



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Título

“Interacciones Moleculares que se establecen durante la infección del virus de parainfluenza tipo 1 en células HEp-2 y A549 que activan la producción de IL-8”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

M. en C. Miguel Ángel Galván Morales

TUTORES

DRA. PATRICIA MARGARITA TATO ZALDIVAR

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DRA GRADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM

†DRA. MA EUGENIA MANJARREZ ZAVALA†

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

México D. F., a febrero de 2015

Desde luego a mi madre, Alicia Morales Guerra

a

Eloisa Guerra Ceballos, Ma del Carmen Morales Guerra

a

Sharon, Raziel y Emy

Quiero agradecer muy en especial a la Dra. Hortencia Hernández Ruiz por su ayuda y apoyo incondicional en todo momento y circunstancia, pero más en esta travesía.

También mi más profundo agradecimiento a la Dra. Maria Eugenia Manjarrez Zavala por haberme inducido a seguir esforzándome y superándome. Sin su apoyo no se hubiera logrado y se que se encuentra hoy, en un mejor lugar.

A la Dra. Patricia Tato Zaldivar y a la Dra. Gladis del Carmen Fragoso González, por su ayuda, por los sabios consejos, por permanecer al pendiente de mi desarrollo y por haber hecho tanto por mí.... Gracias.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme formado, y a CONACYT por su apoyo

A mis hermanos; Guillermo, Rosa, Benito, Alicia, Margarita, Eloisa, Hortencia y Oscar, por ser mis hermanos y a Pablo Ugalde por ser mi cuñado.

Gracias a todos los que me ayudaron

ÍNDICE

Páginas

ABREVIATURAS	
FIGURAS Y TABLAS	
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	5
<i>II.1. Sistema respiratorio y enfermedades virales</i>	5
<i>II.2. Familia Paramyxoviridae</i>	6
II.2.1. Morfología y genoma de la familia <i>Paramyxoviridae</i>	7
II.2.2. Estructura y función de las proteínas virales	8
<i>II.3. Virus de Parainfluenza (hPIV)</i>	9
II.3.1. Organización estructural	9
II.3.2. Infección y Epidemiología	12
<i>II.4. Virus de Parainfluenza tipo 1(hPIV-1)</i>	13
II.4.1. Características del hPIV-1	14
II.4.2. Estructura del hPIV-1	14
II.4.3. Genoma y proteínas	15
II.4.4. Ciclo de replicación	19
II.4.5. Epidemiología e impacto de las infecciones por hPIV-1	21
<i>II.5. Respuesta inmune contra virus</i>	25

II.6.	<i>Mecanismos efectores de la respuesta contra virus hPIV</i>	31
II.7.	<i>Citocinas proinflamatorias (Quimioquinas)</i>	33
II.8.	<i>Interleucina 8</i>	36
II.8.1.	Receptores de IL-8.....	38
II.8.2.	Función de Interleucina 8	40
II.8.3.	Isoformas de IL-8	41
II.8.4.	Células blanco de IL-8.....	42
II.8.5.	Transducción de señales	43
II.9.	<i>Proteínas Cinasas Activadas por Mitogenos (MAPK's)</i>	44
II.9.1.	Características generales.....	44
II.9.2.	Vía de señalización JNK/SAPK	48
II.9.3	p38 y vías de señalización	50
II.9.4	Vía regulada por ERK insulina/mitógeno.....	51
I.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	55
II.	JUSTIFICACIÓN	55
III.	HIPÓTESIS	56
IV.	OBJETIVO GENERAL	56
VI.1.	<i>Objetivos particulares</i>	56
V.	MATERIAL Y MÉTODOS	57
VII.1.	<i>Líneas celulares</i>	57
VII.2.	<i>Propagación del hPIV-1</i>	57
VII.3.	<i>Titulación del hPIV-1</i>	58
VII.4.	<i>Inactivación del hPIV-1</i>	59
VII.5.	<i>Titulación por hemaglutinación</i>	59

VII.6.	<i>Cuantificación de IL8 por el Método de ELISA.....</i>	61
VII.7.	<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa y Transcripción inversa (RT-PCR)</i>	62
VII.8.	<i>Determinación de IL8 por el Método de ELISA en sobrenadantes de cultivos pretratados con inhibidores de cinasas.....</i>	63
VII.9.	<i>Western blot para detección de la fosforilación MAPK's (ERK, JNK y p38) en células infectadas con hVPI-1.....</i>	64
VII.10.	<i>Análisis Estadístico.....</i>	66
VI.	RESULTADOS.....	67
VIII.1.	<i>Inactivación del hPIV-1</i>	67
VIII.2.	<i>Producción de IL-8 en líneas celulares infectadas con el virus vivo e inactivado.....</i>	68
VIII.3.	<i>Reacción en Cadenade la Polimerasa y Transcripción inversa</i>	70
VIII.4.	<i>La Infección de hPIV-1 inactivado con UV no estimula la fosforilación de MAPK</i>	71
VIII.5.	<i>Fosforilación de las MAPKs</i>	72
VIII.6.	<i>Dosis para la Inhibición de las MAPKs en la Infección del hPIV-1.....</i>	77
VIII.7.	<i>Inhibición de las MAPKs en la Infección del hPIV-1.....</i>	78
VIII.8.	<i>Representación gráfica de la vía de señalización de las MAPKs.....</i>	79
VII.	DISCUSIÓN.....	82
VIII.	CONCLUSIÓN.....	87
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

ABREVIATURAS

A549	Células alveolares de adenocarcinoma humano epitelial tipo-II
aa	Aminoácidos
Ac	Anticuerpo
ADCC	Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
Ang II	Angitensina II
AP1	Proteína activadora-1
ASK1	Cinasa-1 señal de regulación de apoptosis
ATF2	Factor de activación de la transcripción-2
BMK1	Proteína Cinasa Grande activada por mitógeno
Cdc42	Ciclina-42 de la División Celular
CM ₂₄	Caja múltiple de 24 pozos
CO ₂	Dióxido de carbono
CREB	AMPC respuesta al elemento proteína de union
CRNP	Complejo Ribonucleoproteíco
CV	Coefficiente de variación
CXC	Quimiocinas cis-X-cis
CHOP	Proteína homóloga-C/EBP
DNA	Ácido Desoxiribonucleíco
D.O.	Densidad óptica
DPC4	Eliminado en Carcinoma Pancreático-4
dsRNA	RNA de doble cadena

ECP	Efecto citopático
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
eIF2a	Subunidad eucariota de factores de iniciación 2
ELISA	acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinases: Cinasa regulada por señales extracelulares
FD	Factor de dilución
FGF	Factor de crecimiento de Fibroblastos
GDP	Guanosín Difosfato
GCK	Cinasa de Centro Germinal Quinasa
GCKR	Cinasas GCK-relacionadas
GLK	Cinasa-GCK
GRB2	Proteína-2 del factor de crecimiento unido al receptor
GTP	Guanosín Trifosfato
HAU	Unidades de hemaglutinación
HEp-2	Lineas celulares del carcinoma epidermoide de laringe
HGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Hematopoyético
HGK	Cinasa-HPK/GCK
HN	Hemaglutinina-Neuraminidasa
H ₂ O	Agua
hPIV-1	Virus parainfluenza humano tipo 1
HPK1	Cinasa-1 de progenitoras hematopoyéticas
HSP25/27	Proteína de choque térmico

IgA	Inmunoglobulina del tipo A
IL-8	<i>Interleukine 8</i> : Interleucina 8
IL	Interleucina
IFN	Interferón
IFN- γ	Interferón-gamma
IR	Infecciones Respiratorias
IRAs	Infecciones respiratorias agudas
JNK/SAPK	Stress-activated protein kinases SAPK/c-Jun N-terminal kinases
kDa	Kilodaltones
KAR	Receptor activador de las <i>Natural Killer</i>
KIR	Receptor inhibidor de las <i>Natural Killer</i>
L	Polimerasa viral
LRI	Laringotraqueitis
M	Proteína de Matriz
MAPK	<i>Mitogen activity protein kinase</i> : Proteína cinasa activada por mitógenos
MADD	Dominio de Muerte Activador de MAP-cinasa
MAPKKK	MAPK Cinasa Cinasa
MAPKAPK2	Proteína cinasa-2 activada por MAPK
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1: Proteína quimioatrayente de monocitos-1
MEM	Medio esencial mínimo

µg	microgramos
MHCII	acrónimo para del inglés Major Histocompatibility Complex: (Complejo principal de histocompatibilidad)
ml	mililitros
MLK2/3	Cinasa de linaje mixto-2/3
µm	micrometros
mM	milimolar
MNK1	MAPK de interacción con la cinasa-1
MOI	Multiplicidad de infección
MSK1	Cinasa-1 Activada por mitógeno y estrés
NaCl	Cloruro de sodio
NaF	Fluoruro sódico
Na ₂ MoO ₄	Molibdato de sodio
Na ₃ VO ₄	Sodio Ortovanadato
NFAT4	Factor Nuclear Activador de células T
NIK-asociado	Cinasa inductora de NF-kappaB
NK	Natural Killer: Células naturales asesinas
nm	nanómetros
NP	Nucleoproteína
2'5' OAS	2'5' oligoadenilato sintetetasas
P	Fosfoproteína
p<0.005	Significancia estadística
PAK	Cinasa activada por p21

PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> : -solución salina-amortiguador de sales de fosfato
PDGF	Factor de crecimiento derivado de Plaquetas
pg	picogramos
pH	Potencial de Hidrógeno
PKR	Proteína Cinasa R
PM	Peso Molecular
PMN	Polimorfonucleares
RANTES	(Chemykin) <i>Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted</i> : (Quimiocina) Regulado por la activación, expresado y secretado por células T normales
Rh	Factor Rh
RNA	Ácido ribonucleíco
RNAm	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio libre de suero
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription: Transductor de señal y activador de la transcripción
SEK1	Cinasa-1 SAPK/ERK
SFB	Suero fetal bovino
SH3	Src-homología de dominio-3
SMAD3	Sma relacionada con la Proteína Mad-3
TAK1	TGF- β cinasa-1 activado

TGF	Transforming growth factor: Factor de crecimiento Transformador
TGFβ	Factor beta de Crecimiento Transformante beta
TLR	<i>Toll-like receptor</i> : Receptor tipo Toll
TMB	Tetrametilbencidina base odihidrocioruro
TNF	Tumor Necrosis Factor: Factor de Necrosis Tumoral
TNFR	Receptor del Factor de Necrosis Tumoral
TRAF2	Factor -2 asociado a Receptores de TNF
Tris-HCl	Trisaminometano hidrocioruro
TPL2	Locus-2 del Tumor de Progresión
U	Unidades
UFP	Unidades formadoras de placa
UV	Rayos ultravioleta
VSR	Virus Sincitial Respiratorio
ZPK	Proteína cinasa de zipper

FIGURAS Y TABLAS

	Págs
Tabla 1. Clasificación taxonómica de la familia Paramyxoviridae.....	6
Figura 1. Genoma de los virus de Parainfluenza (hPIV).....	11
Figura 2. Microscopía electrónica de hPIV.....	12
Figura 3. Virión de Parainfluenza tipo 1 (hPIV-1).....	15
Figura 4. Ciclo replicativo de Parainfluenza tipo 1 (hPIV-1).....	21
Figura 5. Estructura tridimensional de quimiocinas proinflamatorias.....	35
Figura 6. Estructura tridimensional de IL-8.....	42
Tabla 2. Diluciones del hPIV-1.....	59
Figura 7. Determinación del número de partículas infecciosas en una suspensión viral (ensayo de placas líticas).....	66
Figura 8. Pruebas de hemaglutinación para demostrar que la actividad hemaglutinante del virus no fue dañada por la inactivación UV.....	67
Figura 9. Cinética de producción de IL-8 durante la Infección con el hPIV-1.....	68
Tabla 3. Secreción de IL-8 (pg/ml) en células HEp-2 y A549 infectadas con hPIV-1 activo e inactivo.....	69
Figura 10. Expresión de IL-8 en HEp2 y A549 infectadas con el hPIV-1.....	70
Figura 11. Cinética de expresión de MAPKs con virus inactivo.....	71
Figura 12. Detección de la fosforilación de ERK1/2 en células HEp-2 y A549 infectadas con hPIV-1.....	73
Figura 13. Detección de la fosforilación de JNK/SAPK en células HEp-2 y A549 infectadas con hPIV-1 a diferentes tiempos.....	74

Figura 14. Detección de la fosforilación de p38 en células HEp-2 y A549 infectadas con hPIV-1 a diferentes tiempos.....	75
Figura 15. Pruebas de dosis para los inhibidores de MAPKs.....	76
Figura 16. Cinética de Inhibición de MAPKs (secreción de IL-8 en células HEp-2 pre-tratadas con los inhibidores ERK, JNK y de p38).....	73
Tabla 4. Secreción de IL-8 en células HEp-2 pre-tratadas con los inhibidores ERK, JNK y de p38.....	74
Figura 17. Esquema de la activación de p38 para la secreción de IL-8 en la infección de hPIV.....	75



RESUMEN

El virus de parainfluenza humano tipo 1 (hPIV-1) es el agente causal más importante del "Croup" en lactantes. La mayoría de los virus que infectan las vías respiratorias inducen una respuesta inflamatoria que implica la participación de IL-8. El objetivo de este estudio fue evaluar la producción de IL-8 durante la infección del hPIV-1 y describir los posibles mecanismos de activación a través de la vía de las MAPK's que inducen su producción. Para ello, se utilizó un modelo *in vitro* de la infección del hPIV-1 que fue desarrollado en dos líneas celulares diferentes, HEp-2 y A549. La producción de IL-8 fue determinada por ELISA, y la fosforilación de MAPK's involucradas fue identificada por ensayos de Western blot. Para conocer cuál de las MAPK's era la que participaba en la expresión de la IL-8 se usaron inhibidores específicos para ERK, JNK y p38. También se evaluó si se requiere la replicación viral para la producción de IL-8 usando virus inactivo. En los resultados se observó un aumento de la producción de IL-8 en los primeros tiempos utilizados, alcanzando el máximo a las 12 hrs y no así con el virus inactivado. Se comprobó la fosforilación de MAPK's y al utilizar el inhibidor de p38, se observó la disminución total de IL-8. Por lo anterior, se concluyó que la producción de IL-8 en las líneas celulares debido a la infección del hPIV-1 está relacionada con la fosforilación de p38 y la producción de IL-8 está asociada con la replicación viral.



ABSTRACT

The human parainfluenza virus type 1 (hPIV-1) is the most common causative agent of croup in infants. Most viruses that infecting the respiratory tract induce an inflammatory response involving the participation of IL-8. The aim of this study was to evaluate the production of IL-8 during infection with hPIV-1 and explain the mechanisms of activation through the MAPK that induce their production. In order to achieve this purpose, an in vitro model hPIV-1 infection was developed in two different cell lines, HEp-2 and A549. IL8 production was determined using ELISA, and MAPK phosphorylation involved was identified by Western blot assays. Specific inhibitors for each kinase ERK, JNK and p38 were used to identify which MAPKs are involved in the IL-8 production. Likewise, we evaluated if required for viral replication IL-8 production using inactivated virus. The results showed that was a gradual increase in the production of IL-8 after early infection and reach its maximum after 12 hrs time points analyzed and not with the inactive virus. MAPK phosphorylation was verified, and to use the p38 kinase inhibitor can achieve complete reduction of IL-8. I therefore conclude that the production of IL-8 in these cell lines hPIV-1 infections is tightly associated with phosphorylation of p38 and IL-8 production is associated with viral replication.



I. INTRODUCCION

El hPIV-1 infecta tanto al tracto respiratorio alto como al bajo, causa enfermedades leves como resfriado común, faringitis y otras o infecciones graves como croup, neumonía y bronquiolitis, padecimientos que se clasifican como Infecciones Respiratorias Agudas (IRAs). Es responsable de hasta la mitad de las hospitalizaciones por enfermedades del tracto respiratorio en menores de cinco años y en el adulto mayor (1-3).

Durante el proceso infeccioso se desconocen cuáles son los posibles mecanismos patogénicos que activa el hPIV-1. Se ha reportado que los mecanismos de respuesta para contrarrestar las infecciones virales son locales y participan los sistemas de defensa innatos y adaptativos (4). En particular, es importante la inflamación en la que se ha documentado la participación de citocinas como interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) (5-7).

IL-8 es responsable del reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y mastocitos que participan en el infiltrado inflamatorio local (8). Recientemente fue demostrado que células epiteliales, macrófagos alveolares y neutrófilos en humanos liberan IL-8 en respuesta a la infección por el Virus Sincitial Respiratorio (VSR) (también de la familia *Paramyxiviridae*) (9-12). Otros autores han reportado que la infección con el virus sincitial respiratorio (VSR) y el virus varicela-zoster activan la secreción de IL-8 sin la necesidad de la replicación viral (13-15). Estas observaciones indican que la interacción entre el virus y su receptor es suficiente para promover las vías de señalización que activan el gen de la IL-8. Sin embargo, en otros virus como el virus de la viruela y el rinovirus, la replicación es necesaria para la producción de IL-8 (16-18). Se ha demostrado que los virus tienen efectos diferentes en la



regulación, expresión y secreción de IL-8. Los más destacados ejemplos incluyen los Filovirus de Marburg y Ebola, arenavirus y Lassa y Junín (19, 20). Otros ejemplos de la producción de IL-8 incluyen virus, tales como VSR, adenovirus y el virus del herpes (21, 22).

Por otro lado, esta químicina está estrechamente relacionada con la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK's), las vías de estas cinasas pueden ser moduladas por fosforilación y desfosforilación en cada paso del camino (23-25).

Por lo anterior, para describir cuales son los posibles mecanismos moleculares que pueden estar relacionados en la producción de IL-8 durante la infección de hPIV-1, y si la replicación del virus es necesaria en la secreción de IL-8, se evaluó la infección con hPIV-1 en dos líneas celulares HEp-2 y A549, que representa a la vía aérea superior e inferior respectivamente. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar si existe secreción de IL-8 en las líneas celulares del aparato respiratorio y si es necesaria la replicación del virus o solo con el contacto celular es suficiente para la secreción y, por último, si ERK1/2, JNK/SAPK y/o p38 participan de forma directa en la secreción de IL-8, para que con ello se pueda proponer una estrategia para la terapia.



II. ANTECEDENTES

II.1. *Sistema respiratorio y enfermedades virales*

El sistema respiratorio humano está formado por un conjunto de órganos situados en la cara, cuello y tórax, tiene como función principal llevar el oxígeno a todas las células del organismo y eliminar del cuerpo el dióxido de carbono producido por el metabolismo celular. Los pulmones son los órganos centrales del sistema respiratorio donde se realiza el intercambio gaseoso; el resto de las estructuras llamadas vías aéreas o respiratorias actúan como conductos para que pueda circular el aire inspirado y espirado hacia y desde los pulmones, respectivamente. Otra función de estas estructuras es detener la entrada de microorganismos que pueden causar infecciones locales o de tipo sistémico (26).

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) son afecciones muy frecuentes y constituyen una importante causa de morbilidad y mortalidad en todas las edades. Según su localización, existen las infecciones de vías respiratorias (IR) altas, que son las que afectan al tracto respiratorio superior y las IR bajas que afectan al tracto respiratorio inferior. Frecuentemente estas infecciones son ocasionadas por virus, que penetran por vía aérea y se replican en el tracto respiratorio, la transmisión se produce también a través del aire por gotitas de flügge o bien por manos u objetos contaminados con secreciones respiratorias (27).

Las IRAs representan un problema prioritario de salud pública a nivel mundial, ya que producen alta morbimortalidad en los meses de invierno y constituyen el motivo principal de consulta en atención primaria de centros hospitalarios (28-30).



Numerosos virus afectan predominantemente y en forma primaria el aparato respiratorio, entre ellos los que se agrupan dentro de la familia *Paramyxoviridae*.

