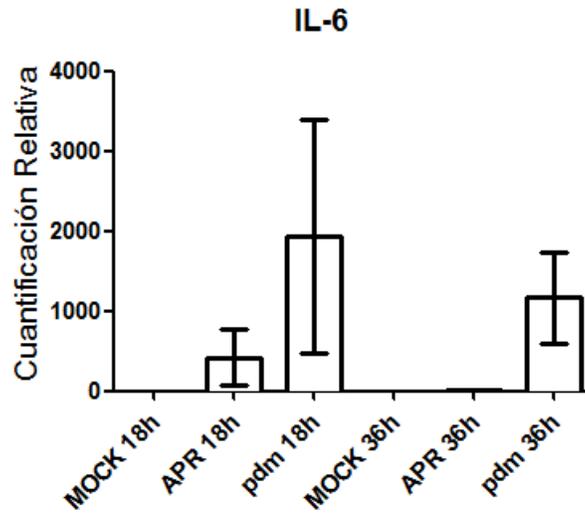


Figura 7. Expresión de RNAm de IL-6 en macrófagos infectados con virus estacional (PR8) y A/H1N1 después de 18 y 36 horas.

Adicionalmente, se observó un patrón similar de expresión de IL-1 β en macrófagos infectados por el virus A/H1N1. Esta sobre-expresión de IL-1 β inducida por la cepa A/H1N1 se observó tanto en macrófagos infectados tanto a 18 como después de 36 horas, **Figura 8.**

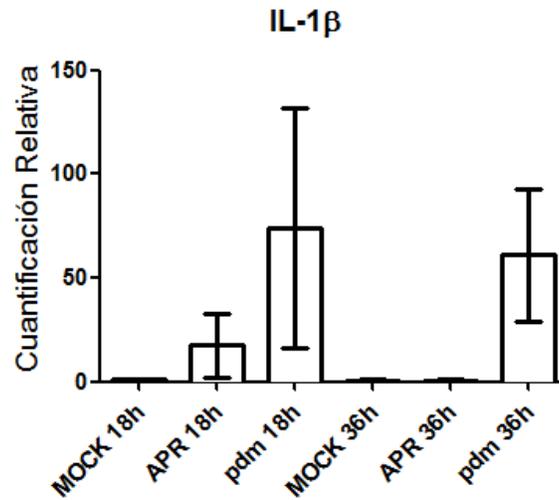


Figura 8. Expresión de RNAm de IL- β en macrófagos infectados con virus estacional (PR8) y A/H1N1 después de 18 y 36 horas.

Es importante recalcar que los niveles de expresión de IL-6 con respecto a IL-1 β y demás citocinas analizadas son casi 10 veces superiores como respuesta a la infección por el virus A/H1N1.

También se observó una expresión significativamente mayor de RNAm de IL-10 en macrófagos infectados por el virus A/H1N1 a las 18 y 36 horas en relación con células infectadas con el virus estacional PR8 y el control sin infección, **Figura 9**.

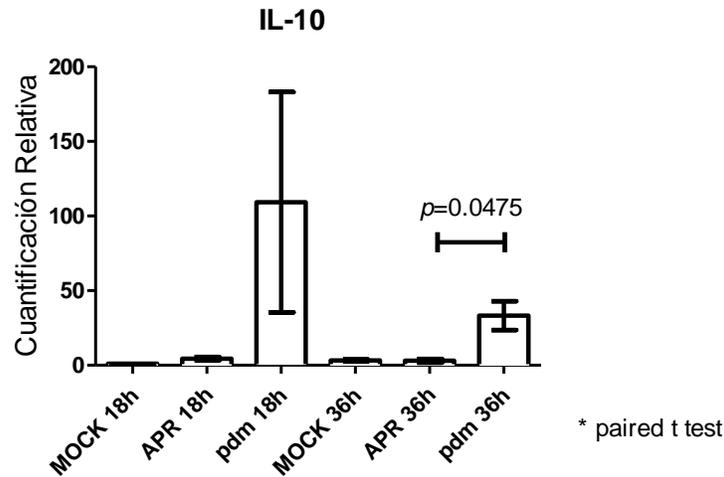


Figura 9. Niveles de expresión de RNAm de IL-10 en macrófagos infectados con el virus A/H1N1 y PR8.

En contraste, en etapas tempranas de infección con el virus pandémico la expresión de RNAm de resistina β (RETNL β) fue marcadamente menor que por la inducida por la infección con el virus estacional H1N1. Es importante notar que la expresión de RETNL β tuvo una disminución significativa a las 36hrs con este último, mientras que se observó un aumento en la expresión de RETNL β en macrófagos infectados con virus pdm A/H1N1 a las 36 horas, **Figura 10.**

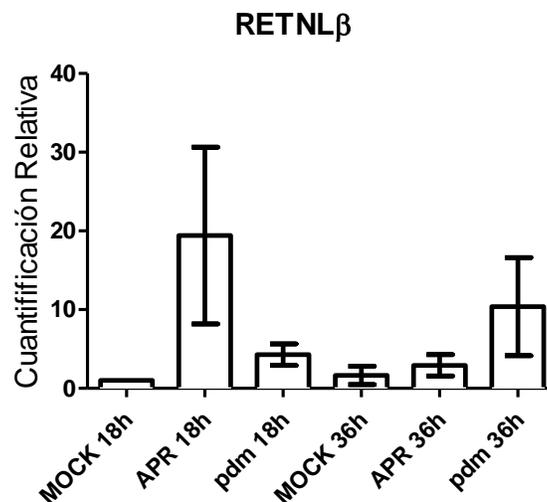


Figura 10. Niveles de expresión de RNAm de RETNL en macrófagos infectados con el virus A/H1n1 y PR8.