II.2. Familia *Paramyxoviridae*

La familia *Paramyxoviridae* pertenece al orden de los mononegavirales, los virus de esta familia presentan un genoma de RNA de una sola hebra de polaridad negativa. Para la clasificación de la familia se consideran características morfológicas, organización del genoma y actividades biológicas de las proteínas. La familia se divide en dos subfamilias: *Paramyxovirinae*, que contiene cinco géneros: Rubulavirus, Avulavirus, Respirovirus, Henipavirus y Morbillivirus; y la subfamilia *Pneumovirinae*, integrada por los géneros Pneumovirus y Metapneumovirus (Tabla 1) (31, 32).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la familia *Paramyxoviridae*

SUBFAMILIA	GÉNERO	VIRUS
<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Rubulavirus</i>	Virus de las paperas (MuV)
		Parainfluenza virus 5 (PIV5)
		Parainfluenza virus tipo 2, 4a y 4b humano (hPIV)
		Mapuera virus
		Rubulavirus Porcino
	<i>Avulavirus</i>	Virus de la enfermedad de Newcastle (aviar NDV)
		Virus Sendai (ratón SeV)
	<i>Respirovirus</i>	Parainfluenza virus tipo 1 humano (hPIV-1)
		Parainfluenza virus tipo 3 bovino (bPIV-3)
	<i>Henipavirus</i>	Virus Hendra (HeV)
		Virus Nipah (NiV)
	<i>Morbillivirus</i>	Virus del Sarampión (MeV)
		Morbillivirus cetáceo
		Virus del moquillo canino (CDV)
		Virus de la peste de rumiantes pequeños
		Virus del moquillo porcino



	Virus de la peste bobina
	Virus Sincitial Respiratorio humano A2, B1, S2 (hRSV)
<i>Pneumovirus</i>	Virus Sincitial Respiratorio bovino (bRSV)
<i>Pneumovirinae</i>	Virus de la neumonía del ratón (PVM)
	Metapneumovirus humano (hMPV)
<i>Metapneumovirus</i>	Metapneumovirus aviar
	Virus Fer-de-Lance (FDLV), Virus Tioman (TiV),
Paramixovirus no clasificados	Paramixovirus Tupaia (TPMEV), Virus menangle
	Virus Beilong, Virus J, Virus Mossman (MoV)
	Virus Salem, Virus Nariva

II.2.1. Morfología de la familia *Paramyxoviridae*

La forma de estos virus es esférica o pleomórfica de aproximadamente 250 nm de diámetro. El virión está constituido de un 70% por proteínas, 6%, de carbohidratos, 2% de RNA y el 20% restante son lípidos provenientes del hospedero. Ingresa a la célula blanco por interacción entre la glicoproteína de unión viral y el receptor celular. En los Paramyxovirus y Rubulavirus, los receptores celulares son moléculas de ácido siálico mientras que, para los Morbillivirus, el receptor que reconoce en la célula blanco humana, es la proteína CD46 (proteína de membrana tipo I que tiene actividad de cofactor para la inactivación de los componentes del complemento C3b y C4b) y para los Pneumovirus se desconoce el receptor (31). Todos utilizan la proteína F para su penetración, la glicoproteína participa en la fusión de la envoltura del virión con la membrana celular, la entrada tiene lugar a pH neutro lo que permite la liberación de la nucleocápside viral al interior de la célula. En la penetración su cubierta lipídica se funde con la membrana, ya que son de la misma naturaleza (32, 33).



II.2.2. Estructura y función de las proteínas virales

La Nucleoproteína (NP) está constituida de aproximadamente 489 y 553 aminoácidos (aa) y posee dos dominios. Entre los paramyxovirus, la región del anillo terminal de la proteína se encuentra conservada (alrededor del 80%), mientras que, la región carboxilo terminal es menos conservada (20%). En la replicación viral, la NP tiene varias funciones como la encapsidación del RNA viral, durante la transcripción y la replicación, se asocia con la P-L polimerasa y es probable que interaccione con la proteína M durante el ensamblaje del virus (31).

La Fosfoproteína (P) es una proteína variable en su longitud dentro de los virus de esta familia, está compuesta por dos dominios el N-terminal y el C-terminal, separados por una región hipervariable. Esta proteína se caracteriza por presentar un alto nivel de fosforilación, desempeña un papel importante en la síntesis de RNA y junto con la proteína L forman la polimerasa viral (P-L) que en conjunto con la NP forma un complejo que activa la encapsidación del RNA llamado “complejo ribonucleoproteico” (CRNP) (34). Las proteínas accesorias no esenciales del gen P, son las proteínas C, V, D, W, I y SH. El gen P codifica para las proteínas: P/V/C en los hPIV y sólo el virus Sendai expresa 7 polipéptidos que incluyen: P, V, W, C', C, Y1 y Y2.



II.3. Virus de Parainfluenza (hPIV)

El virus de parainfluenza humano (hPIV) es un importante patógeno del tracto respiratorio que afecta a todos los grupos de edad, con mayor incidencia en los extremos de la vida (menores de un año y mayores de 65 años). Se han reportado 5 serotipos (1, 2, 3, 4a y 4b), los virus hPIV-1 y hPIV-3 se agrupan dentro del género *Respirovirus* (anteriormente *paramyxovirus*) y los virus hPIV-2, hPIV-4a y hPIV-4b en el género de *Rubulavirus* (Figura 1).

Ambos géneros se separaron morfológicamente a partir del virus de la influenza (*myxovirus*) por su nucleocápside gruesa no segmentada (17 nm frente a 9 nm) (35, 36). Otros géneros de la familia *Paramyxoviridae* se pueden distinguir del hPIV por la ausencia de la neuraminidasa (Morbillivirus, por ejemplo, virus del sarampión y el virus del moquillo) o por poseer una nucleocápside más delgada (*Pneumovirus*, por ejemplo, el virus sincitial respiratorio [VRS], o *metaneumovirus*). Los megamyxoviruses aún están siendo descritos, pero parece que filogenéticamente están más estrechamente relacionados con los Morbillivirus que con el hPIV. Otros paramyxovirus con menor incidencia en el hombre y de reciente descripción son los virus Hendra y Nipah (31, 37).

II.3.1. Organización estructural

Por microscopía electrónica se demostró que el hPIV es un virus pleomórfico y con envoltura (Figura 2). Su envoltura deriva de la membrana plasmática de la célula huésped que infecta. Los virus de parainfluenza fueron aislados en 1956, su tamaño es de 100 a 300 nanómetros de diámetro, con aproximadamente 15,000



nucleótidos; los cuales se organizan para codificar al menos seis proteínas estructurales comunes (3' NP, P / C / V, M, F, HN y L 5') (Figura 1). Los hPIV de los géneros *Respirovirus* y *Rubulavirus* tienen una proteína con actividad de hemaglutinina y neuraminidasa (HN) que es la proteína de unión al receptor celular y que además es sialidasa, estas glicoproteínas de superficie tienen un Peso Molecular (PM) de 69,000 a 82,000 y la proteína de fusión F (60,000 a 66,000). Por electroforesis se ha demostrado que, existe una gran similitud en el tamaño de las proteínas entre los cuatro tipos principales de hPIV, excepto para la fosfoproteína P de hPIV-2 y hPIV-4 que tienen un PM de 49,000 a 53,000 respecto al hPIV-1 y hPIV-3 que es de 83,000 a 90,000 (37-40).

La proteína más grande del hPIV es la proteína L "(large)" o "grande" (polimerasa, con PM 175,000 a 251,000), seguido por la fosfoproteína P (hPIV-1 y hPIV-3). Estas dos proteínas virales así como la proteína de la nucleocápside (N o NP) (PM 66,000 a 70,000) están estrechamente asociadas con el RNA viral (RNAv) (37).

Por otro lado, se ha descrito que en algunos de los paramyxovirus, el Gen P produce proteínas pequeñas no estructurales a partir de múltiples marcos de lectura superpuestos. La edición adicional del RNAm ocurre para producir estas proteínas. Por ejemplo, hPIV-1, hPIV-2, hPIV-3 codifican una proteína no estructural; la proteína C (38); hPIV-2 y quizás hPIV-3 tienen una proteína no estructural adicional denominada V, proteína que no tiene el hPIV-1. Esta última proteína tiene varias acciones: se une a la proteína NP y desempeña un papel en la regulación de la replicación viral. Sin embargo, la distribución de la proteína V (núcleos y citoplasma) no es similar a la de la proteína NP o P (gránulos citoplásmicos) dentro de las células infectadas por virus (38). Estudios recientes



sugieren que la desaceleración el ciclo celular podría ser una manera en que la proteína V favorece la replicación viral (41-43). Además, podría estar implicada, en los Rubulavirus, en la inhibición de la respuesta de interferón mediante la inducción de la degradación del transductor de señal y activador de la transcripción (STAT1 y/o STAT2 por sus siglas en inglés) (44- 46). Otra proteína que puede realizar la misma función es la C de hPIV-1. Esta interacción de las proteínas V y C con el interferón puede ser importante en la determinación de la de la infectividad en el huéspedes para algunos hPIV. Por otra parte, se ha descrito que hPIV -3 tiene una proteína no estructural única, la D, que es una quimera del gen P con un segundo marco de lectura interno (1, 35, 37).

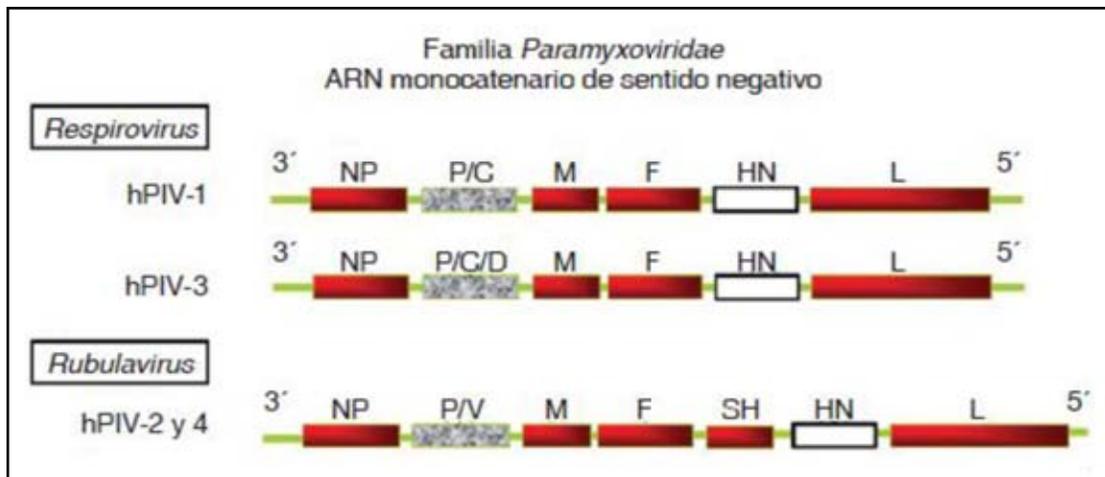


Figura 1. Genoma de los virus de Parainfluenza (hPIV)

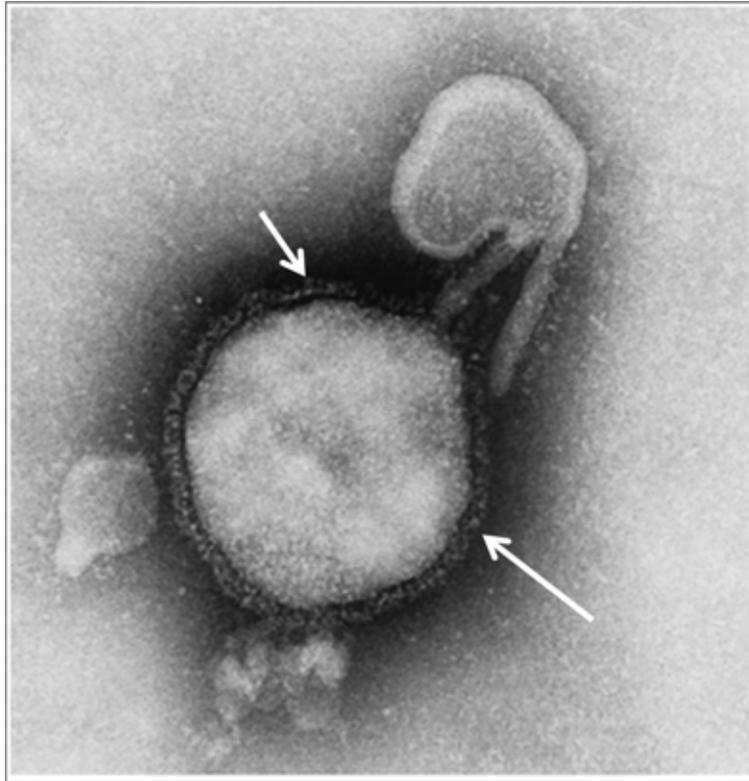


Figura 2. Microscopía electrónica de hPIV. Las glicoproteínas de superficie son fácilmente visualizadas. X 275.000.

II.3.2. Infección y Epidemiología del hPIV

La distribución de las infecciones causadas por los virus de parainfluenza se extiende por todo el mundo, presentándose en forma de infecciones esporádicas o endémicas, y en forma de epidemias.

El contagio se realiza por contacto directo con las secreciones respiratorias de individuos enfermos. Hasta el momento se han identificado los tipos 1, 2, 3, 4a y 4b de los virus parainfluenza humanos como agentes etiológicos. Los hPIV tipo 1, 2 y 3 ocupan el segundo lugar dentro de las causas de infecciones respiratorias severas en lactantes y niños pequeños, solo superados por el Virus Sincitial Respiratorio (VSR) (47, 48). Actualmente son reconocidos como agentes causales



de enfermedades durante toda la vida, provocando consecuencias más marcadas en adultos inmunocomprometidos y ancianos. Los hPIV provocan infecciones respiratorias frecuentes de gravedad variable que dependen del tipo viral y sobre todo de la inmunidad del huésped (lactantes; por privación de la respuesta adquirida por la madre y en ancianos; por disminución de la capacidad). Se ha demostrado que los cuatro serotipos virales son responsables de causar infecciones respiratorias y reinfecciones en niños y adultos (37, 49).

Los niños con infección primaria por hPIV de los tipos 1, 2 y 3 pueden presentar cuadros clínicos graves que varían desde laringotraqueobronquitis y croup, particularmente los tipos 1, hasta bronquitis y neumonía. En lactantes menores de 6 meses, la enfermedad vinculada con este virus no se presenta en forma grave debido probablemente a la inmunidad transmitida por la madre. El hPIV tipo 1 causa epidemias que ocurren en ciclos bianuales en el otoño. Estudios serológicos han sugerido que el 60% de los niños a la edad de dos años han contraído este tipo de virus y que aproximadamente el 80% ya han sido infectados a los 4 años de edad, la mayoría de forma asintomática; este rango tan alto de infección determina que el virus se disemina rápidamente (50).

II.4. Virus de Parainfluenza tipo 1 (hPIV-1)

Durante la última década, ha habido un cambio considerable en la nomenclatura y las relaciones taxonómicas de los virus humanos de parainfluenza (hPIV) (Tabla 1). Estos virus se descubrieron por primera vez a finales de 1950, cuando tres virus diferentes fueron recuperados de niños con enfermedades respiratorias



inferiores, demostrando ser un virus único, fácilmente separado de los myxovirus. Esta nueva familia de virus respiratorios tuvo un escaso crecimiento en huevos embrionarios y comparte algunos sitios antigénicos con el virus de la influenza.

En 1959 se encontró una cuarta familia de virus, la cual también reunió estos criterios, creándose un nuevo grupo taxonómico llamado "virus de parainfluenza".

El hPIV tipo 1 es un patógeno respiratorio común adquirido en la comunidad sin patrones de características étnicas, socioeconómicas, de género, edad o límites geográficos (37, 49).

II.4.1. Características del hPIV-1

El hPIV-1 es el agente patógeno más importante a nivel mundial de la Laringotraqueitis o Laringotraqueobronquitis, y la segunda causa de bronquiolitis y neumonía en niños menores de 5 años.

Es un virus, como todos los de la familia; envuelto, de RNA monocatenario de sentido negativo. Su genoma codifica al menos para ocho proteínas (3'-NP-P-C-M-F-HN-L-5'). Los viriones obtienen la bicapa lipídica de la célula hospedera y de la cual sobresalen proyecciones constituidas por las glicoproteína HN y F (Figura 3) (49).

II.4.2. Estructura del hPIV-1

El virión del hPIV-1 presenta una membrana lipídica (envoltura), donde están situadas las proteínas HN y F, seguida de una proteína de Matriz, y por debajo la



nucleocápside que es una hélice simétrica que envuelve al genoma viral junto con la polimerasa, esquematizado en la Figura 3.

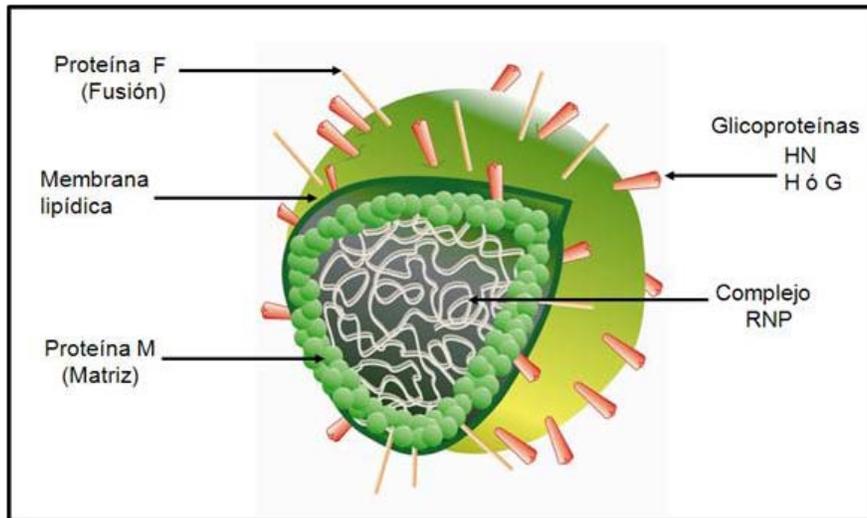


Figura 3. Virión de Parainfluenza tipo 1 (hPIV-1)

II.4.3. Genoma y proteínas

El genoma está constituido por 15,000 nucleótidos aproximadamente y es traducido para 7 proteínas; la nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), proteína C, de matriz (M), proteína de fusión (F), glicoproteína (HN), y proteína larga (L) (37).

Nucleoproteína (NP). Constituida de aproximadamente 489 y 553 aminoácidos (aa), posee dos dominios. Entre los paramyxovirus, la región amino terminal de la proteína se encuentra conservada (alrededor del 80%) mientras que, la región carboxilo terminal es menos conservada (20%). En la replicación viral, la NP tiene varias funciones, como la intervención en la encapsidación de RNA durante la transcripción y la replicación se asocia con la P-L polimerasa; y es probable que interactúe con la proteína M durante el ensamblaje del virus.



Fosfoproteína (P). Es una proteína variable en su longitud dentro de los virus de esta familia, está compuesta por dos dominios el N-terminal y el C-terminal, separados por una región hipervariable. Esta proteína se caracteriza por presentar un alto grado de fosforilación, desempeña un papel importante en la síntesis de RNA y junto con la proteína L, forma la polimerasa viral (P-L) y en conjunto con la NP forma un complejo que activa la encapsidación del RNA, llamado complejo ribonucleoproteico (CRNP) (31, 37).

Proteína C. Es una proteína accesoria no esencial del gen P, en el hPIV -1. El gen P codifica para la proteína C en un mecanismo de repetición del RNA para producir además de la proteína P, la C; por escisión de un pseudotemplate y transcripción anidada (dos, o más marcos de lectura). Se considera que la proteína C modula el desensamble del virión y desempeñan un rol regulador en la síntesis del RNA viral. La proteína C es abundante y su secuencia no es conservada. Al interactuar con las proteínas N-L participa en el ensamble de la partícula viral. El marco de lectura (ORF) se encuentra traslapado para codificar para ambas proteínas en la porción C-terminal del gen P (49). El rol de la proteína C es multifuncional, ya que inhibe la función de los interferones α/β , interfiere con la vía STAT-1 y 2, regula la síntesis del RNA viral, facilita la unión y liberación del virión y regula (inhibe o incrementa) la apoptosis celular; ésta es una característica de los Respirivirus pero no de los Rubulavirus o Avulavirus. Existe otra proteína que no es generada en el hPIV, la proteína V, que es altamente conservada en los miembros de las subfamilias Rubulavirus o Avulavirus que generan esta proteína en lugar de la C y cuya función es la misma (38, 43, 52).



Proteína de Matrix (M). Es la proteína más abundante en el virión, contiene de 341 a 375 aa. Es una proteína básica y poco hidrofóbica; durante la entrada del virus, se fusionan ambas membranas y se separa toda la proteína M permitiendo la liberación de la nucleocápside al citoplasma. Durante la etapa final del ciclo de replicación, la asociación de la nucleocápside con la proteína de la matriz media la integración de la envoltura (membrana lipídica) y el virus es liberado por gemación desde la membrana celular, para formar una capa completa por debajo de la membrana lipídica del virión (31, 49).

Proteína de Fusión (F). Es un factor crítico y característico de la infección y de la patogenia de la familia Paramyxoviridae, induce la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula hospedera y se encarga de la fusión entre células, induciendo la formación de grandes sincitios. Así permite la propagación del virus de célula a célula, lo que favorece a su patogenia, ya que evade la respuesta inmune. Se caracteriza por ser una proteína integral de membrana tipo II, que se sintetiza como un precursor inactivo F0 y que requiere de un mecanismo de “maduración” el cual consiste en el corte del precursor F0 para producir el heterodímero F2-F1, unidos a través de un enlace disulfuro. El evento de “maduración” sucede en el compartimiento trans-Golgi y es catalizado por una enzima serina proteasa semejante a la Furina. Este evento post-traducciona l permite la liberación del péptido de fusión que se encuentra localizado en el extremo N-terminal de la subunidad F1 (49, 51).

Proteína HN. La glicoproteína de la envoltura del hPIV -1 es la proteína de unión del virus a la célula huésped. Constituye una proteína multifuncional y el mayor determinante antigénico. Es responsable de la absorción del virus al unirse al



ácido siálico de la membrana celular α -2-desoxi-2,3-deshidro-ácido-N-acetil-neuramínico. Tiene actividad hemaglutinante y de neuraminidasa. La HN contiene de 565 a 582 aa, es una proteína integral de membrana tipo II. Esta proteína tiene un dominio hidrofóbico localizado en la porción N-terminal, que actúa como señal de anclaje a la membrana. Es un tetrámero y su función es la unión a las células huésped y con la actividad de neuraminidasa, participa en la liberación del virus. Hay diferencias en el número de sitios de glicosilación de la HN entre los diferentes tipos de hPIV y entre cepas dentro de un tipo. Esto puede ser parte de la estrategia utilizada por el hPIV para escapar de la detección inmunológica. La porción terminal del ácido siálico es importante (α 2-3 y α 2-6) para la unión de HN a hPIV; sin embargo, parece que la unión HN al hPIV-1 es más limitada en su unión que en hPIV-3, lo cual puede ser importante para el huésped. La unión de la proteína HN a los receptores en los eritrocitos produce la hemaglutinación conocida también como hemadsorción de paramyxovirus (39, 40, 49).

Proteína Larga (L). Es la proteína de mayor tamaño y longitud, tiene un tamaño aproximado de 2200 aa y es menos abundante respecto a todas las proteínas estructurales. Es una proteína multifuncional, responsable de la polimerización de nucleótidos y de la adición de 7-metilguanosa en el extremo 5' (cap) durante la síntesis de los mRNA virales. En la familia Paramyxoviridae, la porción N-terminal de la proteína L contiene seis segmentos de aminoácidos altamente conservados, que se sugiere que son dominios catalíticos de la polimerasa. El complejo formado por las proteínas L y P es requerido para la actividad de polimerasa con la NP y la cadena molde de RNA (31, 49).



II.4.4. Ciclo de replicación

Como todos los virus de RNA, los hPIV-1 presentan una alta frecuencia de mutación por carecer de actividad de exonucleasa en su polimerasa que actúe en sentido 3' a 5' como mecanismo de reparación, lo que contribuye a la formación de poblaciones heterogéneas. El RNA en hPIV es de polaridad negativa es decir, no actúa como RNA mensajero, y tiene dos funciones; una como template para la síntesis del RNAm y la segunda como template para la síntesis del genoma viral. El RNA del virus codifica y contiene su propia RNA polimerasa (proteína L), aunque su RNA mensajero solo es sintetizado después de que el virus ha sido desempaquetado en la célula infectada. La replicación del virus inicia después de la síntesis de los RNAs mensajeros, y se requiere de una síntesis continua de las proteínas virales (49).

En la Figura 4 se muestra gráficamente el ciclo de replicación de los virus. La partícula viral se adsorbe al receptor en la membrana celular hospedera por medio de la proteína HN ①. Un cambio conformacional de la HN activa la proteína F, la cual lleva a cabo la fusión de las membranas celular y viral ②, provocando que el RNA viral sea liberado en el citoplasma ③. En este punto, por un lado inicia la síntesis de RNA antígenómico (cadena complementaria al genoma), la cual da origen a genomas nuevos ④, y por otro lado, a la producción de RNA mensajero ⑤, que codifica para las proteínas virales (⑥a). Los productos de la traducción se dirigen al sitio de ensamble, las proteínas NP, P y L son acopladas al RNA recién sintetizado y la proteína M se ubica en la parte interna de la membrana



celular que adoptará el virus ⑦. Las glicoproteínas (HN y F), sintetizadas en retículo endoplásmico, son modificadas en el aparato de Golgi (⑥b) y posteriormente expresadas en la membrana citoplasmática en contacto íntimo con la proteína M ⑧. La afinidad de las proteínas del genoma (NP, P y L) con la proteína de matriz y de ésta con las glicoproteínas es determinante para el ensamble del virión, que es liberado de la célula por exocitosis ⑨. Es característico en los paramyxovirus que, además de la formación de viriones, los virus puedan infectar las células vecinas de manera inmediata a través de la fusión membranal célula-célula, debido a la expresión de las proteínas virales en la membrana de la célula hospedera ①⑩, lo cual le permite dispersarse sin necesidad de salir al medio extracelular, fenómeno llamado efecto citopático (52).

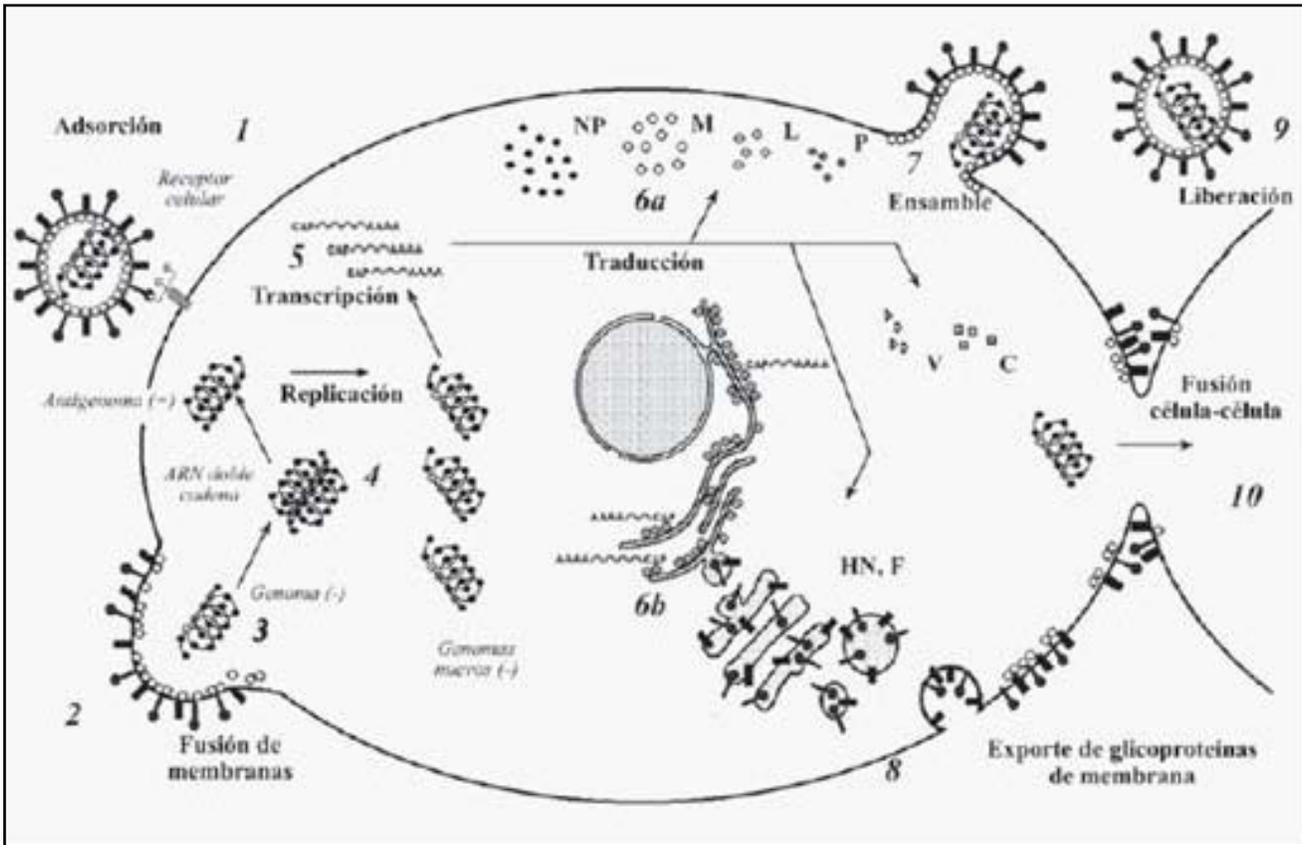


Figura 4. Ciclo replicativo de Parainfluenza tipo 1 (hPIV-1) (52)

II.4.5. Epidemiología e impacto de las infecciones por hPIV-1

Se han encontrado diferentes factores que predisponen a la infección por el hPIV tipo 1 incluidos; la malnutrición, el hacinamiento, la deficiencia de vitaminas en la alimentación, la falta de lactancia materna y el humo ambiental o la presencia de toxinas en el medio. Existen más de 5 millones de casos reportados de Laringotraqueobronquitis cada año en los Estados Unidos en niños menores de 5 años. hPIV-1 se ha encontrado en una tercera parte de estas infecciones (50); que, además, de causar IRAs en lactantes, niños y adultos, en menor medida se



encuentra en individuos inmunocomprometidos o bien en los que tienen enfermedades crónicas (por ejemplo, enfermedad del corazón y pulmones, o bien asma).

Los niños que están infectados por este virus son diagnosticados pero rara vez este patógeno puede ser aislado. Las encuestas serológicas han demostrado que la mayoría de los niños de entre 6 y 10 años de edad tienen evidencia de infección previa, lo que sugiere infecciones primarias leves o asintomáticas ⁽⁵³⁾. Las infecciones respiratorias agudas causan del 3 al 18% de todas las admisiones a los hospitales pediátricos, detectándose hPIV-1 en 9 a 30% de estos pacientes dependiendo en la época del año.

Se reportan entre 500,000 y 800,000 hospitalizaciones por Laringotraqueitis (LRI) en individuos menores de 18 años en los Estados Unidos cada año y aproximadamente el 12% de estas infecciones son producidas por hPIV-1; y después, se encuentra el VSR como causa de hospitalización. La Inmunidad para hPIV es incompleta y las infecciones se producen durante toda la vida sin embargo, la respuesta inmune es menor en infecciones en lactantes y en los casos de afección más grave. Por lo tanto, la mayoría de la discusión clínica se centrará en los niños ⁽⁵⁴⁾.

Las epidemias Bienales son propias del hPIV-1 y ocurren en ambos hemisferios. Los informes en los Estados Unidos han sugerido que cerca del 50% de los casos de croup son causados por este virus ^(55, 56). Durante las epidemias por hPIV-1, se ha estimado que entre 18,000 y 35,000 niños estadounidenses menores de 5 años son hospitalizados. Algunos de estos niños padecen laringotraqueobronquitis, bronquiolitis o neumonía. La mayoría de estas infecciones ocurren en niños de 36



meses a 7 a años con una incidencia máxima en el segundo y tercer año de la vida (56, 57).

II.4.5.1. Laringotraqueobronquitis o CROUP

La laringotraqueobronquitis es también conocida por los sinónimos de croup, croup viral, laringitis subglótica o pseudocroup. Es una causa frecuente de obstrucción aguda de las vías aéreas superiores en la infancia; y se refiere al proceso inflamatorio de origen infeccioso viral que afecta a la laringe y a la tráquea, llegando a involucrar la parte inferior del árbol respiratorio, produciendo diversos grados de obstrucción (58).

Se puede definir también como un síndrome clínico agudo, caracterizado por una triada que comprende: tos ronca o perruna, disfonía o afonía y estridor inspiratorio. También se presentan signos de dificultad respiratoria secundaria a la obstrucción laríngea o traqueal; término usado casi exclusivamente para referirse a la laringotraqueítis de origen viral, que se produce como resultado de la inflamación del tracto respiratorio superior incluyendo laringe, tráquea y bronquios (Laringotraqueobronquitis), y que, frecuentemente, es precedida de un episodio de coriza, rinorrea clara y leve aumento de la temperatura (pródromo catarral). Este cuadro clínico común se denomina con el término anglosajón de “croup”, que quiere decir “llorar fuerte”. Algunos niños con historia de atopia, tienen un cuadro no precedido de síntomas virales al que se le ha llamado croup espasmódico. Ambos son tratados similarmente siempre y cuando los signos y síntomas sean los mismos (59).



Además, otras terminologías usadas para este padecimiento incluyen: laringitis espástica estridulosa, laringitis catarral banal, laringitis estenosante aguda; y cuando se presenta por otras entidades clínicas se le llama croup diftérico, laringotraqueítis bacteriana, epiglotitis, edema de glotis o suglótico y laringoespasma (58).

II.4.5.2. Epidemiología del CROUP

Las dos patologías más frecuentes que provoca el hPIV-1 son la laringotraqueítis aguda (LRI) y el croup espasmódico, ambos presentan características clínicas comunes y la diferencia se establece a veces por el tiempo de resolución. Representan entre el 15 y 20% de las enfermedades respiratorias más comunes en la población pediátrica y precisa la hospitalización del 1 al 5% de los pacientes. La incidencia estimada es del 3 al 6% en niños menores de 5 años de edad. Pero la edad más importante de la presentación del síndrome oscila entre 6 meses y 3 años, con un promedio de 2 años mientras que, la epiglotitis predomina entre los 2 y 5 años. Existe predominio del sexo, afectando al sexo masculino a razón de 2:1 y con mayor afinidad en niños eutróficos, e incluso con peso superior al normal. Se presenta frecuentemente en otoño e invierno. La incidencia anual es de 18 por cada 1000 menores de 5 años. Antes del empleo de corticoides y adrenalina racémica en nebulización, la patología era motivo de hospitalización hasta en el 25% de todos los casos, siendo precisa la intubación y en el 2% de ellos, la cricotomía o traqueostomía (59).



II.5. Respuesta inmune contra virus

Los virus son parásitos intracelulares obligados que requieren de la maquinaria metabólica de una célula para replicarse. Su estructura básica incluye un ácido nucleico, que puede ser DNA o bien RNA, rodeado por una envoltura proteica o cápsula que le permite ingresar a las células. Los virus ingresan al organismo por diversas vías incluyendo la respiratoria, gastrointestinal, transcutánea, parenteral, genitourinaria y rectal.

En términos generales, una infección viral comprende una etapa extracelular y una etapa intracelular por lo tanto, la respuesta inmune puede interferir con ellos en estos dos niveles.

Es bien conocido que ante la presencia de los agentes virales, la respuesta inmune del huésped es esencial para el control y progresión de la infección. El daño celular y tisular que es desencadenado por la infección viral, conocido como efecto citopático, es importante para determinar el tipo de respuesta inmune que predominará. En los casos de virus que no inducen esta reacción la respuesta del organismo es limitada (31, 35).

Es conocido que existen estrategias de protección en las vías aéreas que participan en las infecciones virales y que corresponden a la respuesta inmunológica. La primera pertenece a la respuesta innata, correspondiendo a las barreras naturales, células y mediadores químicos extracelulares e intracelulares y la segunda corresponde a la respuesta adaptativa, altamente específica y con memoria, y corresponde a una amplia gama de células y mediadores químicos.



Las barreras naturales como parte de la inmunidad innata comprenden: 1) Movimiento ciliar, secreción de moco, aumento del recambio aéreo, estornudos, tos, expectoración, etc. que conducen a la disminución de la adherencia viral. 2) Establecimiento de un medio hostil en la mucosa con liberación de sustancias químicas, variación del contenido de álcalis y aumento del moco (60). En la respuesta innata se utilizan una gran variedad de elementos para el control de la infección como: la producción de interferones y citocinas proinflamatorias, moléculas microbidas (defensinas, catelicidinas, lisozima, etc) y la participación de células epiteliales, macrófagos, neutrófilos y células NK. Estos mecanismos innatos o primarios son reforzados por elementos producidos en la respuesta adaptativa, dependiendo del tejido y de la forma de agresión del agente infectante, pudiendo ser representadas por células con especificidad intermedia entre la innata (fagocítica) y la adaptativa (células presentadoras de antígeno) (60- 62).

La respuesta inmune innata celular comprende células fagocíticas y células que al parecer solo tienen capacidad lítica y capacidad para liberar sustancias quimiotácticas, como mastocitos y otras células poco estudiadas como basófilos. Los neutrófilos son células del sistema inmune innato también denominados polimorfonucleares (PMN), son leucocitos de tipo granulocito, cuya función principal es la migración hacia los tejidos infectados (inflamación) y la fagocitosis de virus, bacterias y hongos.

Los neutrófilos normalmente se encuentran en el torrente sanguíneo. Durante, el inicio de la inflamación, particularmente como resultado de la infección, son unos de los primeros migrantes hacia el sitio de inflamación (primero a través de las arterias, después a través del tejido intersticial, dirigidos por señales químicas



como interleucina-8 (IL-8) e interferón-gamma (IFN- γ), en un proceso llamado quimiotaxis (63). Son las células predominantes en las secreciones purulentas. La liberación de los neutrófilos desde los vasos sanguíneos está condicionada por la liberación de histamina (liberada por mastocitos) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (liberado por macrófagos). El TNF- α y la histamina actúan sobre las células del endotelio del vaso, haciendo que se active mediante la expresión de selectina-E. Los neutrófilos activados mediante IL-8 pueden unirse a la selectina-E mediante su ligando glucosídico. De esa manera, son capaces de estar presentes en los tejidos apenas 5 horas después de iniciar la infección .

En algunos casos y particularmente con algunos virus se activan mecanismos efectores de la respuesta pro-inflamatoria, antes de que estos se repliquen. El contacto con las células epiteliales es suficiente para que se secreten sustancias microbicidas, citocinas y hasta inmunoglobulinas del tipo IgA.

La liberación de citocinas se destaca principalmente por ser el medio de comunicación intercelular ante una invasión microbiana. Las citocinas sirven para iniciar la respuesta inflamatoria, y para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmunitaria específica. Se conocen en la actualidad mas de 33 interleucinas, las cuales son diferentes desde el punto de vista bioquímico y biológico. Algunas de ellas presentan esencialmente efectos favorables, otras paralelamente a su función defensiva también pueden ser deletéreas para el organismo (60, 64).