Como resultado del análisis de expresión de los genes supresores de la señalización de citocinas SOCS -1 y SOCS-3, observamos una expresión tardía de SOCS1 frente al virus pdm y un pequeño decremento de su expresión frente al virus estacional, a pesar de presentar una expresión similar al inicio de las infecciones como respuesta a ambos virus, **Figura 12.**

SOCS3 presentó una expresión temprana a las 18hrs del virus estacional, valor que disminuyó significativamente a las 36hrs de infección. En contraste a la respuesta dada por la infección del virus pandémico, donde se mantuvo la expresión de SOCS3 en ambos tiempos evaluados. Reflejando igual capacidad de inducción por ambos virus de SOCS3 solo en etapas tempranas de la infección, **Figura 11.** Finalmente, no se detectó expresión de Arginasa-1 (ARG-1) en ningún modelo de infección con virus A/H1N1 o PR8 (datos no mostrados).

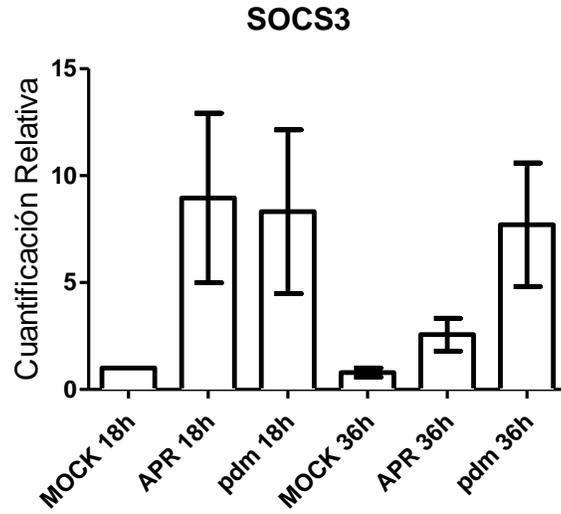


Figura 11. Niveles de expresión de RNAm de SOCS3 en macrófagos infectados con el virus A/H1n1 y PR8.

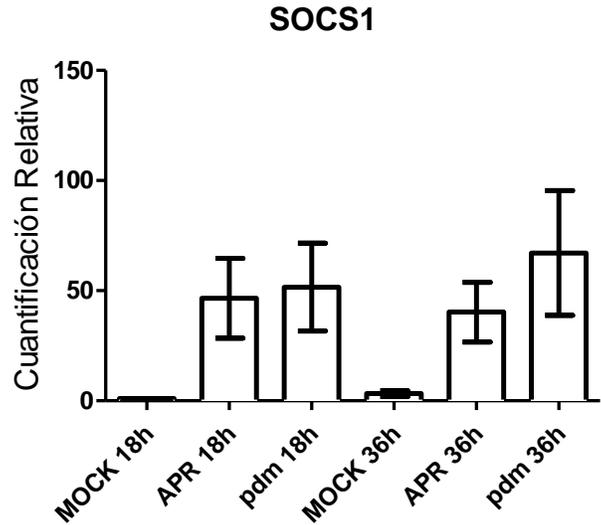


Figura 12. Niveles de expresión de RNAm de SOCS1 en macrófagos infectados con el virus A/H1n1 y PR8.

En la Tabla 1, se muestra un resumen de los niveles de expresión de cada uno de los RNAm de los genes relacionados con la polarización de macrófagos M1 o M2 en los modelos de infección con las diferentes de cepas virales tanto a 18 como a 36 horas.

Tabla 1. Expresión de RNAm de genes relacionados con la polarización de macrófagos M1 o M2.

		Estacional		Pandémico	
		A/PR8/34		A/H1N1	
		18hrs	36hrs	18hrs	36hrs
M1	TNFα	5.8	6.5	12.2	12.0
	IL-6	423.2	12.2	1937.8	1165.18
	IL-1β	17.5	0.7	74.3	61.1
	SOCS3	9.0	2.6	8.3	7.7
M2	SOCS1	46.6	40.3	51.6	67.1
	IL-10	4.46	3.0	109.3	33.3
	RETNLβ	19.4	2.9	4.3	10.4

**Se muestra el promedio de Expresión relativa (RQ) de cuatro cuantificaciones que se realizaron por triplicado.*

DISCUSIÓN

En México el virus de influenza pandémica A/H1N1 detectado en 2009, continúa circulando de manera anual, particularmente en la época invernal. En individuos susceptibles provoca neumonía con un espectro clínico amplio, que va desde formas leves hasta formas graves de neumonía y síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (SIRPA) [1-4]. Aunque la incidencia de los casos de neumonía por virus de influenza disminuye al inicio del segundo trimestre de cada año, la circulación de esta cepa viral y otras cepas estacionales causan problemas de salud considerables con una tasa importante de morbilidad, y en algunos casos mortalidad, particularmente cuando se asocian con otros factores como comorbilidades y factores virales. A pesar de que se han identificado diversos factores del huésped y del virus A/H1N1 que en buena medida contribuyen al desarrollo de formas graves de neumonía, los mecanismos de interacción entre factores del huésped y el patógeno aún no se han caracterizado de una manera detallada. En general se sabe que la infección por virus de influenza A/H1N1 causa traqueobronquitis debido a que el virus se une fundamentalmente a células epiteliales de las vías aéreas donde su principal complicación es la extensión a los alvéolos, lo que resulta en neumonía severa, a menudo acompañado de infección bacteriana [1, 3, 4, 5]. Además, las autopsias revisadas de casos comprobados de influenza A (H1N1) han mostrado predominantemente lesiones relacionadas con daño alveolar agudo grave, lesiones que se han observado en el síndrome respiratorio agudo severo (SARS), la cual parece estar relacionada con un incremento de diversas citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias, alterando así la

respuesta inmune inflamatoria [34]. Además, de que una rápida inducción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias sumado a una menor respuesta de anticuerpos al inicio de la infección apoya la noción de que una desregulación de la respuesta inmune del huésped en etapas tempranas de la infección, puede contribuir al aumento de la gravedad asociada con la infección por el virus pandémico A/H1N1 [38].