En cuanto a la respuesta proinflamatoria, ésta se ve regulada por citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α , las cuales son regularmente predictores de daño tisular, inflamación e infección. Son moléculas orientadas a regular los distintos



componentes celulares de la respuesta inmune, suelen tener muy bajo peso molecular (entre 15 y 30 KDa) y están compuestas por 120 a 180 aminoácidos, los cuales determinarán sus funciones tan variadas.

Estas moléculas son secretadas por los linfocitos y células epiteliales, aunque también por otros tipos celulares, de ahí que se le asigne el término citocina.

Un tipo de citocina son las interleucinas, las cuales son moléculas que sirven como señales de comunicación entre los diversos tipos de leucocitos, algunas de ellas no son nombradas por número sino según su función biológica, como es el caso del factor transformante del crecimiento (TGF). Otras más, no menos importantes son los factores transformadores de la diferenciación celular, factores estimuladores de colonias y los interferones, los cuales tendrán su manera particular de acción en lo que se refiere a la respuesta inmune (61).

Es importante mencionar que, las citocinas ejercen un efecto autocrino cuando se unen a receptores presentes en la célula que las produce; también pueden tener un efecto paracrino, actuando sobre diferentes tipos celulares que se encuentran a su alrededor y, en algunos casos, pueden liberarse a la circulación sanguínea o linfática, ejerciendo su efecto en otros órganos y tejidos, actuando así en forma endócrina como las hormonas.

También pueden atraer a células como macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos y células NK (60).

Posterior a su ingreso los virus tienen una etapa de replicación primaria para después diseminarse e introducirse en el tejido blanco final, siendo el ejemplo más claro el virus del sarampión, que ingresa a las vías respiratorias (viremia inicial) y posteriormente se disemina a tejido linfoide y reticuloendotelial (31). Las



infecciones virales pueden ser líticas, latentes o persistentes. La respuesta inmune adquiere características y efectividad diferente de acuerdo a la vía de ingreso del virus y al tipo de infección que provoca.

La respuesta inmune frente a estos microorganismos comprende mecanismos inespecíficos y específicos con características y efectividad particulares que dependen de la naturaleza de cada virus. Entre los mecanismos inespecíficos, los de mayor relevancia incluyen: la producción de interferón tipo I, presencia de células NK y activación del complemento (64).

La respuesta inmune adaptativa antiviral incluye mecanismos efectores humorales y celulares, siendo estos últimos los más eficaces.

El organismo cuenta con una serie de elementos para impedir o dificultar el ingreso del virus al organismo. Por ejemplo, en las vías respiratorias, los virus deben sobrepasar el efecto neutralizante de la IgA secretada, acción lítica de células NK y la función fagocítica de neutrófilos y macrófagos. Además, en el aparato respiratorio existen una serie de elementos que limitan la persistencia e ingreso de las partículas virales; los cuales tienen importancia en la producción de moco compuesto de mucina que dificulta la movilidad viral, la expectoración y el estornudo, entre otros. Si los virus logran sobrepasar estas barreras, se ven enfrentados a diversas modalidades de la respuesta inmunológica cuya eficiencia dependerá de la etapa del ciclo infectivo viral en que actúen (65).

En la etapa inicial de la infección tiene importancia la actividad lítica de las células NK, que lisan células infectadas por virus ya sea directamente o a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y de la activación del complemento por vía alterna.



Cabe señalar que los virus al ser en general muy inmunogénicos estimulan las respuestas T y B. Los linfocitos T CD4⁺ reconocen péptidos virales asociados a moléculas MHC clase II en células presentadoras de antígeno ejerciendo su función cooperadora con linfocitos B y T CD8⁺. La respuesta celular en su modalidad citotóxica es la más efectiva ya que los linfocitos T CD8⁺ activados, al reconocer péptidos antigénicos de origen viral asociados a moléculas MHC clase I de células infectadas por virus, son capaces de lizarlas (60, 65).

Los anticuerpos cumplen un papel relativamente pobre en las infecciones virales agudas, sin embargo son importantes en la prevención de reinfecciones. Los anticuerpos al unirse a epítomos presentes en proteínas ubicadas en la superficie de la partícula viral (anticuerpos neutralizantes), pueden reducir su infectividad. Esto lo consiguen inhibiendo diversas etapas del ciclo reproductivo viral tales como la unión a la membrana celular y penetración a la célula. Además pueden producir agregados de viriones, acelerar su degradación en vesículas y facilitar la fagocitosis al opsonizarlos (66).

La activación del complemento es otro mecanismo protector contra los virus. Este sistema puede ser activado por vía clásica y alterna, conduciendo a la opsonización por C3b y a la lisis de virus con cápsula o de células infectadas por virus. Su eficacia en el hombre es relativa, ya que pacientes deficientes en factores del complemento no presentan una mayor incidencia ni gravedad en infecciones de este tipo.

Finalmente, durante la infección viral se induce la síntesis de interferones en las células del huésped. Los interferones son liberados a la región extracelular y actúan sobre células vecinas uniéndose a un receptor e induciendo la síntesis de



una proteína cinasa que fosforila un factor de iniciación de la síntesis proteica, mediante este mecanismo se interfiere con la síntesis de proteínas virales. Además los interferones activan a endonucleasas que degradan el mRNA viral y estimulan a otras células que participan en la respuesta inmune tales como células NK y linfocitos T citotóxicos. De esta manera se establece un estado anti-viral que detiene el ciclo celular y origina apoptosis celular (63).

II.6. Mecanismos efectores de la respuesta contra virus hPIV

Se produce una primera respuesta inflamatoria en la que predominan monocitos/macrófagos, granulocitos, células NK e IFN. Estas células adquieren capacidad citolítica 3 o 4 días después de la infección por el hPIV. Los macrófagos y neutrófilos actúan en tres niveles para destruir a los virus y a las células infectadas: se fagocitan los virus y se destruyen las células infectadas por virus y se forman moléculas antivíricas tales como TNF- α , 2'5' OAS, óxido nítrico e IFN- α . Además, el IFN- α permite la inducción directa de proteínas importantes para la regulación de la proliferación celular o bien para la inducción de apoptosis y permite la activación del inflamosoma que activa a la caspasa (64). Durante estadios tempranos de la infección, las células NK experimentan una proliferación inespecífica mediada por IFN tipo I e IL-15. En la respuesta antivírica, estas células actúan mediando directamente la histólisis de células infectadas mediante el mecanismo perforina-granzima produciendo IFN- γ e IL2. El IFN- γ protege a las células de la infección y activa los mecanismos antivíricos de los macrófagos. Las células NK participan en la ADCC. El mecanismo por el que las células NK matan



es el mismo que el utilizado por los linfocitos T citotóxicos generados en la respuesta inmune adaptativa; los gránulos citotóxicos son liberados en la superficie de la célula diana y las proteínas efectoras que contienen penetran en la membrana celular induciendo la muerte programada. Sin embargo, la muerte producida por las células NK es desencadenada por receptores invariables (63).

Las células NK se activan en presencia de $\text{INF-}\alpha$ y β e IL-12, IL-15 e IL-18 producida por células dendríticas. Las células NK activadas sirven para contener las infecciones virales mientras la respuesta inmune adaptativa genera células T citotóxicas y antígenos específicos que puedan eliminar la infección. IL-12 en acción sinérgica con el $\text{TNF-}\alpha$, puede también inducir la producción de grandes cantidades de $\text{IFN-}\gamma$ por las células NK, y a su vez, el $\text{IFN-}\gamma$ secretado es crucial para controlar algunas infecciones antes de que las células T sean activadas para producir esta citoquina (63, 65).

Las células NK reconocen sus células diana sin restricción por MCH mediante varios tipos de receptores: Receptor Fc de la IgG (Fc-gamma-R11a o CD16), que se unen a células cubiertas de IgG, originando ADCC. El Receptor activador (KAR), desencadena la capacidad asesina de las células NK, a través de varios tipos de receptores (lectinas) como el receptor inhibidor (KIR) que inhibe la reacción lítica. Estos receptores son específicos para moléculas del MCH clase I, previenen la destrucción de células normales, matan selectivamente células con niveles bajos o nulos de moléculas MCH de clase I. Cuando los receptores activadores se unen a su diana, se genera una señal destructora; sin embargo, esta señal es anulada si se produce de forma simultánea otra señal inhibidora



mediante el reconocimiento de las moléculas de clase I en la superficie de la célula. Los interferones activan a los macrófagos y a las células NK.

La resistencia transitoria de las células inhibe la replicación viral y permite la activación de genes que expresan proteínas antivirales y favorece el incremento de expresión de MHC clase I y MHC clase II (66).

Cabe señalar que esta respuesta es reconocida para los virus de la familia *Paramyxoviridae* sin embargo, no existe mucha información de la respuesta contra el virus de parainfluenza tipo 1.

II.7. Citocinas proinflamatorias (Quimiocinas)

Originariamente el término linfocina se estableció para denominar productos biológicos producidos por linfocitos en respuesta al antígeno. Posteriormente su uso se amplió a moléculas de características similares secretadas por otros tipos celulares, por lo que se utilizó el término citocina.

El término interleucina (IL) se aplicó a aquellas moléculas que servían como señales de comunicación entre distintos tipos de leucocitos, numerándose a medida que se descubrían (IL-1, IL-2, etc.). No obstante, algunas de ellas se detectaron inicialmente en ensayos funcionales *in vitro* y aún conservan su denominación original de acuerdo con la función biológica que permitió su identificación, como es el caso del TNF (Factor de Necrosis Tumoral) y del TGF (Factor Transformante del crecimiento).

Algunas se conocen como “citocinas quimiotácticas o quimiocinas” ya que poseen propiedades quimioatrayentes, regulando el traslado de leucocitos hacia tejidos u órganos.



Las quimiocinas constituyen un grupo numeroso de citocinas proinflamatorias y, hasta el momento, se han caracterizado alrededor de 40 diferentes que provienen de variadas fuentes celulares y tienen acciones pleiotrópicas (67)

Las quimiocinas son moléculas de bajo peso molecular, entre 15-30 KDa, constituidas por 120-180 aminoácidos. Son producidas por leucocitos, sin embargo, determinadas citocinas también pueden ser secretadas por otros tipos celulares. Todas son dímeros aunque la mayoría actúan fisiológicamente como monómeros; estructuralmente son similares; tridimensionalmente presentan tres láminas β plegadas conectadas por asas (denominadas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$), un asa en la región NH2 terminal y una hélice α en el dominio C-terminal (Figura 5). Su extremo carboxilo es de carácter básico y tiene afinidad para unirse a compuestos de tipo heparina, glicosaminoglicanos y moléculas de azúcar cargadas negativamente que se encuentran en la superficie celular y la matriz extracelular (66-68).

Las quimiocinas son polipéptidos con un dominio tipo quimiocinas, la mayoría presenta cuatro cisteínas en posiciones altamente conservadas, unidas entre sí por puentes disulfuro, excepto las γ quimiocinas que presenta dos cisteínas conservadas y un solo puente disulfuro (69).

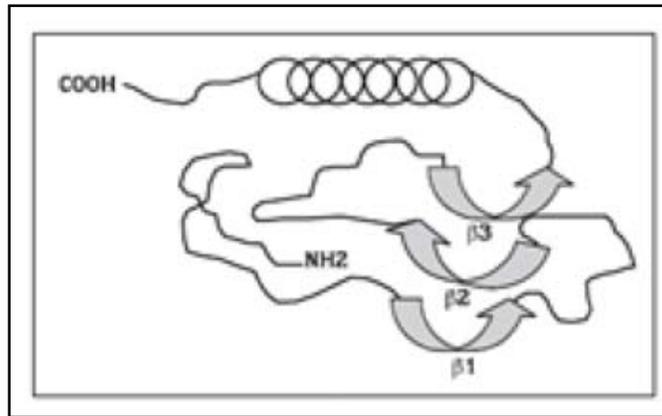


Figura 5. Estructura tridimensional de quimiocinas proinflamatorias

Las quimiocinas secretadas se unen a proteoglicanos y a proteínas de la matriz extracelular donde se cree permanecen inmobilizadas sin pasar a la circulación. Esta capacidad de unión a la matriz extracelular favorece la permanencia de las quimiocinas en su lugar de producción y apoya el concepto de que la migración de los leucocitos se realiza a través de un gradiente sólido.

La característica bioquímica común de estas moléculas es la conservación de 4 residuos de cisteína que se unen formando dos puentes disulfuro, esenciales para la actividad de la molécula. Dependiendo de si las dos primeras cisteínas están o no separadas por otro aminoácido se han clasificado en quimiocinas CXC (cis-X-cis, debido a que las dos cisteínas cercanas al N-terminal están separadas por un aminoácido simple), CC (cis-cis las dos cisteínas están adyacentes), las C y las CX3C (69).

Dentro de la familia CC se encuentran la CCL11 (eotaxina), importante en los procesos alérgicos por ser quimiotáctica para eosinófilos, el RANTES que es



quimiotáctico para linfocitos T de memoria, y la CCL13 (proteína quimioatrayente de monocitos o MCP-1).

Existen otras 2 quimiocinas, la XCL1 (linfotactina), y la CX3CL1 (fractalquina o neurotactina (subfamilia CX3C) que pertenecen a otras subfamilias también participan en estos procesos (68).

Para la familia CXC, la molécula más representativa es la IL-8 (CXCL8) que es sintetizada por todos los tipos de leucocitos, así como por otros tipos celulares (fibroblastos, células endoteliales, hepatocitos, astrocitos) y células tumorales (melanoma, carcinoma de ovario, pulmonar) en respuesta a una amplia variedad de estímulos (70).

II.8. Interleucina 8

La interleucina 8 (IL-8) recientemente fue renombrada como CXCL8, en una reunión del Subcomité de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología por ser una quimiocina, aunque su símbolo en genes HUGO continua siendo IL-8, es una citocina proinflamatoria. Su síntesis se lleva acabo en una variedad de tipos celulares como son monocitos, fibroblastos, linfocitos T, macrófagos, células epiteliales, células del músculo liso de la vía aérea, células endoteliales y neutrófilos (68, 71, 72).

La primera actividad biológica que se reportó para esta citocina fue la activación de neutrófilos en los que inducía degranulación, cambios morfológicos y quimiotaxis. (70).

Debido a que IL-8 es una de las principales citocinas producidas por los neutrófilos, se sugiere que ejerce un efecto autocrino que los lleva a perpetuar su



activación (73). Además se considera que tiene actividad angiogénica (74) y tiene la propiedad de ser un potente factor quimiotáctico de neutrófilos, eosinófilos y basófilos, regula la producción de proteínas de adhesión y la formación de lípidos bioactivos y finalmente, amplifica la respuesta inflamatoria local.

En los seres humanos, un gen en el cromosoma 4q13-q21 codifica la interleucina-8 (72, 73).

Es conocido que, en la superficie de la membrana, existen receptores a los cuales IL-8 es capaz de unirse; estos receptores tienen 7 dominios transmembranales de tipo serpina o rodopsina, la mayoría de ellos acoplados a la proteína G, con tres asas intracelulares y tres extracelulares y que presentan un extremo N-terminal extracelular y un C-terminal intracelular (69, 75).

La porción intracelular carboxilo-terminal contiene residuos serina y treonina, los cuales son fosforilados y participan en la transducción de señales y tienen dos cisteínas conservadas, una en el dominio N-terminal y otra en la tercera asa extracelular, que se asume se encargan de formar un puente disulfuro que es importante en la formación de el surco de unión con el ligando. La interacción entre la quimiocina y el receptor ocurre en el extremo amino terminal y una de las asas extracelulares. Estos receptores tienen una secuencia de aminoácidos única, DRYLAIV, en la segunda asa del dominio intracelular, que los hace diferentes de los demás receptores para otros quimioatrayentes (69).

Los dos receptores de IL-8, CXCR1 y CXCR2 se expresan sobre los neutrófilos; muestran un 77% de homología entre sus aminoácidos, sus genes se localizan en el cromosoma 2q-35. Otros tipos celulares en los que se expresan son monocitos, basófilos y eosinófilos, pero las respuestas son mucho menos significativas que



las de los neutrófilos (76). El receptor CXCR1 solo tiene unión con IL-8 con alta afinidad; el CXCR2 tiene buena afinidad no sólo por la IL-8 sino también por GRO-a, NAP-2 y ENA-78 (77, 78). Los neutrófilos pueden migrar ante bajas concentraciones de IL-8 debido al receptor CXCR2 y responden a altas concentraciones de IL-8 a través del CXCR1 (79).

La estructura cristalográfica de interleucina 8 se determinó mediante sustitución molecular utilizando como modelo de la estructura, la solución obtenida de experimentos de resonancia magnética nuclear. La estructura se perfeccionó a 2 Å (Ångström), datos de rayos X a un factor R de 0.187 (0.217 a 1.6 Å). La comparación indica posibles diferencias entre la estructura en solución y en estado cristalino (70).

II.8.1. Receptores de IL-8

Existen diferentes receptores para las citocinas, la clonación de muchos de estos y el análisis de su estructura ha permitido clasificarlos en 4 familias según regiones comunes con homología dentro de los miembros de una misma familia. Unos de alta afinidad que con pequeñas cantidades de la citocina pueden ser activados, o bien complejos multicatenarios compuestos de una cadena que es la unión específica de la citocina (cadena específica) y de una cadena que transduce las señales al interior de la célula y que es compartida por otros receptores de citocinas (cadena común). Dentro de cada familia, la homología entre sus diferentes miembros es aproximadamente del 15 al 25% (72).

Según su estructura, las 4 familias de receptores se pueden agrupar en: superfamilia de las inmunoglobulinas, familia del receptor del factor de necrosis



tumoral (TNFR), familia del receptor del factor de crecimiento hematopoyético (HGFR) que incluye a la mayoría de los receptores de citocinas por lo que también se denomina superfamilia de los receptores de citocinas y por último, la familia de los receptores de quimiocinas.

Los receptores a los que se unen las quimiocinas presentan características muy diferentes a los receptores de otras familias de citocinas. Actualmente se han clonado muchos de ellos y se ha comprobado que presentan una estructura similar a los receptores de la familia de la rodopsina ya que consisten en una región extracelular corta, contienen 7 dominios transmembranales muy conservados y están asociados a proteínas de unión con nucleótidos de guanina (proteína G) que intervienen en la transducción de señales (75).

Dentro de esta familia de receptores se pueden distinguir los receptores específicos y los compartidos según su especificidad de unión con el ligando. Los específicos que unen un ligando a IL-8 es el IL-8RA o CXCR1 (únicamente une a IL-8). Por el contrario, los receptores compartidos pueden unir a más de una quimiocina del tipo CXC o a más del tipo CC. Un ejemplo de estos es IL-8RB o CXCR2 que une a IL-8 y a otras quimiocinas CXC y CCR1 cuyos ligandos son quimiocinas del tipo CC.

Los neutrófilos así como otros leucocitos están provistos con estos dos tipos de receptores para IL-8 (CXCR1 y CXCR2), ambos acoplados a la proteína G. Mientras CXCR1 es altamente específico para IL-8, CXCR2 se sabe que interactúa con un número de otras citoquinas que llevan a la activación a bajas concentraciones, con los grupos de receptor ELR (75, 79).



Por otro lado, se ha descrito que IL-8 induce la fosforilación de la proteína cinasa B, permite la afluencia de calcio y contribuye en la formación de F-actina así como en el reordenamiento del citoesqueleto. Estos eventos son muy importantes para la iniciación del movimiento quimiotáctico de neutrófilos.