En relación con esto, la hiper-activación del sistema inmune podría explicar algunos aspectos de la patogénesis y la gravedad del curso clínico de la enfermedad. En estudios recientes, se han descrito niveles elevados de citocinas (IFN- γ , IL-6) y quimiocinas (CXCL8, CCL2) pro-inflamatorias y una respuesta celular predominantemente Th1 en sangre periférica de pacientes con neumonía grave asociada al virus A/H1N1 [5, 24, 25].

En el presente trabajo, se evaluaron los niveles de RNAm de diversas citocinas pro-inflamatorias y moléculas relacionadas con la polarización de macrófagos M1 (pro-inflamatorios) o M2 (reguladores), para tratar de identificar el perfil de polarización de macrófagos inducido por diferentes cepas de virus de influenza (estacional H1N1 (A/PR/8/34) y pandémico A/H1N1 2009) y las posibles alteraciones que pudiesen explicar porque en algunos individuos que presentan una neumonía grave asociada a la infección por el virus de influenza A/H1N1, se observa una elevada producción de mediadores inflamatorios. Como se muestra en los resultados, los niveles de expresión de RNAm de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α aumentaron significativamente durante la infección del virus pandémico A/H1N1, con respecto al virus estacional (A/PR/8/3) a las 18 y

36hrs de infección (Figura 6, 7, 8). Anteriormente, las tres citocinas se han descrito como principales mediadores secretados por macrófagos activados con fenotipo M1, induciendo cambios locales y generales durante una reacción inflamatoria, al promover la coagulación, incrementar la permeabilidad vascular, así como inducir la expresión de moléculas de adhesión sobre las células endoteliales. Específicamente la citocina TNF- α , que en este trabajo se muestra que mantiene su nivel de expresión con el paso del tiempo en la infección por el virus A/H1N1 pandémico de manera significativa (Figura 6). Se ha demostrado que TNF- α promueve una actividad fagocítica exacerbada y libera enzimas líticas de macrófagos activados, contribuyendo de manera importante a la emaciación tisular y por ende a una inflamación crónica.

Por otro lado, IL-10 es una citocina reguladora que de manera característica es producida en macrófagos con fenotipo M2 como respuesta a un proceso de activación. Sin embargo, en este trabajo observamos que la infección con el virus pandémico A/H1N1 de manera muy selectiva indujo una sobre-expresión de RNAm de IL-10 en relación a la infección con la infección por el virus estacional PR8. Se sabe que IL-10 actúa en monocitos y macrófagos interfiriendo en su capacidad de activar al subconjunto TH1 de células T, disminuyendo la expresión de moléculas MHC clase II, además de anular la producción de óxido nítrico. Pero por otro lado, actualmente también se asocia con un papel regulador durante una reacción de inflamación. Además es importante mencionar que los niveles altos de expresión de IL-10 pueden contribuir en la patogénesis de neumonía grave dada su influencia en la inhibición de la respuesta mediada por IFN- γ , lo cual podría

contribuir con una deficiente respuesta antiviral y una mayor capacidad de replicación viral. Niveles elevados de IL-10 se han observado de manera consistente en pacientes que desarrollan formas graves de neumonía por virus de influenza A/H1N1 pandémico [24] y en modelos experimentales [25].

En cuanto al virus estacional (A/PR/8/34) se observó una sobre-expresión RNAm de RETNL β en etapas tempranas de infección (Figura 10), el cual además de ser identificado como producto génico inducido durante las etapas iniciales de la inflamación pulmonar [31], representa a una familia de genes inducidos por la vía de señalización STAT6 la cual juega un papel fundamental en la mediación del efecto de citocinas a nivel de la transcripción para montar una respuesta de inflamación alternativa (M2) [30].

Por otro lado, se observó un aumento de la molécula de resistina a las 36hrs de infección con el virus pandémico A/H1N1, lo que puede representar un daño crónico de inflamación pulmonar según estudios anteriores, donde se ha reportado que en modelos de fibrosis pulmonar RETNL β se induce en el pulmón durante la fibrogénesis, sugiriendo que Retnl β derivado de macrófagos podría estar implicado en la fibrogénesis al promover la diferenciación y supervivencia de los miofibroblastos [40], dando por resultado un daño pulmonar con el paso del tiempo, como se ha llegado a observar en la patogenia de neumonía grave provocada por una infección del virus pandémico A/H1N1.