Otro receptor importante es el receptor del antígeno Duffy para quimiocinas (DARC) que también es capaz de unirse a IL-8 y otras quimiocinas con alta afinidad. Este receptor está implicado en el transporte transepitelial de IL-8. Uno de los factores importantes que permiten modular la unión de IL-8 a sus receptores es el procesamiento proteolítico. Alfa-1 antitripsina e IL-8 forman un complejo incapaz de interactuar con CXCR1. La oligomerización de quimiocinas también afecta su interacción con los receptores (80).

Por otro lado, las formas monomérica y dimérica de IL-8 son capaces de inducir el reclutamiento de células, aunque también se ha descrito que la forma dimérica induce una migración inicial más fuerte en los neutrófilos. Cabe señalar que la unión de moléculas como los glicosaminoglicanos sulfatados promueven la oligomerización de IL-8 (81).

II.8.2. Función de Interleucina 8

La IL-8 es conocida como factor quimiotáctico de neutrófilos, tiene dos funciones primarias: 1) Induce la migración (quimiotaxis) de las células diana, principalmente neutrófilos, pero también de otros granulocitos y 2) Activa la fagocitosis en el sitio de la infección. En las células diana, induce una serie de respuestas fisiológicas necesarias para la migración y la fagocitosis, tales como: aumento de Ca_2^+



intracelular, exocitosis (por ejemplo, liberación de histamina), y la explosión respiratoria⁽⁸²⁾.

Otra función de IL-8 es ser un potente promotor de la angiogénesis. IL-8 puede ser secretada por las células con receptores de tipo Toll (TLR) que están involucrados en la respuesta inmune innata. Por lo general, son los macrófagos los que ven al antígeno y por lo tanto son las primeras células que liberan IL-8 para reclutar a otras células. Tanto en la forma de monómero como en la de homodímero IL-8 se ha reportado que es un inductor potente de CXCR1 y CXCR2. Sin embargo, el homodímero es más potente aunque la metilación de Leu25 puede bloquear la actividad de los dímeros.

Se ha establecido que IL-8 juega un papel en la patogénesis de la bronquiolitis, una enfermedad del tracto respiratorio común causada por la infección viral ^(82, 83).

II.8.3. Isoformas de IL-8

La estructura tridimensional de IL-8 está compuesta de 72 aminoácidos. El monómero se compone de un extremo N-terminal conformacional que pasa a través de una región de bucle y una hoja β -plegada antiparalela de tres cadenas, dispuestas en una greca, y una porción C-terminal de α -hélice (residuos 57-72). Dos puentes disulfuro son necesarios para el anclaje de la porción N-terminal en el núcleo de la proteína y para el mantenimiento de la estructura terciaria (Figura 6) ⁽⁸⁴⁾. La porción N-terminal contiene el sitio de corte para las enzimas proteolíticas. Después de la secreción como una proteína monomérica IL-8 se procesa en el extremo N-terminal por proteinasas extracelulares para producir varias formas



activas. Las formas más prominentes constarán de 77 o 72 residuos de aminoácidos. La proteinasa 3, trombina, plasmina, CD13, catepsina L y varias metaloproteinasas de la matriz están involucradas en el procesamiento de la IL-8. La elongación y desaminación son otros procesos de modificación natural que le ocurren a IL-8 (85).

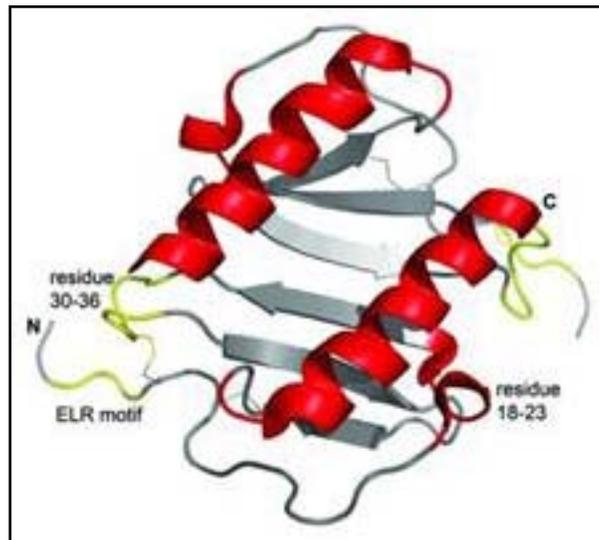


Figura 6. Estructura tridimensional de IL-8. Obtenida de Worldwide Protein Data Bank.

II.8.4. Células blanco de IL-8

Mientras que los granulocitos neutrófilos son las células diana primarias de IL-8, hay una amplia gama de células que responden a esta quimiocina como son; células endoteliales, macrófagos, mastocitos, musculares lisas y queratinocitos. La actividad quimiotáctica de IL-8 en concentraciones similares en los vertebrados fue comparada con *Tetrahymena piriformis*, y los resultados en cuanto a su expresión



fueron similares, lo que confirma que es una estructura y función filogenéticamente bien conservada (86).

II.8.5. Transducción de señales

La señalización inducida por los receptores de quimiocinas está mediada por proteínas G asociadas a su extremo carboxilo-terminal. Estas proteínas se encuentran localizadas en la cara interna de la membrana citoplasmática y catalizan el intercambio de guanósín difosfato (GDP) por guanósín trifosfato (GTP) produciéndose la activación de muchas enzimas citoplasmáticas y al final, la activación de factores de transcripción. En esta familia de receptores asociados a proteínas G, no es necesaria la oligomerización del receptor para la transducción de señales al interior de la célula ya que los receptores funcionales constan de una cadena (80).

Otra vía de señalización utilizada también por los receptores de citocinas es la Ras-GTP que además, forma parte del crecimiento celular normal en respuesta a muchos factores de crecimiento y de la proliferación maligna inducida por oncogenes. La estimulación de esta vía, produce la activación de la cascada de cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK).

Las MAPK activadas se translocan al núcleo donde fosforilan varios factores de transcripción como c-Myc y c-Jun. La transducción de señales por la vía Ras-GTP parece ser común a muchas citocinas ya que su activación ha sido observada en la señalización por componentes de todas las familias de receptores de citocinas (87).



II.9. Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (MAPK's)

La vía de las MAPK's (Mitogen-Activated Protein Kinase) o proteínas cinasas activadas por mitógenos se han conservado en la escala filogenética ya que se encuentran localizadas en organismos eucariontes. Estudios genéticos y bioquímicos en varios mamíferos como el hombre, el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, el díptero *Drosophila melanogaster* y las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* revelan un alto grado de conservación evolutiva de genes codificantes para proteínas cinasas que funcionan de forma secuencial tras la activación de Ras. Este hecho revela la importancia de la vía MAPK como ruta de señalización en las células animales y en levaduras. Además, existe una ruta equivalente en plantas en respuesta a señales externas como la fitohormona volátil etileno (87, 88).

II.9.1. Características generales

La cascada de las MAPK's consiste en una cadena lineal de tres cinasas que se clasifican en distintas subfamilias. La primera corresponde a la subfamilia de Raf o MAPK Cinasa Cinasa (MAPKKK), subfamilia de MAPK o ERK (cinasa reguladora de la señal extracelular). La segunda es denominada como MEK 1/2 o MAPK Cinasa (MAPKK) que activa a JNK o SAPK y la tercera corresponde a la p38.

En la vía, estas señales confluyen arriba del nivel de Raf y la información se transfiere hacia MAPK's, generándose al mismo tiempo la amplificación de la señal como resultado de la activación de MEK y MAPK's; las cuales experimentan la fosforilación de los residuos de Treonina y Tirosina dentro de una secuencia



designada como T-X-Y. Las vías de las MAPKs se integran, transmiten y amplifican en señales a partir de un rango amplio de estímulos y reproducen una apropiada respuesta fisiológica (89).

La activación de las MAPKs se realiza mediante una cascada de cinasas: las MAPK cinasa cinasas (MAPKKK, MKKK, MAP3K o MEKK) fosforilan residuos de serina o Treonina de las MAPK cinasas (MAPKK, MKK o MEKK), que catalizan la fosforilación en Treonina o Tirosina de las MAPKs.

La familia ERK contiene la secuencia Treonina-Glutamina-Tirosina, y sus miembros pueden clasificarse en dos grupos: MAP cinasas clásicas (ERK1/p44 y ERK2/p42), y MAP cinasas grandes (ERK3, ERK5, ERK7 y ERK8).

ERK 1/2 son las proteínas más estudiadas de esta familia, y forman parte del módulo que incluye a las MAPKKK Raf-1, B-Raf o A-Raf, que pueden ser activadas por Ras. Las rutas ERK 1/2 se activan en respuesta a varios estímulos diferentes, incluyendo los factores de crecimiento, citocinas, infección por virus, ligandos de receptores acoplados a proteínas G, agentes transformantes y carcinógenos. Estas proteínas participan en la regulación de los ciclos celulares como la meiosis y mitosis así como, en células diferenciadas presentan diferentes funciones como participar en procesos como el aprendizaje y la memoria en el sistema nervioso central. Los sustratos de las ERK conocidos ascienden a más de 50 proteínas, entre las que se encuentran proteínas del citoesqueleto, cinasas, fosfatasas, enzimas y factores de transcripción (90).

Las MAPKK activadoras de JNK son MKK4 (SEK-1) activada preferentemente por estrés ambiental, y MKK7 activada por citocinas. Entre los sustratos de JNK se encuentran las proteínas JunB, JunD y ATF-2, que forman parte del factor de



transcripción AP-1, el factor de transcripción FOXO4 y receptores hormonales nucleares, además de la proteína adaptadora 14-3-3, la proteína tau asociada a microtúbulos y proteínas mitocondriales de la familia Bcl (91).

Esta variedad de sustratos sugiere que JNK puede intervenir en diferentes respuestas celulares; de hecho, además de su participación en la transducción de señales durante la respuesta inmune, se ha demostrado su implicación en procesos fisiológicos y patológicos tan variados como la remodelación ósea, diabetes, enfermedades cardiovasculares y alteraciones neuronales, entre otras (94). Hay dos MAPKK principales en la activación de p38: MKK3 y MKK6 que parecen regular de forma diferencial las isoformas de p38. Además, en tipos celulares concretos, MKK4 (activadora de JNK) también puede participar en la activación de p38.

Entre los estímulos extracelulares que activan a p38 se encuentran UV, calor, choque osmótico, citocinas inflamatorias y factores de crecimiento. Una vez activada, p38 fosforila numerosos sustratos, entre los que se encuentran varios factores de transcripción como ATF-1/2 y ATF-AT (91, 92).

Las MAPKs llevan señales extracelulares de los receptores activados a diferentes compartimentos celulares, en particular el núcleo, donde dirigen la activación de los programas genéticos apropiados, incluyendo la activación de factores de transcripción, activación de la transcripción de genes de forma directa, síntesis de proteínas, activación del ciclo celular, apoptosis, diferenciación y propagación celular. También se ha descrito que son activados en receptores citoplasmáticos (89).



Una característica única de las MAPKs es que ellas mismas se pueden activar mediante la adición de grupos fosfato a sus regiones de activación, como en los aminoácidos tirosina y/o treonina (fosforilación dual) después de la estimulación de un receptor. Las vías de MAPKs en mamíferos pueden ser activadas por una amplia variedad de estímulos diferentes que actúan a través de diversas familias de receptores, incluyendo hormonas y factores de crecimiento que actúan a través de receptores tirosina cinasas [por ejemplo, los de la insulina, EGF (Factor de crecimiento epidérmico), PDGF (Factor de crecimiento derivado de Plaquetas) y FGF (Factor de crecimiento de Fibroblastos)] o receptores de citocinas (por ejemplo, hormona del crecimiento); para los péptidos vasoactivos que actúan acoplados a la proteína G por ejemplo: Ang II (Angiotensina II) y endotelina, TGF-beta (Factor transformante del crecimiento beta) y en polipéptidos relacionados actúan a través de receptores Ser-Thr cinasa, citocinas inflamatorias como la familia de receptores del TNF (Factor de necrosis tumoral) y receptores de estrés ambiental tales como el choque osmótico, receptores de radiación ionizante y la lesión isquémica (93).

Las MAPKs operan en adaptadores compuestos por tres proteínas cinasas que se fosforilan y activan entre sí de forma secuencial: MAPKKK (MAP cinasa cinasa cinasa) que activa a MAPKK (MAP cinasa cinasa), que entonces activa la MAP cinasa.

Actualmente se han identificado al menos, 14 MAPKKKs, 7 MAPKKs y 12 MAPKs en células de mamíferos. Estos módulos de cinasa han sido duplicados con ligeras variaciones permitiendo que en las células se presenten múltiples respuestas biológicas a través de un conjunto de redes conectadas con las MAP (88, 89).



II.9.2. Vía de señalización JNK/SAPK

Es una cascada de cinasas compuesta de diferentes niveles de MAPKs. Las SAPK son codificadas por al menos tres genes: SAPK-Alpha/JNK2, SAPK-Beta/JNK3 y SAPK-Gamma/JNK1. Al igual que con todas las MAPKs, cada isoforma de SAPK contiene una característica de bucle fosfoaceptora Thr-X-Tyr en el subdominio VIII del dominio catalítico de la proteína cinasa. Directamente río arriba de JNK, en el nivel de la MAPK cinasa (MAP2K), hay dos cinasas de especificidad dual que fosforilan y activan la JNK en residuos de serina y treonina. Estas cinasas son MKK4 (MAPK cinasa-4) y MKK7. Estas proteínas se activan a su vez, por la MAP3K río arriba: MEKKS (MAPK/ERK cinasa cinasas), MLK2/3 (cinasa de linaje mixto-2/3), TAK1 (TGF- β cinasa-1 activado), TPL2 (Locus-2 del Tumor de Progresión), ZPK (proteína cinasa de zipper), y ASK1 (cinasa-1 señal de regulación de apoptosis). Aunque se han identificado otras MAP3Ks todavía se desconocen sus funciones. Éstas incluyen a la MAP3K6, la MLK1 y la LZK (cinasa de zipper que producen leucina) (89).

Recientemente, fueron identificadas y caracterizadas un grupo de MAP4Ks homólogas a la quinasa Ste20 (un miembro de la cascada de MAPK río arriba involucrada en la ruta de respuesta de feromonas en *Saccharomyces cerevisiae*). Estas proteínas MAP4K proporcionan otro nivel de regulación de la cascada de señalización MAPK/JNK y tal vez un enlace a proteínas reguladoras que interactúan o se encuentran en la membrana plasmática. El grupo MAP4K incluye: HPK1 (cinasa-1 de progenitoras hematopoyéticas), GCK (cinasa de Centro



Germinal cinasa), GLK (cinasa-GCK), HGK (cinasa-HPK/GCK), cinasa homóloga a Ste20/Sps1, GCKR (cinasas GCK-relacionadas) (92).

HPK1 es una cinasa de 97 kDa serina/treonina que pertenece a la subfamilia de proteínas cinasas HPK1/GCK. HPK1 está río arriba de la MEKK1 y TAK1 en la cascada de la cinasa JNK. Se ha descrito además que, la HPK1 está asociada con proteínas adaptadoras tales como: Crk, CrkL, GRB2 (proteína-2 del factor de crecimiento unido al receptor) y Nck a través de la unión a SH3 (Src-homología de dominio-3) de estas proteínas. Además de la asociación con estas proteínas, HPK1 aumenta la actividad de cinasa y su asociación con el receptor de EGF.

Otras MAP4Ks como GCK, GCKR, GLK, GLK y HGK son activadas por el TNF. Al igual que la MEKK1 y las MLKs, GCK, GCKR y HGK son activadores específicos de JNK (92).

La vía de transducción de señales de JNK está implicada en múltiples procesos fisiológicos. Los JNKs son activos como dímeros para ser translocados a través de la membrana nuclear. Las JNKs se identificaron originalmente como las principales cinasas responsables de la fosforilación de c-jun, dando lugar al aumento de la actividad del factor de transcripción AP1 (proteína activadora-1). Otros factores de transcripción nuclear son considerados su blanco incluyendo ATF2 (Factor de activación de la transcripción-2), Elk1, Myc, SMAD3 (Sma y relacionadas con la Proteína Mad-3), p53 supresor de tumores, NFAT4 (Factor Nuclear Activador de células T), DPC4 (Eliminado en Carcinoma Pancreático-4) y MADD (Dominio de Muerte Activador de MAP-cinasa), una proteína de dominio de muerte celular (91).



JNK regula los factores de transcripción ayudando a modular la expresión genética en respuesta a una variedad de estímulos celulares, incluyendo eventos de estrés y factores de crecimiento. La activación de la cascada de señalización de JNK generalmente da como resultado la apoptosis, aunque también se ha demostrado que promueve la supervivencia celular bajo ciertas condiciones y tiene un papel importante en la determinación del destino celular durante el desarrollo de los metazoos, así como en la implicación en la tumorigénesis y la inflamación (90).

II.9.3 p38 y vías de señalización

p38 es una familia de las MAPKs, en mamíferos es activada por estrés celular incluyendo la irradiación UV, choque térmico, alto estrés osmótico, así como por inhibidores de la síntesis de proteínas, citocinas proinflamatorias (IL-1 y TNF-alfa) y ciertos mitógenos.

Al menos cuatro isoformas de p38 son conocidas: p38- α , p38- β , p38- γ y p38- δ , se han sido identificado porque todas pueden ser fosforiladas por la cinasa MAPK MKK6. Otras MAPKKs pueden fosforilar algunas isoformas de p38. La MKK3 puede activar p38- α , p38- γ y p38- δ y MKK4 puede activar a p38- α (87, 89).

TAK1 es una nueva MAPKKK que participa en la transducción de señales de TGF- β y en la fosforilación de la ruta quinasa p38. Las isoformas α y β de p38 son responsables de la activación de HSP25/27 (Heat Shock Proteins-25/27, proteína de choque térmico) y la MAPKAPK2 (proteína cinasa-2 activada por MAPKs).



Las isoformas γ y δ de p38 activan ATF2. Otros factores de transcripción afectados por la familia p38 incluyen STAT1 (transductores de señal y activadores de la transcripción-1), complejos Max/Myc, Elk1 y CREB (AMPc respuesta al elemento proteína de unión) a través de la activación de MSK1 (Cinasa-1 Activada por mitógeno y el estrés) (92).

Un aspecto importante de la subfamilia de p38 es que afecta la motilidad celular, la transcripción y la remodelación de la cromatina. Otros sustratos de la vía de señalización de p38 incluyen CHOP (proteína homóloga-C/EBP) para la regulación de la expresión génica, así como MAPKAPK3, MAPKAPK5 y MNK1 (MAPKs de interacción con la cinasa-1).

Cabe señalar que la MAPK p38 es un mediador crucial en la activación del gen NF- κ B dependiente de inducción por el TNF.

La activación de la MAPK p38 por el TNF es de forma independiente de la TRAF2 (Factor 2 asociado a Receptores de TNF) ruta regularmente utilizada, sino a través de NIK-asociado (Cinasa inductora de NF- κ B) y a una MEKK adicional que es conocida por unirse y activar dos IKK recientemente identificadas (cinasa I- κ B) (91-93).

II.9.4 Vía regulada por ERK insulina/mitógeno

Fue la primera vía MAPK en ser identificada en mamíferos. El módulo de ERK responde principalmente a factores de crecimiento y mitógenos; y estimula la respuesta transcripcional en el núcleo. Las ERK1 y ERK2 son el grupo más estudiado, se activan por MEK1 (MAPK/ERK cinasa-1) y MEK2, que se fosforilan en el motivo Thr-Glu-Tyr. Las MEK, a su vez se activan por c-Raf, que es la



MAPKKK de esta vía de señalización, la cual es regulada por los receptores del factor de crecimiento y tirosina cinasas que se activan a través de Ras.

En la membrana, Raf también es fosforilada por varias proteínas cinasas, incluyendo cinasas-Tyr tales como: Src y Ser/Thr, cinasas PAK (cinasa activada por p21), un efector de Rac1 que es una GTPasa de la familia Rho que en sí es un mismo efector de Ras .