Se analizó la expresión de genes reguladores de citocinas (SOCS-1, SOCS-3) debido a que los cambios en la expresión de proteínas SOCS tienen un papel

crítico en la regulación de la producción de citocinas tanto de una respuesta innata como adaptativa, y en la regulación de la inmunidad contra el virus de influenza A [23]. Nuestros resultados muestran que los virus estacional (A/PR/8/34) y pandémico A/H1N1 inducen de manera eficiente la expresión de RNAm de los genes supresores de la señalización de citocinas SOCS-3 en etapas tempranas de la infección, sin embargo esta expresión se mantiene solo durante la infección del virus pandémico A/H1N1 (Figura 11), fenómeno que se ha descrito como parte de un patrón de activación clásica de los macrófagos o polarización M1, que promueve la destrucción de los tejidos, aunque solo en las primeras etapas de infección [25]. La expresión de RNAm de SOCS-1 aumentó tanto en etapas tempranas como tardías de la infección por ambos virus (Figura 12). En la literatura se ha descrito que el virus pdm A/H1N1 induce una menor expresión de SOCS1 en relación con virus estacional PR8, particularmente en las primeras fases de la infección (10 y 15 h) [25]. Además que SOCS1 en macrófagos M1, actúa para ajustar la expresión de mediadores proinflamatorios [41]. Sin embargo, también se ha descrito un retraso en la expresión de SOCS1 [25], lo cual coincide con el aumento de su expresión después de 36hrs de infección en nuestros resultados. Además, se ha mostrado que SOCS1 a pesar de su alta expresión no logra atenuar de manera significativa a SOCS3 con el virus pandémico, contrario al estacional que con poca expresión de SOCS1 a las 36hr, disminuye significativamente a SOCS 3. Datos que sugieren su papel divergente en la activación M1 y M2.

Es importante recalcar que a pesar de que arginasa 1 (Arg-1) es un marcador prototípico de activación alternativa, no se detectó expresión de RNAm de Arg-1 en macrófagos con infección por virus estacional y pandémico A/H1N1. Esta carencia de expresión de Arg-1, apoya la hipótesis en relación a que el virus pdm A/H1N1 es un potente inductor de macrófagos activados por la vía clásica M1.

En este trabajo se plantea que en la infección por el virus A/H1N1 hay un modelo de inflamación exacerbada caracterizada por una mayor inducción de RNAm de citocinas pro-inflamatorias y moléculas asociadas principalmente con el desarrollo de macrófagos con fenotipo M1.

Nuestros hallazgos sugieren que la producción de citocinas pro-inflamatorias puede ser estimulada, al menos parcialmente, por factores virales, las cuales podrían ser importantes como biomarcadores de manifestaciones graves de la infección por virus pdm A/H1N1. La sobreproducción de mediadores pro-inflamatorios inducidos por el virus pdm A/H1N1 en macrófagos circulantes, sugiere que esta cepa podría provocar el mismo fenotipo en macrófagos alveolares, induciendo un estado inflamatorio local y sistémico. También se propone que los macrófagos pulmonares M1 sobre-activados podrían ser críticos en el desarrollo de respuestas ante patógenos, contribuyendo de manera importante a la alteración en la regulación de la respuesta inmune y al daño pulmonar en las células del epitelio respiratorio.

CONCLUSIONES

- La infección experimental de macrófagos humanos con el virus A/H1N1 induce una mayor expresión de RNAm de TNF- α , IL-6 e IL-1 β en relación con la infección por virus estacional A/PR/8/34.
- El virus pandémico A/H1N1 induce la expresión de RNAm de genes que se asocian con el fenotipo de macrófagos M1.
- El virus A/H1N1 también induce altos niveles de RNAm de IL-10, la cual se asocia con la polarización de macrófagos por una vía alternativa (M2). Este fenómeno no se observa en la infección experimental con virus A/PR/8/34.
- La sobre-activación de macrófagos M1 podría contribuir con el desarrollo de un microambiente pro-inflamatorio y con la patogénesis de daño pulmonar mediada por la falta de regulación de la respuesta inflamatoria.

BIBLIOGRAFÍA

1. Perez-Padilla, R., et al., *Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico*. N Engl J Med, 2009. **361**(7): p. 680-9.
2. Babakir-Mina, M., et al., *Origin of the 2009 Mexico influenza virus: a comparative phylogenetic analysis of the principal external antigens and matrix protein*. Arch Virol, 2009. **154**(8): p. 1349-52.
3. Neumann, G., T. Noda, and Y. Kawaoka, *Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus*. Nature, 2009. **459**(7249): p. 931-9.
4. Bautista, E., et al., *Angiogenic and inflammatory markers in acute respiratory distress syndrome and renal injury associated to A/H1N1 virus infection*. Exp Mol Pathol, 2013. **94**(3): p. 486-92.
5. Dominguez-Cherit, G., et al., *Critically Ill patients with 2009 influenza A(H1N1) in Mexico*. JAMA, 2009. **302**(17): p. 1880-7.
6. Maines, T.R., et al., *Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice*. Science, 2009. **325**(5939): p. 484-7.
7. Webster, R.G., et al., *Evolution and ecology of influenza A viruses*. Microbiol Rev, 1992. **56**(1): p. 152-79.
8. Samji, T., *Influenza A: understanding the viral life cycle*. Yale J Biol Med, 2009. **82**(4): p. 153-9.
9. Nayak, D.P., et al., *Influenza virus morphogenesis and budding*. Virus Res, 2009. **143**(2): p. 147-61.
10. Whittaker, G.R., *Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for molecular medicine*. Expert Rev Mol Med, 2001. **2001**: p. 1-13.
11. Cross, K.J., L.M. Burleigh, and D.A. Steinhauer, *Mechanisms of cell entry by influenza virus*. Expert Rev Mol Med, 2001. **3**(21): p. 1-18.
12. Wu, W.W., Y.H. Sun, and N. Pante, *Nuclear import of influenza A viral ribonucleoprotein complexes is mediated by two nuclear localization sequences on viral nucleoprotein*. Virol J, 2007. **4**: p. 49.
13. Boivin, S., et al., *Influenza A virus polymerase: structural insights into replication and host adaptation mechanisms*. J Biol Chem, 2010. **285**(37): p. 28411-7.
14. Palese, P.a.S., M.L. *Orthomyxoviridae: The viruses and Their Replication*, in *Fields Virology*, D.H. Knipe, PM, Editor. 2007. p. 1647-1689.
15. Gatherer, D., *The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context*. J Clin Virol, 2009. **45**(3): p. 174-8.
16. Chan, M.C., et al., *Tropism and innate host responses of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus in ex vivo and in vitro cultures of human conjunctiva and respiratory tract*. Am J Pathol, 2010. **176**(4): p. 1828-40.
17. Medina, R.A. and A. Garcia-Sastre, *Influenza A viruses: new research developments*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(8): p. 590-603.
18. Kobasa, D., et al., *Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus*. Nature, 2007. **445**(7125): p. 319-23.
19. La Gruta, N.L., et al., *A question of self-preservation: immunopathology in influenza virus infection*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(2): p. 85-92.
20. Zuniga, J., et al., *Genetic variants associated with severe pneumonia in A/H1N1 influenza infection*. Eur Respir J, 2012. **39**(3): p. 604-10.
21. Monsalvo, A.C., et al., *Severe pandemic 2009 H1N1 influenza disease due to pathogenic immune complexes*. Nat Med, 2011. **17**(2): p. 195-9.

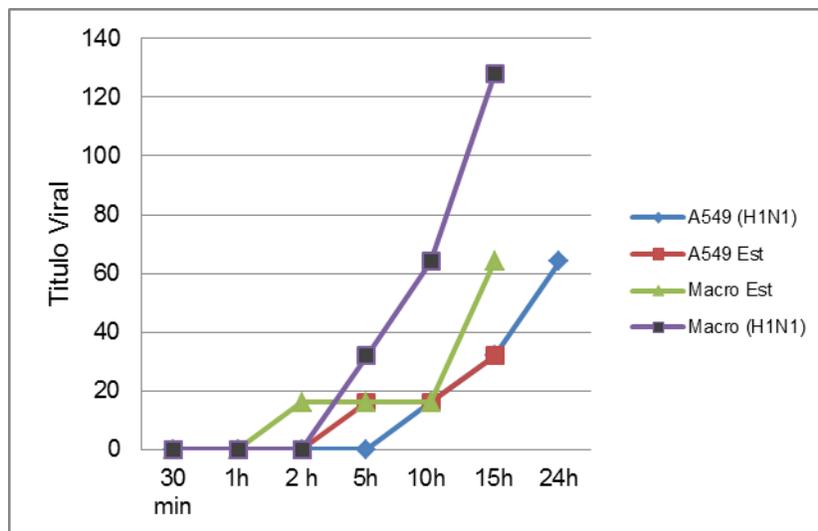
22. Kuwano, K., et al., *HA2 subunit of influenza A H1 and H2 subtype viruses induces a protective cross-reactive cytotoxic T lymphocyte response*. J Immunol, 1988. **140**(4): p. 1264-8.
23. Mackenzie, C.D., P.M. Taylor, and B.A. Askonas, *Rapid recovery of lung histology correlates with clearance of influenza virus by specific CD8+ cytotoxic T cells*. Immunology, 1989. **67**(3): p. 375-81.
24. Zuniga, J., et al., *Inflammatory profiles in severe pneumonia associated with the pandemic influenza A/H1N1 virus isolated in Mexico City*. Autoimmunity, 2011. **44**(7): p. 562-70.
25. Ramirez-Martinez, G., et al., *Seasonal and pandemic influenza H1N1 viruses induce differential expression of SOCS-1 and RIG-I genes and cytokine/chemokine production in macrophages*. Cytokine, 2013. **62**(1): p. 151-9.
26. Tugal, D., X. Liao, and M.K. Jain, *Transcriptional control of macrophage polarization*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(6): p. 1135-44.
27. Rutherford, M.S., A. Witsell, and L.B. Schook, *Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited*. J Leukoc Biol, 1993. **53**(5): p. 602-18.
28. M. A. Duque Correa, M.R.L., *Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente*. Inmunología, 2007. **6**(2): p. 73-86.
29. Thomas J. Kindt, R.A.G., Barbara A. Osborne, *Inmunología de Kuby*. 6 ed. 2007.
30. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
31. Mantovani, A., A. Sica, and M. Locati, *Macrophage polarization comes of age*. Immunity, 2005. **23**(4): p. 344-6.
32. Murray, P.J. and T.A. Wynn, *Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(4): p. 557-63.
33. Stutz, A.M., et al., *The Th2 cell cytokines IL-4 and IL-13 regulate found in inflammatory zone 1/resistin-like molecule alpha gene expression by a STAT6 and CCAAT/enhancer-binding protein-dependent mechanism*. J Immunol, 2003. **170**(4): p. 1789-96.
34. Endo, T.A., et al., *A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases*. Nature, 1997. **387**(6636): p. 921-4.
35. Yoshimura, A., T. Naka, and M. Kubo, *SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 454-65.
36. Naka, T., et al., *Negative regulation of cytokine and TLR signalings by SOCS and others*. Adv Immunol, 2005. **87**: p. 61-122.
37. Nakagawa, R., et al., *SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses*. Immunity, 2002. **17**(5): p. 677-87.
38. Martinez, F.O., et al., *Macrophage activation and polarization*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 453-61.
39. Pothlichet, J., M. Chignard, and M. Si-Tahar, *Cutting edge: innate immune response triggered by influenza A virus is negatively regulated by SOCS1 and SOCS3 through a RIG-I/IFNAR1-dependent pathway*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2034-8.
40. Tiwari, N., P. Kapoor, and T.N. Dhole, *Antibody and inflammatory response-mediated severity of pandemic 2009 (pH1N1) influenza virus*. J Med Virol, 2014. **86**(6): p. 1034-40.
41. Itoh, Y., et al., *In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses*. Nature, 2009. **460**(7258): p. 1021-5.
42. Bermejo-Martin, J.F., et al., *Host adaptive immunity deficiency in severe pandemic influenza*. Crit Care, 2010. **14**(5): p. R167.