Estudios realizados demuestran que Ras puede influir directamente en la vía ERK reclutando Raf1. Y por lo menos, algunas MAPKs de las vías centrales activadas por estrés pueden ser reguladas por los miembros de la subfamilia Rho de la superfamilia Ras (87, 93).

La subfamilia Rho está compuesta en mamíferos por los grupos de Rho, Rac y Cdc42 (Ciclina-42 de la División Celular). La activación de PI3K (fosfoinositol 3 cinasa) que requiere Ras y en consecuencia la familia Rho GEFs que puede ser objeto de regulación por parte de Ras y PI3K. De hecho, la activación por el mitógeno Rac1 requiere la activación de PI3K (89).

Las MEKK2 y MEKK3 son otras MAP3Ks que también pueden activar MEK1 y SEK1 (cinasa-1 SAPK/ERK). TPL2 también puede activar a ERK mitogénica. TPL2 es una MAP3K que podría activar directamente a MEK1 y SEK1. Mientras que, la sobre expresión de larga duración de TPL2 activa a los SAPKs y ERK, la expresión de los genes oncogénicos, COOH-terminal resulta en TPL2 truncada, teniendo una mayor activación de SAPK y de ERK, lo que resulta en la afirmación de que el dominio COOH-terminal regula negativamente la actividad TPL2. Tras la translocación al núcleo, las ERKs son responsables de la fosforilación de múltiples sustratos dependiendo del estímulo inicial. Estos incluyen activadores de la



transcripción incluyendo p90rsk, cinasa S6, MAPKAPK1 (proteína cinasa-1 activada por MAPK), la fosfolipasa-A2 y MSK, así como factores de transcripción (ELK1, Ets1, Sap1a, m-Myc), proteínas STAT3, proteínas adaptadoras como SOS (Son Of Sevenless), receptores de factores de crecimiento como EGF (Factor de crecimiento epidermal) y receptores de estrógeno (94).

Generalmente, la activación de una vía de señalización de ERK tiene un papel en la mediación de la división celular, la migración y la supervivencia. Las ERK1/2 y MEK1/2 también se activan fuertemente durante el ejercicio muscular y pueden proporcionar el enlace entre el ejercicio y cambios adaptativos en la composición del músculo esquelético (92).

Además de las vías de MAPKs citadas anteriormente, se han identificado otras familias de MAPKs. Una de ellas es BMK1 (Proteína Cinasa Grande activada por mitógeno, conocida como ERK5), un miembro recientemente identificado de la familia de las MAPKs en mamíferos. BMK1 es activada por factores de crecimiento, estrés oxidativo y condiciones hiperosmolares. MEK5 se activa por MEKK3, es una cinasa río arriba específica de BMK1. Dos ERKs más también han sido identificados (ERK3 y ERK3-relacionado), cuyas funciones se desconocen. Las vías de transducción de señales de MAP cinasa juegan un papel importante en la regulación de la proliferación en células de mamífero mediante el intercambio de sustrato y la interacción cruzada de la cascada. Las vías de las MAP cinasa están implicadas en muchas condiciones patológicas, incluyendo el cáncer y otras enfermedades. Por lo tanto, una mejor comprensión de la relación entre el PAM, el sistema de transducción de señal de cinasa y la regulación de la proliferación



celular es esencial para el diseño racional de nuevos enfoques farmacoterapéuticos (93).



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las Infecciones Respiratorias Agudas (IRAs) son la causa de altas tasas de mortalidad y morbilidad en el mundo. El hPVI-1 es uno de los agentes infecciosos responsable de las IRAs (95). Cuando existe infiltrado inflamatorio de PMN en la zona infectada del paciente se produce el cierre de la vías aéreas. Sin embargo, se desconocen cuáles son los mecanismos patogénicos que se presentan durante la infección con este virus y particularmente como se activa la producción de IL-8 y si tiene alguna relación con la vía de las MAPK's. Además, no se ha establecido si la producción de esta quimiocina puede ser activada solo con la interacción del virus con las células del epitelio respiratorio o es necesaria la replicación del virus.

I. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades infecciosas del aparato respiratorio ocupan el primer lugar como causa de morbi-mortalidad a nivel mundial. El 75% de éstas, son producidas por virus y de éstos, el virus de parainfluenza es el tercer agente etiológico más frecuente(96). Se ha comprobado que el hPIV-1 es la primer causa de "Croup" en niños menores de 5 años y que dos de cada cinco niños afectados por esta enfermedad mueren por el cierre de la vía aérea causada por el infiltrado de polimorfonucleares (neutrófilos) a la zona de la infección (73, 75). Estudios moleculares de este evento permanecen sin ser abordados y las terapias clásicas no han dado los resultados esperados; por lo que es necesario conocer más sobre el comportamiento del virus de parainfluenza tipo 1, así como dilucidar los posibles



eventos patogénicos desencadenados y con ello tener una visión más amplia para la terapia del croup producido por el hPVI.

II. HIPÓTESIS

La infección del hPVI-1 en las líneas celulares HEp-2 y A549 provoca cambios en la fosforilación de las MAPK's, las cuales activan la producción de la IL-8.

III. OBJETIVO GENERAL

Determinar si las interacciones del hPVI-1 en las líneas celulares HEp-2 y A549 activan la vía de las MAPK's con la producción de IL-8.

VI.1. Objetivos particulares

- I) Establecer sí la infección de células HEp-2 y A549 por el VPI-1 activa la producción de IL-8.
- II) Determinar sí durante la infección con hPVI-1 de células HEp-2 y A549 se fosforilan las MAPKs: ERK 1/2, JNK/SAPK y p38.
- III) Determinar sí la inhibición de las MAPK's en células HEp-2 infectadas con hPVI-1 modifica la producción de IL-8 a diferentes tiempos.
- IV) Establecer sí es necesaria la replicación viral para la producción de IL-8.



IV. MATERIAL Y MÉTODOS

VII.1. Líneas celulares

Se propagaron cultivos de líneas celulares HEP-2 derivadas de epiteloma tipo 2 de laringe humana (ATCC CCL-23, EE.UU) y A549 línea de células alveolares de adenocarcinoma humano epitelial tipo-II (ATCC, CCL-185 EE.UU). Ambas líneas celulares fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Se propagaron en botellas de 25 cm³ (NuncTMThermo Scientific Inc. Turnberry USA) y cajas petri con Medio Mínimo Esencial tipo Eagle (MEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (Penicilina 100U/ml, Estreptomina 100 µg/ml, Anfotericina-B 1 µg/ml) de Invitrogen Life Technologies (Gaithersburg, MD). Se tripsinizaron para su propagación cada tercer día y fueron conservadas durante el proceso en incubadora a 37°C con 5% de CO₂.

VII.2. Propagación del hPIV-1

La cepa del virus se obtuvo de la ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE.UU) con No. VR-94, cepa; C35 hPIV1. La propagación del virus se realizó en botellas de 25 cm³ con monocapas confluentes al 80% de células HEP-2 y A549, hasta que se observó un efecto citopático 48 h después de la inoculación (formación de sincitios). El virus fue titulado y se comprobó su viabilidad mediante ensayo de placas líticas usando metilcelulosa y ensayos de hemaglutinación. Una alícuota del virus se transfirió a criotubos de 1.8 ml después de la titulación y se almacenó a 70°C. Otra alícuota se utilizó para infectar la



monocapa de células a una multiplicidad de infección de 0.01 (MOI). Monocapas de células HEp-2 y A549 no infectadas se utilizaron como controles.

VII.3. *Titulación del hPIV-1*

Las células HEp-2 y/o A549 en botellas de 25 cm³ se tripsinizaron y se resuspendieron en 11 ml de MEM suplementado con suero fetal bovino al 10% para un total de 12 ml. Se agregó un mililitro de esta suspensión a una caja múltiple de veinticuatro pozos (CM24) (Nunc, EU), posteriormente se adicionó un mililitro más de MEM. Una vez confluentes las monocapas, se lavaron con PBS y se llevaron a cabo diluciones del virus en medio sin suero de 10⁻⁰ hasta 10⁻⁸. Una vez realizadas las diluciones se tomó 0.1 ml de cada una de ellas y se depositó en cada pozo completando con 0.9 ml de MEM. Se incubó durante 2 h a 37°C con 5% de CO₂. Después se eliminó el inóculo y se lavaron las monocapas. A cada pozo se le agregó 1.5 ml de medio incompleto (MI) con metilcelulosa al 2.5% estéril y se incubó a 37°C en cámara húmeda con 5% de CO₂ hasta observar el efecto citopático (4-6 días). Por último, se determinó el título viral y la viabilidad de los virus tratados con UV, contando directamente el número de placas líficas observadas en la dilución mayor. El título se determinó de acuerdo a la fórmula (UFP/ml= # placas x 10 x FD), donde FD es el factor de dilución; y 10 es el factor de corrección que corresponde a 0.1 ml de inóculo. Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford (Harlow y Lane 1988), el cual cuantifica cantidades de azul brillante de Coomassie unidas a una proteína desconocida y compara esta unión con diferentes cantidades de proteína estándar, usualmente albúmina sérica



bovina. Este método puede cuantificar de 1 a 10 μ g de proteína usando una curva estándar.

VII.4. Inactivación del hPIV-1

Una porción del *hPIV-1* (5 ml de virus con un título de 6×10^6 UFP) en medio libre de suero (RPMI) se colocó en una caja sellada y se irradió a una distancia de 10 cm durante 10 minutos con niveles de radiación óptimas (1.200 unidades \times 100 μ J/cm²) utilizando un FB-UVXL 1000 UV reticulante Fisher Biotech (Thermo Fisher Scientific Inc. Kentucky, EE.UU.) (97).

La inactivación se verificó por ensayo de placas en monocapas de células HEp-2 y A549 y en ensayos de hemaglutinación que se realizaron en placas de 96 pocillos. Para verificar la actividad de hemaglutinina del hPIV-1 se utilizaron diluciones seriadas de sangre O positivo humana (1:2, 1:4, 1:8 etc) (98). Los resultados se expresaron en unidades de hemaglutinación (HAU) (99, 100).

VII.5. Titulación por hemaglutinación

Se colectó sangre humana del Grupo 0 y Rh positivo, se centrifugó (1.500 rpm por 10 min) para llevar las células al fondo del tubo; se aspiró el sobrenadante removiendo cuidadosamente el suero y la capa de leucocitos. Se adicionó de 1 a 2 ml de PBS pH 7.4 y se mezcló suavemente hasta que se suspendió el paquete celular. Posteriormente, se centrifugó una vez más a 1.500 rpm por 10 min, y se retiró el sobrenadante, y se repitió el lavado con PBS (pH 7.4) hasta que el sobrenadante tenía la coloración clara. Se estimó el volumen del paquete celular y



se multiplicó por 24, este valor dio el volumen de PBS (pH7.4) necesario para preparar una suspensión de eritrocitos al 4%. A una dilución 1:100 de suspensión de eritrocitos en PBS (pH 7.4).

En una placa de 96 pozos se adicionaron en cada uno de ellos 25 µl de solución PBS pH 7.4 y se eligieron filas de la placa del 1 al 12 para las diluciones. Posteriormente se agregaron 25 µl de la solución con el virus de parainfluenza tipo 1 a las filas 1 y 2. Después se realizaron diluciones seriadas transfiriendo 25 µl desde los pozos de la segunda fila a los pozos sucesivos hasta la fila 11. Enseguida se añadieron 25 µl de PBS de la fila 2 a la fila 12. Por último, se agregaron 50 µl de la solución de eritrocitos al 0.5% en todas las filas, iniciando de la fila 12 hasta la fila 1. La fila 12 se utilizó como control negativo y la fila 1 como control positivo.

Finalmente se incubó a 37°C por 45 min y se analizó la placa. Los pozos en donde no se observó una precipitación de eritrocitos en el fondo indicó la presencia viral (malla). Una vez observado hasta que fila había presencia viral, se determinó el título viral considerando las diluciones realizadas (Tabla 2).

Tabla 2. Diluciones del hPIV-1

Fila	Título viral	Diluciones
1	1:1	25.000
2	1:2	12.500
3	1:4	6.250
4	1:8	3.124
5	1:16	1.563



6	1:32	0.781
7	1:64	0.391
8	1:128	0.195
9	1:256	0.098
10	1:512	0.049
11	1:1024	0.024

Por último se determinó el volúmen necesario para infectar la botella de cultivo con células, para ello se consideró la siguiente formula:

$$\text{Volúmen } \mu\text{l} = (\text{dilución}) \times (6 \times 10^6) / (2 \times 10^5)$$

En donde:

dilución= Valor de la dilución (título viral) tomado de la tabla 2. En esta parte se toma en cuenta la multiplicidad de infección (MOI). Para este caso, se consideró una MOI de 1 (una MOI de 1 representó una partícula viral para cada célula a infectarse), por lo tanto el valor de la dilución se dividió entre 1.

6×10^6 = Cantidad aproximada de células en una botella de cultivo de 25cm^2

2×10^5 = Partículas virales infecciosas por Unidad Hemaglutinante de eritrocitos

VII.6. Cuantificación de IL8 por el Método de ELISA

Las células HEp-2 y A549 se infectaron con el hPIV-1 vivo e inactivado a una MOI de 0.01, el sobrenadante se recuperó en diferentes momentos (30, 45, 60, 90 y 120 min, y 12 y 24 h), células no infectadas HEp-2 y A549 se utilizaron como controles. La concentraciones de IL-8 se cuantificó por ELISA de acuerdo al



procedimiento descrito por Kittigul *et al.*, 1998 (101). Se utilizaron anticuerpos monoclonales CXCL8/IL-8 antihumanos de R & D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, EE.UU.). La densidad óptica se leyó a 450 nm en un lector de ELISA espectrofotómetro de Thermo Lab systems (Santa Rosa, CA, EE.UU. y Helsinki, Finlandia).

La enzima utilizada para la identificación fue la peroxidasa y el cromógeno; 3,3',5,5'-tetrametilbencidina base odihidrocloruro (TMB) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) que se tiñe de azul.

VII.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa y Transcripción inversa (RT-PCR)

La expresión de ARNm para IL-8 se determinó por transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El total del ARN se aisló mediante el uso de sistema de aislamiento de ARN total SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, EE.UU.) siguiendo el protocolo del fabricante. Una porción de 0.5 µg de ARN total fue utilizado para la transcripción inversa para posterior amplificación por PCR en un volumen de 20 µl, incluyendo 200 U de M-MLV RT transcriptasa inversa (Invitrogen, CA, EE.UU.), 50 U de inhibidor de RNasa (Sigma), 0.2 µg de random primer, 10 mM de dNTP Mix (Invitrogen, CA, EE.UU.) y 5x de First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂) proporcionado por Life Technologies. La reacción se incubó a 42°C durante 50 min. Posteriormente en un volumen total de 20 µl se utilizó una porción del producto de RT se mezcló con 10 mM de cada dNTP, 1U de Taq polimerasa (Promega, Madison, EE.UU.), 10 pmoles de ambos cebadores tanto del forward como del reverse y 1 x de buffer



de PCR (formulación suministrada a pH 8,5 que contiene colorante azul y colorante amarillo) suministrado por Promega. Los primers para IL-8 fueron los siguientes: forward, 5'-ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT-3' y reverse, 5'-TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT-3' amplificando un producto de 289 bps (102). Como control interno se utilizó el gene constitutivo gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH); la secuencia de los primers fue la siguiente: forward, 5'-CCA GCC GAG CCA CAT CGC TC-3 y reverse 5'-ATG AGC CCC AGC CTT CTC CAT-3', amplificando un producto de 390 pb. El gen de GAPDH se amplificó en la misma reacción como gen de referencia. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Biometra; las condiciones de reacción fueron: una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min; seguido por 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C durante 40 seg, alineamiento de primers a 58 °C por 40 seg, extensión a 72°C durante 1 min y una extensión final de 72°C durante 6 min. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron mediante transiluminación UV.

VII.8. Determinación de IL8 por el Método de ELISA en sobrenadantes de cultivos pretratados con inhibidores de cinasas

Para una mejor reproducción de las condiciones de la laringe, los ensayos se llevaron a cabo utilizando células HEp-2, las cuales fueron pre-tratadas con los inhibidores ERK1/2 (PD980559), MAPK p38 (SB203580) y JNK/SAPK (SP600125), productos elaborados por Calbiochem Millipore (San Diego, CA). Los inhibidores fueron usados a una concentración de 20 μ M en una solución de



DMSO; la misma concentración de DMSO se adicionó a las células control y se incubaron a 37°C. Posteriormente, se agregó 1 ml de hPIV-1 a una MOI de 0.01, las células fueron infectadas y se incubaron durante 30, 45, 60, 90, 120 min, 12 y 24 h. Se determinaron los niveles de IL-8 de los sobrenadantes colectados. Los controles positivos fueron sobrenadantes de células HEp-2 sin inhibidores incubados bajo los mismos tiempos de infección. Cuando se utilizaron los inhibidores de MAPKs, las células fueron pre-tratadas con el inhibidor una hora antes de la infección. Después del tratamiento con el inhibidor, se midieron las concentraciones de IL-8 en los diferentes tiempos de incubación.

VII.9. Western blot para detección de la fosforilación de MAPK's (ERK, JNK y p38) en células infectadas con hVPI-1

Las células HEp-2 y A549 fueron infectadas a tiempos diferentes (30, 45, 60, 90, 120 min y 12 a 24 h) con el hVPI-1 vivo o inactivado con UV, a una MOI de 0.01. Posterior a los tiempos de tratamiento, las monocapas se lavaron dos veces con PBS frío y se cosecharon proteínas con amortiguador de lisis (NaF 50mM, Na₂MoO₄ 10mM, Na₃VO₄ y EDTA 1mM) e inhibidores de proteasas (aprotinina 2.5 a 10 µg/µl y leupeptina 2.5 a 1 µg/µl). La monocapa se colectó y se transfirió a tubos eppendorf de 1.8 ml (Nunclon, EEUU), se centrifugaron a 1200 x g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se retiró por succión y la pastilla celular se resuspendió en solución hipotónica de RIPA 2X (que consiste en: 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl a pH de 7.5, 316mM NaCl, 2mM de Na₃VO₄, 20mM de Na₃MoO₄, 50mM de NaF y H₂O para 5 ml) con inhibidores de fosfatasa y proteasas en volúmenes de 500 µl.



Después se agregaron 500 μ l de una solución amortiguadora con β -mercaptoetanol y azul de bromofenol y las proteínas se hirvieron a 100°C durante 10 min. Posteriormente, se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford. Las proteínas obtenidas se separaron en geles por SDS-PAGE al 15% de Laemmli (103) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m de la marca Bio-Rad (Laboratories Hercules, CA) durante 3.5 h, la eficiencia de la transferencia se determinó por tinción con rojo de Ponceau al 0.1% en 5% de ácido acético Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los sitios sin proteína en la membrana se bloquearon con una solución de leche descremada al 5%, Tween 20 al 0.1% en TBS por una hora. Después, la membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se incubó con solución de albúmina sérica bovina al 1% (3 ml) y los anticuerpos a una dilución de 1:1000 durante la noche con MAPK fosfo-ERK1/2 (sc-81492), MAPK ERK1/2 (sc-292838), fosfo-p38 MAPK (sc-7973), p38 MAPK (sc-535), fosfo-JNK (sc-135642) y JNK (sc-571) de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Posteriormente, se aplicaron cuatro lavados a las membranas con Tween 20 al 0.05% en solución de TBS y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h en una bolsa de polietileno con 3 ml de albúmina sérica bovina al 1% y anticuerpo anti-humano IgG de cabra a una dilución 1:3000 (antibody monoclonal Goat, 200 mg/ml. Marca Santa Cruz, Atlanta USA). La membrana se lavó y se cubrió con 1 ml de luminol (Santa Cruz) durante 10 min. Por último, se expuso a autorradiografía con placas de rayos X en un chasis de exposición, después se analizó la intensidad de las bandas y la cuantificación se llevó a cabo con el software de análisis de imagen Quantity One (Bio-Rad).