43. Raes, G., et al., *Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation*. J Leukoc Biol, 2005. **77**(3): p. 321-7.
44. Whyte, C.S., et al., *Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 is a key determinant of differential macrophage activation and function*. J Leukoc Biol, 2011. **90**(5): p. 845-54.
45. Toby Lawrence, Gioacchino Natoli. *Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity*. Nature Reviews. Immunology. Vol.11 November 2001. 750-761.

ANEXOS

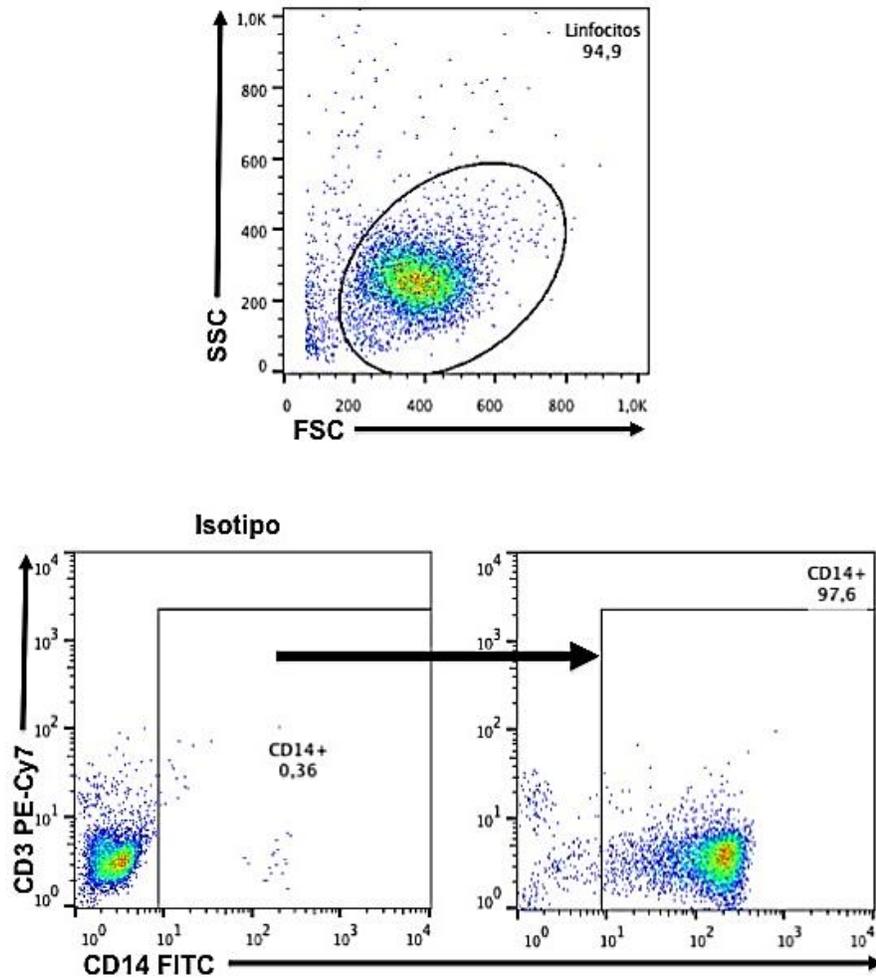
Anexo 1. Evaluación de la infectividad y capacidad de replicación de las cepas de virus de influenza A/H1N1 y PR8.

En esta figura se muestran los títulos virales obtenidos con el paso del tiempo de macrófagos y células A549 infectados con las cepas de influenza A/ H1N1/pdm y A/H1N1/estacional.



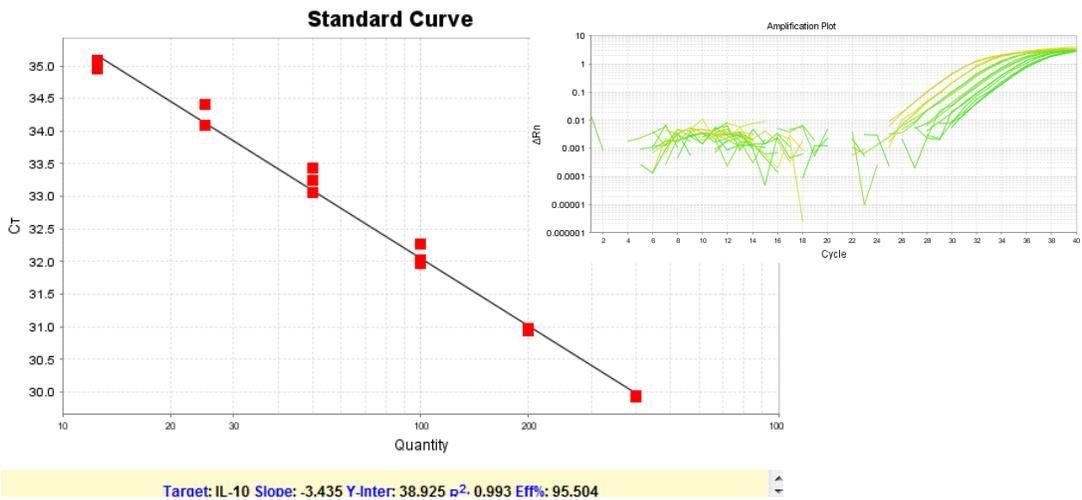
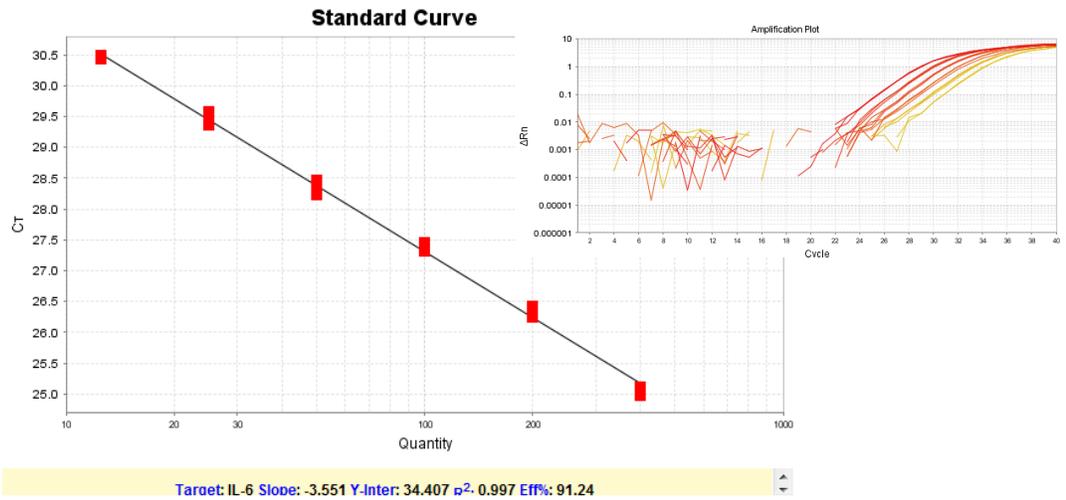
Anexo 2. Análisis de pureza de la separación de monocitos por citometría de flujo.

En esta figura se muestra la estrategia de análisis (gating) que se siguió para establecer la pureza de la población de células CD14+ mediante citometría de flujo. Como puede observarse se obtuvo una pureza mayor al 95%.



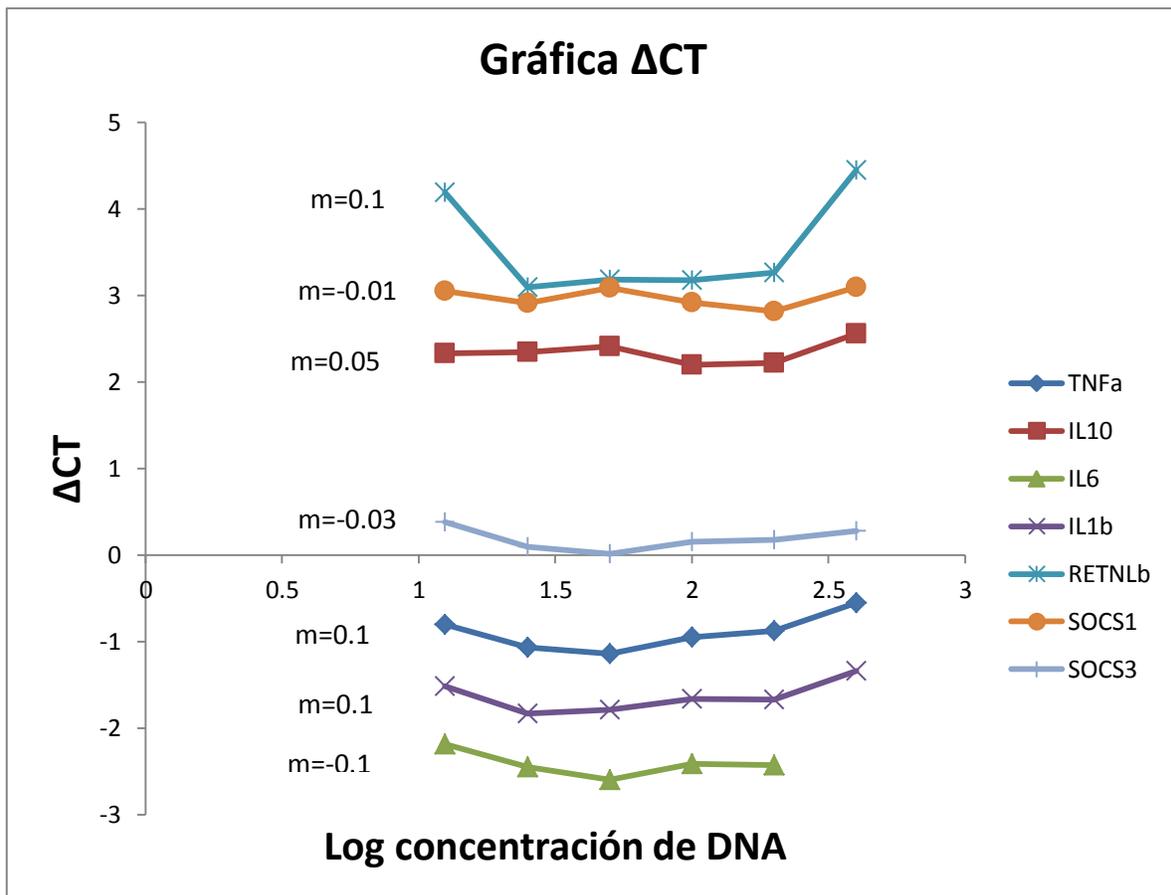
Anexo3. Eficiencias de Amplificación de genes analizados.