VII.10. Análisis Estadístico

Se realizaron pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk), dado que los datos no mostraron una distribución normal, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar los diferentes tratamientos. Los ensayos se realizaron por triplicado, un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.



V. RESULTADOS

VIII.1. Inactivación del hPIV-1

Se realizaron ensayos de placas para verificar la inactivación de virus. En la figura 7 se observa como el virus se inactivó adecuadamente ya que no se propagó. En la dilución 10^{-5} marcada con la letra C, se pueden observar 4 unidades formadoras de placa que corresponde a $4(10) (1 \times 10^{-5})$ que es igual a 4,000.000 UFP/ml. En la figura 8 se presentan las pruebas de hemaglutinación, las cuales mostraron que los virus tratados con UV tuvieron la misma capacidad de aglutinar eritrocitos que los virus sin tratar, lo cual demuestra que la inactivación no afectó la capacidad antigénica de la hemaglutinina. Se observa hemaglutinación hasta la dilución 1:32 en ambos virus, vivos e inactivados.

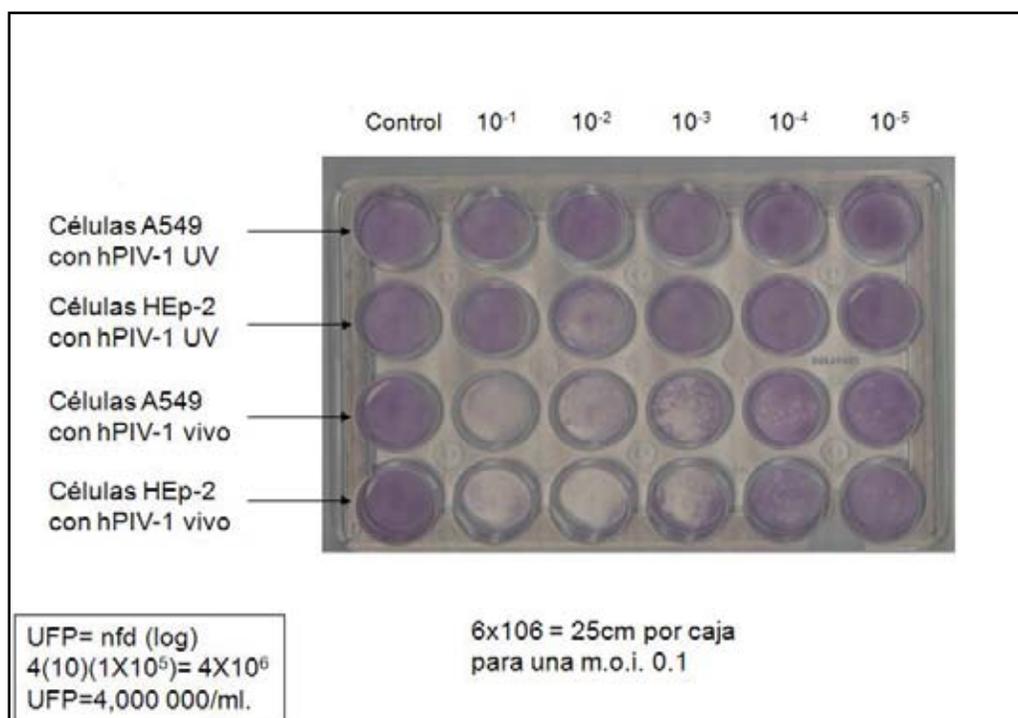


Figura 7. Ensayo de placas líticas. El número de partículas virales fue determinado por dilución en una placa de 24 pozos con células HEp-2 y A549. Cada placa lítica que se desarrolla está



relacionada con una sola partícula de virión. Este método se realizó para determinar la viabilidad de ambos virus, vivo e inactivo. Cada tipo de célula y la característica del virus (inactivo y vivo) y las diluciones del virus que van de 10^{-1} a 10^{-5} ; y el número de las unidades formadoras de placa. Este ensayo se realizó por triplicado.

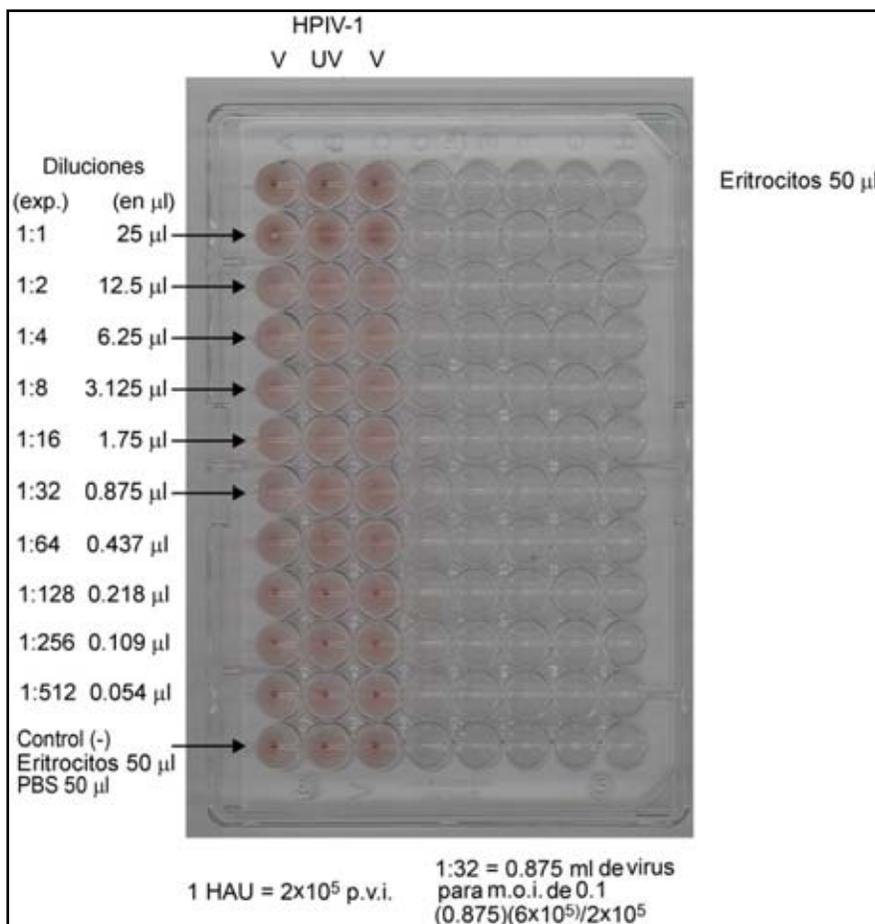


Figura 8. La capacidad hemaglutinante del virus tanto vivo como inactivo se determinó en una placa de 96 pozos. La V corresponde a la fila de virus vivo y que hizo por duplicado. UV corresponde al ensayo con virus inactivados (inactivado con luz ultravioleta). Las diluciones exponenciales en serie del virus fueron de 1:1 hasta 1:512, las diuciones también se expresaron en /µl. La hemaglutinación se presentó hasta la diclución de 1:32. Las unidades de hemaglutinación se distinguen como HAU y la fórmula para obtener el número de partículas infectivas (p.v.i.) ambas utilizadas para calcular la m.o.i. Para el control negativo se utilizó solo PBS y eritrocitos (último carril). Estos ensayos se realizaron por triplicado.

VIII.2. Producción de IL-8 en líneas celulares infectadas con el virus vivo e inactivado

Después de calcular el título viral y de comprobar que los virus fueron inactivados y que aún mantenían la capacidad hemaglutinante, se realizó la infección de las



líneas celulares con el hPIV-1 vivo, donde se produjo un aumento de la secreción de IL-8 en función del tiempo (Figura 9).

La secreción de IL-8 en células HEp-2 y A549 fue máxima a las 12 h post-infección (265 pg/ml en células HEp-2 y 239 pg/ml en células A549), y disminuyó a las 24 h. Sin embargo, la secreción de IL-8 en ambos tipos de células con virus irradiados no se produjo en ningún tiempo experimental (Figura 9).

El análisis estadístico de la secreción de IL-8 en células HEp-2 y A549 mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto al control (Tabla 3).

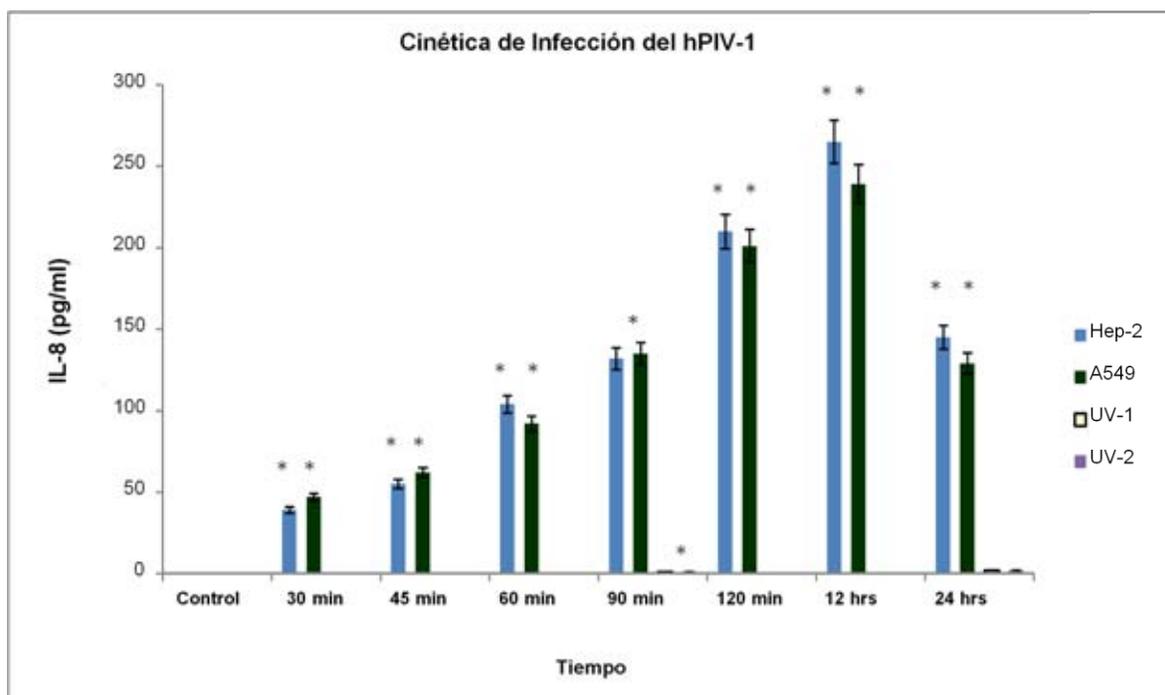


Figura 9. Cinética de secreción de IL-8 durante la Infección con el hPIV-1. Se cuantificó la secreción de IL-8 en células HEp-2 y A549 infectadas con hPIV-1. Se muestran la concentración de IL-8 a diferentes tiempos en infecciones con virus vivo e inactivo. Los resultados del sobrenadante en células HEp-2 en color azul y los de las células A549 en color verde. El nivel de IL-8 aumentó con el tiempo en ambas líneas celulares con el virus vivo y los niveles donde alcanzó su punto máximo fué a las 12 horas. No se detectó IL-8 cuando se usó el virus inactivo, las células HEp-2 con virus inactivo (UV-1) y para las células A549 (UV-2). Los datos fueron medias de ensayos por triplicado a partir de tres experimentos por separado. El control se refiere a ambos tipos de células pero sin infectar. Los datos estadísticos se explican en la Tabla 3.



Tabla 3. Secreción de IL-8 (pg/ml) en células HEp-2 y A549 infectadas con hPIV-1 activo e inactivo.

Tiempo	HEp-2 (pg/ml)	A549 (pg/ml)	HEp-2 UV (pg/ml)	A549 UV (pg/ml)	Xi cuadrada	P	CV %
Control	0.004 ^a	0.001 ^a	0.002 ^a	0.027 ^a	3.71	0.29	207.49
30'	39.01 ^b	47.04 ^a	0.02 ^c	0.06 ^c	10.38	0.01	105.16
45'	55.03 ^b	62.11 ^a	0.03 ^c	0.03 ^c	9.35	0.02	104.74
60'	104.15 ^a	92.72 ^b	0.01 ^c	0.04 ^c	10.38	0.01	104.74
90'	132.38 ^a	135.07 ^a	1.33 ^b	1.00 ^b	9.46	0.02	102.65
120'	210.08 ^a	201.72 ^b	0.02 ^c	0.01 ^c	9.35	0.02	104.47
12 horas	265.72 ^a	239.84 ^b	0.01 ^c	0.01 ^c	9.43	0.02	104.71
24 horas	145.06 ^a	129.30 ^b	2.05 ^c	2.00 ^c	9.46	0.02	101.74

^{a, b, c} Medias con diferente superíndice indican que son estadísticamente diferentes al nivel de significancia (P <0.05). P= Valor de significancia al 95%. CV= Coeficiente de variación.

VIII.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa y Transcripción inversa

La expresión de RNAm de IL-8 fue determinada en células A549 y HEp-2 a diferentes tiempos, el método utilizado fue RT-PCR. El análisis se hizo en células infectadas con el hPIV-1 vivo e inactivo así como en células sin infectar. La amplificación del producto de IL-8 fue de 289 pb, mientras que para GAPDH (control de reacción) fue 390 pb (Figura 10). La mayor expresión de IL-8 se observó en las células infectadas, seguida de las células no infectadas y con el virus inactivo. La expresión se mostró igual en ambos tipos celulares tanto en



células A549 como en HEP-2. El gen constitutivo (o control de carga) se expresó también en ambas líneas celulares y la expresión no varió con la infección.

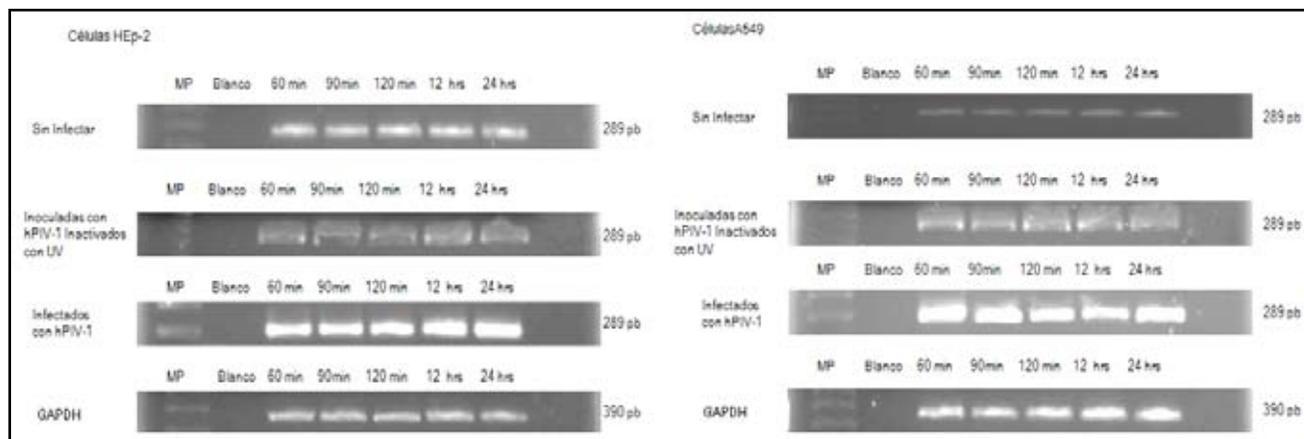


Figura 10. La expresión del RNAm de IL-8 en células HEP2 y A549 infectadas con el hPIV-1, con el virus inactivo por UV y en células sin infectar fue analizada por RT-PCR. La principal expresión de IL8 se dió en células infectadas con el hPIV-1 vivo. La expresión de GAPDH no fue diferente a las células sin infectar. El blanco corresponde a los reactivos para la RT-PCR sin muestra. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

VIII.4. La Infección de hPIV-1 inactivado con UV no estimula la fosforilación de MAPK

Para establecer si el virus inactivo estimula la fosforilación de las MAPKs (ERK, JNK y p38) se realizaron pruebas de Western blot (Figura 11). Las dos líneas celulares probadas fueron HEP-2 simulando la porción superior del tracto respiratorio y la línea A549, para simular el tracto inferior de la misma vía. Los ensayos de Western blot se realizaron para determinar el estado de fosforilación de las MAPKs. En ambas líneas celulares no se presentó expresión en ninguno de los tiempos de la cinética como se puede observar en la figura 11.

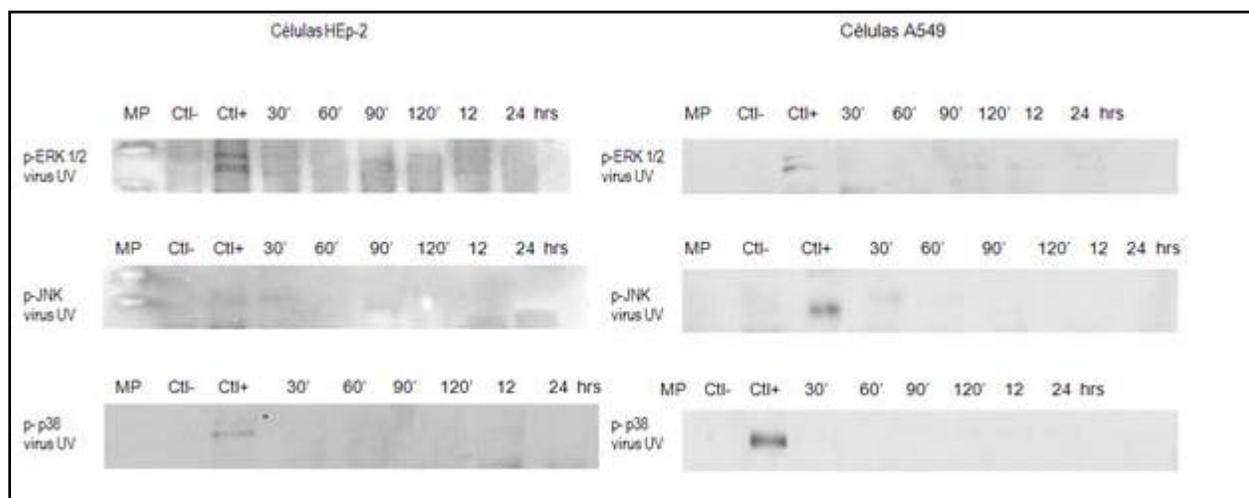


Figura 11. Cinética de la fosforilación de las MAPK en células HEp-2 y A549, después de la inoculación con hPIV-1 virus inactivo. No se encontró fosforilación de ERK1 / 2, JNK, y p38 en los tiempos analizados (30 min a 24 hrs). Ctl (-) se refiere a las proteínas de células no infectada. El Ctl (+) corresponde a las proteínas de células infectadas con el virus vivo (90 min). Los anticuerpos utilizados se describen en Material y Métodos. Los ensayos de Western blot se realizaron por triplicado.

VIII.5. Fosforilación de las MAPKs

Se realizaron ensayos de Western blot para determinar el estado de fosforilación de las MAPKs: ERK1/2, JNK/SAPK y p38 en ambas líneas celulares infectadas con el virus vivo. En células HEp-2, la infección por hPIV-1 promovió desde el inicio, la fosforilación de ERK1/2, comenzando a los 60 min de infección (Figura 12 A y B; la intensidad de las bandas se cuantificó por medio de un análisis densitométrico). La fosforilación aumentó a los 90 y 120 min. Sin embargo, fue mayor a las 12 h disminuyendo a las 24 h. En el caso del virus inactivo, la banda de 12 h solo se observó en el carril 3, no hay evidencia de fosforilación que se observe en la cinética de los tiempos seleccionados. Los mismos criterios se



aplicaron a las figuras de Western blot; y sólo se observó una banda correspondiente a la interacción de 12 h sin un aumento en la fosforilación antes y después de este tiempo. Los controles consistieron en células no infectadas, para que no mostraran cambios significativos.