En estas figuras se muestran las curvas estándar para los RNAm de los genes estudiados, lo cual revela que la eficiencia de amplificación de las sondas Taqman fueron adecuadas, es decir, mayores al 90%.



Anexo 4. Validación de sondas Taqman

En esta figura se observa que las pendientes de la gráfica ΔCT de amplificación de sondas Taqman fueron adecuadas para su validación, todos los valores se encuentran entre -0.1 y 0.1.



Anexo 5

Durante mi estancia en el laboratorio de Inmunopatogénesis del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias colaboré en la publicación de un artículo de divulgación científica

Experimental and Molecular Pathology 97 (2014) 453–457

Contents lists available at ScienceDirect

Experimental and Molecular Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexmp

Obesity and pro-inflammatory mediators are associated with acute kidney injury in patients with A/H1N1 influenza and acute respiratory distress syndrome

Alfredo Cruz-Lagunas ^a, Luis Jiménez-Alvarez ^a, Gustavo Ramírez ^a, Criselda Mendoza-Milla ^{a,*}, Ma. Cecilia García-Sancho ^a, Federico Avila-Moreno ^b, Pedro Zamudio ^a, Francisco Urrea ^a, Blanca Ortiz-Quintero ^a, Victoria L. Campos-Toscuente ^a, Juan Morán ^a, Aldo A. Barrera ^a, David Martínez-Briseño ^a, Rosario Fernández-Plata ^a, Martha Patricia Sierra-Vargas ^a, Carolina Muñoz-Perea ^a, Samuel Illescas-Flores ^a, Edgar Bautista ^a, Benjamin T. Suratt ^c, José Rogelio Pérez-Padilla ^{a,**}, Joaquín Zuñiga ^{a,**}

^a Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico
^b Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM; FES-Iztacala, Unidad de Biomecánica, UBIMED, Mexico City, Mexico.
^c Department of Medicine, University of Vermont College of Medicine, Burlington, VT, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 September 2014
Accepted 7 October 2014
Available online 8 October 2014

Keywords:
A/H1N1 influenza infection
C-peptide
Insulin
Leptin
Acute kidney injury
AKI

ABSTRACT

Background: The obesity has been shown to increase the severity of A/H1N1 infection and the development of acute respiratory distress syndrome (ARDS) and organ involvement.

Methods: Circulating levels of C-peptide, insulin, glucagon, leptin, acute phase reactants (procalcitonin, C-reactive protein, tissue plasminogen activator, and serum amyloids A and P), were measured in samples from 32 critically ill patients with A/H1N1 virus infection, 17 of whom had ARDS complicated by acute kidney injury (AKI) and 15 of whom had ARDS but did not develop AKI.

Results: Patients with ARDS and AKI (ARDS/AKI) had higher BMI and higher levels of C-peptide, insulin, leptin, procalcitonin and serum amyloid A compared to those ARDS patient who did not develop AKI. Adjusting for confounding variables using logistic regression analysis, higher levels of C-peptide (>0.75 ng/ml) (OR = 64.8, 95% CI = 2.1–1980, p = 0.0006) and BMI > 30 kg/m² (OR = 42.0, 95% CI = 1.2–1478, p = 0.04) were significantly associated with the development of AKI in ARDS patients.

Conclusion: High levels of C-peptide and BMI > 30 kg/m² were associated with the development of AKI in ARDS patients due to A/H1N1 infection. These metabolic/obesity indicators, together with the profiles of pro-inflammatory acute phase proteins, may be important links between obesity and poor outcomes in A/H1N1 09 infection.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The A/H1N1 2009 virus (Smith et al., 2009) continues circulating every year in Mexico and many other countries and is associated with the development of acute respiratory distress syndrome (ARDS) in individuals with risk factors including obesity, diabetes, and chronic respiratory diseases (Bautista et al., 2010; Perez-Padilla et al., 2009). A growing body of evidence supports the hypothesis that the poor outcomes in patients with A/H1N1 09 infection is associated with a combination of host susceptibility and pathogen virulence factors that influence the immune activation and the viral infection (La Gruta et al., 2007; Lapinsky, 2010; Ramirez-Martinez et al., 2013). In addition, a high incidence of acute kidney injury (AKI) has been reported in patients with severe pneumonia from A/H1N1 2009 virus infection, with an associated high mortality rate (Nin et al., 2011; Pettila et al., 2011).

Viral pneumonia and ARDS are characterized by an extensive inflammatory response in the lung (Itoh et al., 2009; La Gruta et al., 2007). We, and others have previously examined the inflammatory mediator profiles of patients with severe forms of A/H1N1 09 disease (Bautista et al., 2013; Bermejo-Martin et al., 2010; Itoh et al., 2009; Monsalvo et al., 2011; Ramirez-Martinez et al., 2013; Zuniga et al., 2011). We have reported increased levels of several cytokines and chemokines such as IL-6, IL-10, CXCL8, and CCL5 in serum and bronchoalveolar lavage samples from these patients (Zuniga et al., 2011) and recently we showed that angiogenic and metabolic mediators such as

* Correspondence to: C. Mendoza-Milla, Department of Pulmonary Fibrosis, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Tlalpan 4502, Tlalpan 14080, Mexico City, Mexico.

** Correspondence to: J. Zuñiga, Department of Immunology, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Tlalpan 4502, Tlalpan 14080, Mexico City, Mexico.

E-mail addresses: criseldamendoza@gmail.com (C. Mendoza-Milla), joaquin@yahoo.com (J. Zuñiga).