En las células A549 infectadas con el hPIV-1 activo, la detección de la fosforilación de ERK1/2 comenzó a los 60 min de infección y se observó una señal de fosforilación pequeña a los 90 min (Figura 12 C y D), aumentó ligeramente a los 120 min y en los tiempos restantes fue constante hasta las 24 h. La fosforilación se detectó ligeramente para las muestras control y para el virus inactivo y en el control. En controles (células no infectadas), y muestras con virus inactivos a los 30 y 45 min de infección, la fosforilación se detectó ligeramente. Con los virus inactivos, el resultado de Western blot fue similar (Figura 12 C; carril 3 y Figura 12 D; carril 3).

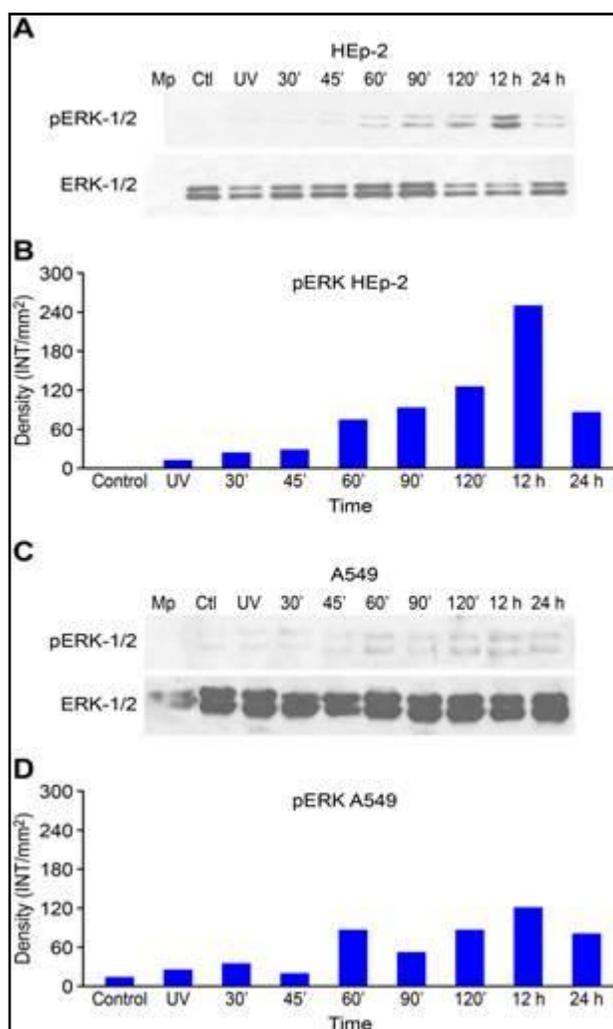


Figura 12. Fosforilación de ERK. Se detectó la fosforilación de ERK1/2 por Western blot en ambas líneas celulares HEp-2 y A549 infectadas con hPIV-1 vivo en diferentes puntos de tiempo: (A) En células HEp-2 con el anticuerpo fosfo-ERK (SC-81492) se detectó p-ERK1/2 y el control de carga con ERK1/2 (SC-292838); (B) Las bandas de p-ERK1/2 fueron examinadas mediante análisis densitométrico. (C) Detección en células A549 de fosfo-ERK y proteína total de ERK1/2 con los mismos anticuerpos; (D) Análisis densitométrico de bandas de fosfo-ERK en las líneas A549. Mp: peso molecular; Ctl: control y UV (virus inactivo) que corresponde a 12 horas en el carril 3. Todos los ensayos se hicieron por triplicado, cada uno de ellos por separado.

La fosforilación de JNK en células HEp-2 comenzó a los 60 min y se incrementó gradualmente a los 90 min de interacción, pero se redujo a los 120 min. A las 12 y 24 h cesó la fosforilación (Figura 13 A y B). En células HEp-2, la fosforilación de



JNK en células A549 comenzó a los 45 min, sin embargo su fosforilación disminuyó a los 90 y 120 min, la ausencia total de fosforilación se observó a las 12 y 24 h, sin ningún aumento adicional (Figura 13 C y D, carriles 9 y 10).

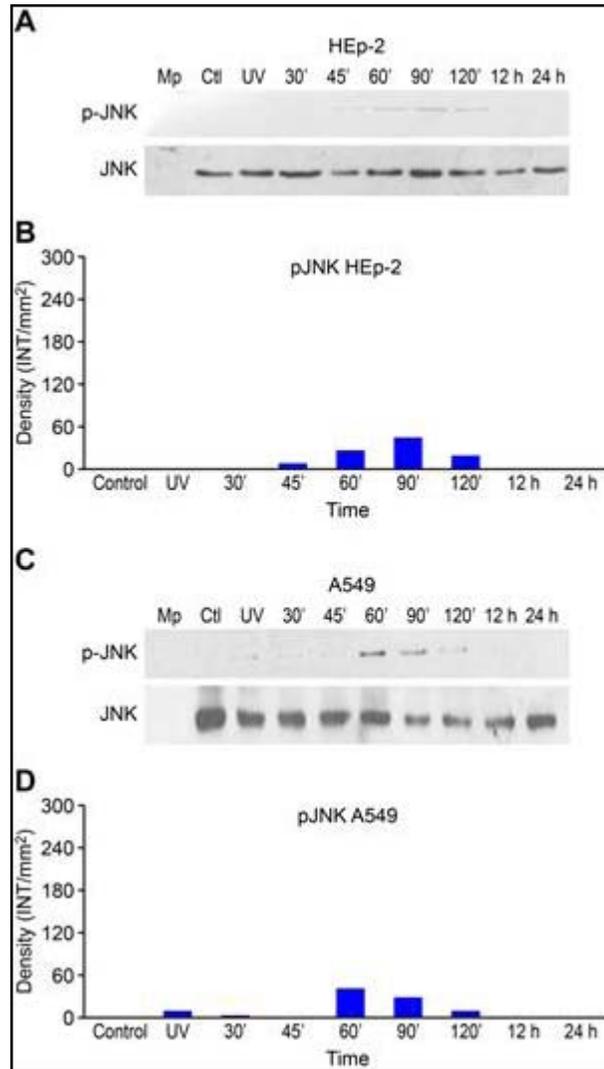


Figura 13. Fosforilación de JNK. Detección de la fosforilación de JNK en células HEp-2 y A549 infectadas con el hPIV-1. Las células se infectaron con hPIV-1 vivo e inactivo en una cinética a diferentes tiempos y los lisados obtenidos de las células tratadas con ambos virus fueron detectados por Western blot (como se describe en Materiales y Métodos), para evaluar las formas fosforiladas: (A) fosfo-JNK se detectó con anticuerpo monoclonal SC-135642 y la JNK total con SC-571 en células HEp-2; (B) La intensidad de las bandas se analizó por densitometría de p-JNK; (C) La fosforilación líneas celulares A549 también fueron detectadas con los mismos anticuerpos (D) El análisis densitométrico de fosfo-JNK. Mp: peso molecular; Ctl: Control y UV (virus inactivo) que corresponde a las 12 horas en el carril 3. Los experimentos se realizaron por triplicado.



La fosforilación de p38 en la línea celular HEp-2 comenzó a los 30 min (Figura 14 A y B), y aumentó a los 120 min, posteriormente se mantuvo estable hasta las 24 h. En células A549, los niveles de fosforilación de p38 fueron similares, comenzando a los 30 min (Figura 14 C y D), aumentando gradualmente a los 90 min y logrando un máximo a las 120 min.

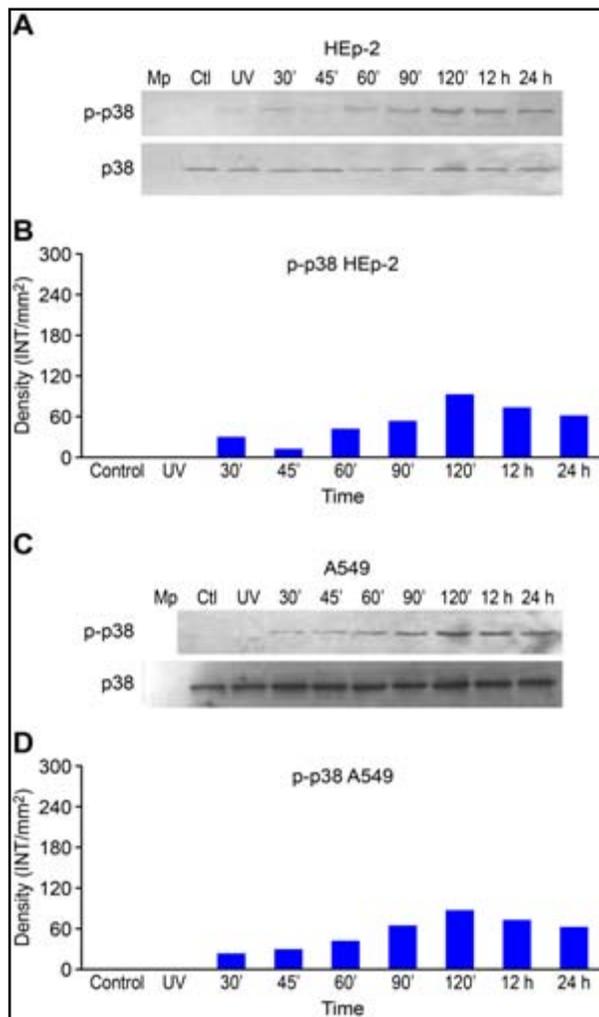


Figura 14. Fosforilación de p38. Se detectó la fosforilación de p38 en células HEp-2 y A549 infectadas con el hPIV-1 por Western blot. Las células fueron infectadas con el virus vivo e inactivado con luz ultravioleta, en la misma cinética de tiempo de los otros ensayos. Se detectaron tanto las proteínas fosforiladas como las proteínas totales de p38. (A) Las proteínas fosforiladas en células HEp-2 de p38 se detectaron con el anticuerpo monoclonal SC-7973 y las proteínas totales con SC-535 en células HEp-2; (B) La intensidad de las bandas se analizaron por densitometría de las proteínas de p-p38; (C) Cinética de fosfo-p38 en las células A549; (D) Análisis densitométrico de las bandas de proteína fosforiladas en A549. Mp: peso molecular; Ctl: Control y



UV (virus inactivo) que corresponde a 12 horas en el carril 3. Los datos son las mediciones significativas de tres experimentos por separados.

VIII.6. Dosis para la Inhibición de las MAPKs en la Infección del hPIV-1

Los inhibidores de ERK1/2 (PD980559), JNK/SAPK (SP600125) y p38 (SB203580), inhibieron la expresión de cada una de las MAPKs en las células HEp-2 tratadas 1 hora antes de la infección y se mantuvo durante 12 hr después de la prueba. Los inhibidores fueron usados a diferentes dosis y mantenidos a las 12 hrs para la extracción de las proteínas y valorar la inhibición (Figura 15).

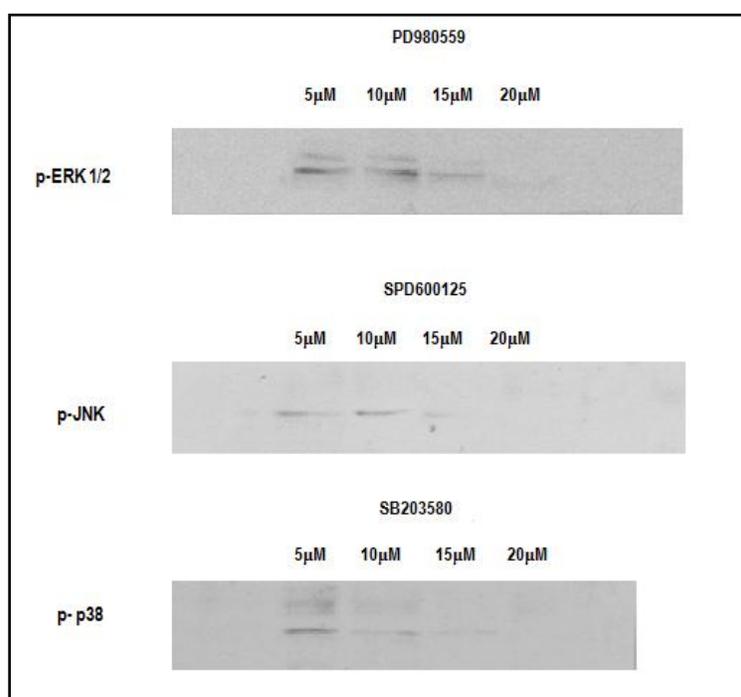


Figura 15. Dosis de inhibidores de las MAPKs. Los experimentos se realizaron mediante la adición del inhibidor a concentraciones de 5 μM (1.3 μl) a 20 μM (5.2 μl) y extraídas las proteínas a las 12 hrs. Los niveles de proteína se detectaron mediante Western blot. Fueron utilizados anticuerpos monoclonales específicos para detectar proteínas fosforiladas. Las proteínas extraídas fueron de células HEp-2 infectadas con hPIV-1. Las pruebas se realizaron por triplicado.



VIII.7. *Inhibición de las MAPKs en la Infección del hPIV-1*

Los resultados de este estudio sugieren que ERK, JNK y p38 se activan después de la infección con el hPIV-1. Para determinar si se requieren estas cinasas para la secreción de IL-8, se hicieron pruebas de ELISA con los sobrenadantes de células HEp-2 pre-tratadas con inhibidores de las cinasas ERK, JNK y p38 e infectadas con el hPIV-1 en los siguientes tiempos: 45, 60, 90 min y 12 y 24 h (Figura 16). Los resultados demostraron que el inhibidor de p38 reprime la secreción de IL-8 tras la infección vírica, mientras que los inhibidores de las MAPK, ERK y JNK/SAPK no inhibieron la secreción de IL-8 (Figura 16 A y B), lo que sugiere que la señalización de la MAPK p38 está implicada en la secreción de IL-8. La Figura 16 C representa la media de tres experimentos con células HEp-2 infectadas con hPIV-1 e inhibidores. Se incluyeron controles sin inhibidores para cada cinasa en todos los tiempos seleccionados. El tratamiento de las células con inhibidores de JNK y ERK no deterioró la secreción de IL-8, pero las células tratadas con el inhibidor de p38 alteraron significativamente la secreción de IL-8 en la mayoría de los tiempos de incubación (antes de 24 h). El análisis estadístico de la secreción de IL-8 en células HEp-2 tratadas con los inhibidores ERK, JNK y p38 mostró que los Inhibidores ERK y JNK no fueron diferentes del grupo de control, pero se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al inhibidor p38 (Tabla 4).



VIII.8. Representación gráfica de la vía de señalización de las MAPKs

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se puede inferir que el hPIV-1 inactivo aún cuando presenta integridad en su superficie no presenta ninguna respuesta. Y es con la replicación viral donde se activa la respuesta de IL-8, se desconoce si es una proteína del virión ó de su genoma la que lleva acabo la activación (Figura 17; número 1 y 2).

Se realizaron pruebas para ver si las MAPKs presentaban actividad y los resultados indicaron que solo cuando el virus vivo infecta a las líneas celulares se fosforilan para realizar su actividad.

Con la utilización de inhibidores específicos de las tres MAPKs se realizó la cinética de infección y con los sobreadantes se midió la secreción de IL-8. En la línea celular HEp-2 infectada con el hPIV-1 y tratada con los inhibidores de ERK y JNK, la secreción de IL-8 continuó en cantidades similares respecto a las células que también fueron infectadas con el virus pero en ellas no se utilizaron inhibidores (Figura 17; número 3). Sin embargo, cuando se llevó a cabo la inhibición de p38, los niveles de la secreción de IL-8 fueron depletados, lo que sugiere que p38 es la vía de las MAPKs que activa la secreción de IL-8.

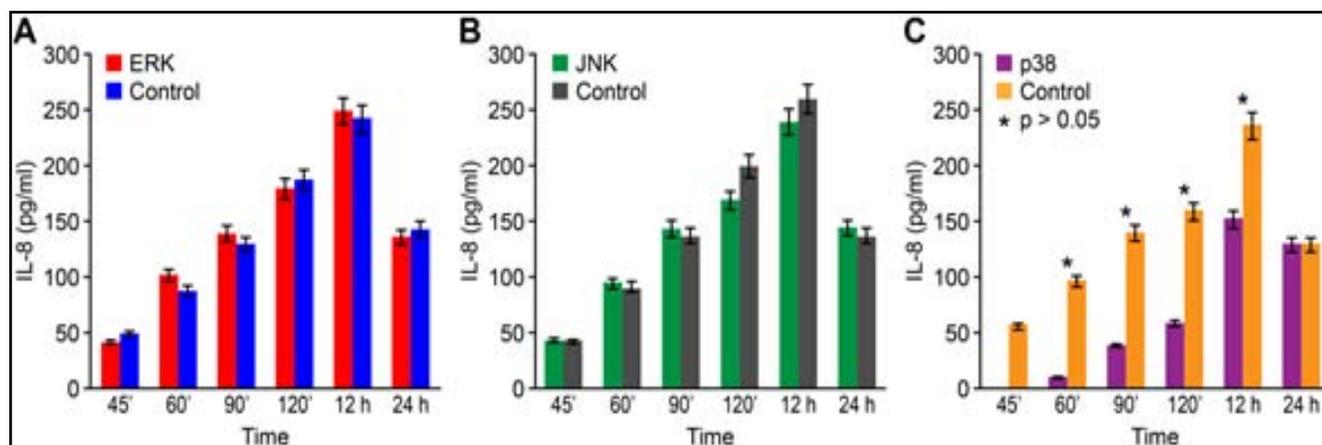


Figura 16. Inhibición de las MAPKs. Por ELISA se cuantificaron las concentraciones de IL-8 en células pretratadas con inhibidores específicos para cada cinasa: ERK1/2 PD980559, JNK SP600125 y de p38 SB203580. El control pertenece a los sobrenadantes de células HEp-2 de células infectadas con el hPIV-1 vivo. (A) Ensayo de la inhibición de ERK1/2 se muestra en rojo la expresión de IL-8 las células tratadas con el inhibidor y azul la expresión de las células sin tratar. (B) El ensayo de inhibidor de JNK, verde claro, es el producto de las células tratadas con el inhibidor y verde oscuro sin ningún tratamiento. (C) Ensayo del inhibidor de p38; en color púrpura, se representa las células tratadas con el inhibidor. Los datos son las medias de tres experimentos separados.

Tabla 4. Secreción de IL-8 en células HEp-2 pre-tratadas con los inhibidores ERK, JNK y de p38.

Tiempo	ERK (pg/ml)	JNK (pg/ml)	P38 (pg/ml)	Control (pg/ml)	Xi cuadrada	P	CV %
45'	41.88 ^a	43.71 ^a	0.06 ^b	50.04 ^a	8.74	0.03	61.71
60'	102.16 ^a	95.27 ^a	11.10 ^c	92.48 ^b	9.46	0.02	51.78
90'	139.25 ^a	143.91 ^a	39.73 ^b	135.85 ^a	8.43	0.03	39.68
120'	179.71 ^a	169.71 ^a	59.48 ^b	181.99 ^a	7.61	0.05	36.75
12 horas	243.08 ^a	240.05 ^a	152.78 ^b	246.07 ^a	6.58	0.08	18.74
24 horas	136.39 ^{ab}	144.50 ^a	129.51 ^b	137.07 ^{ab}	7.46	0.05	4.74

a, b, c Medias con diferente superíndice indican que son estadísticamente diferentes al nivel de significancia (P < 0.05). P= Valor de significancia al 95%. CV= Coeficiente de variación.

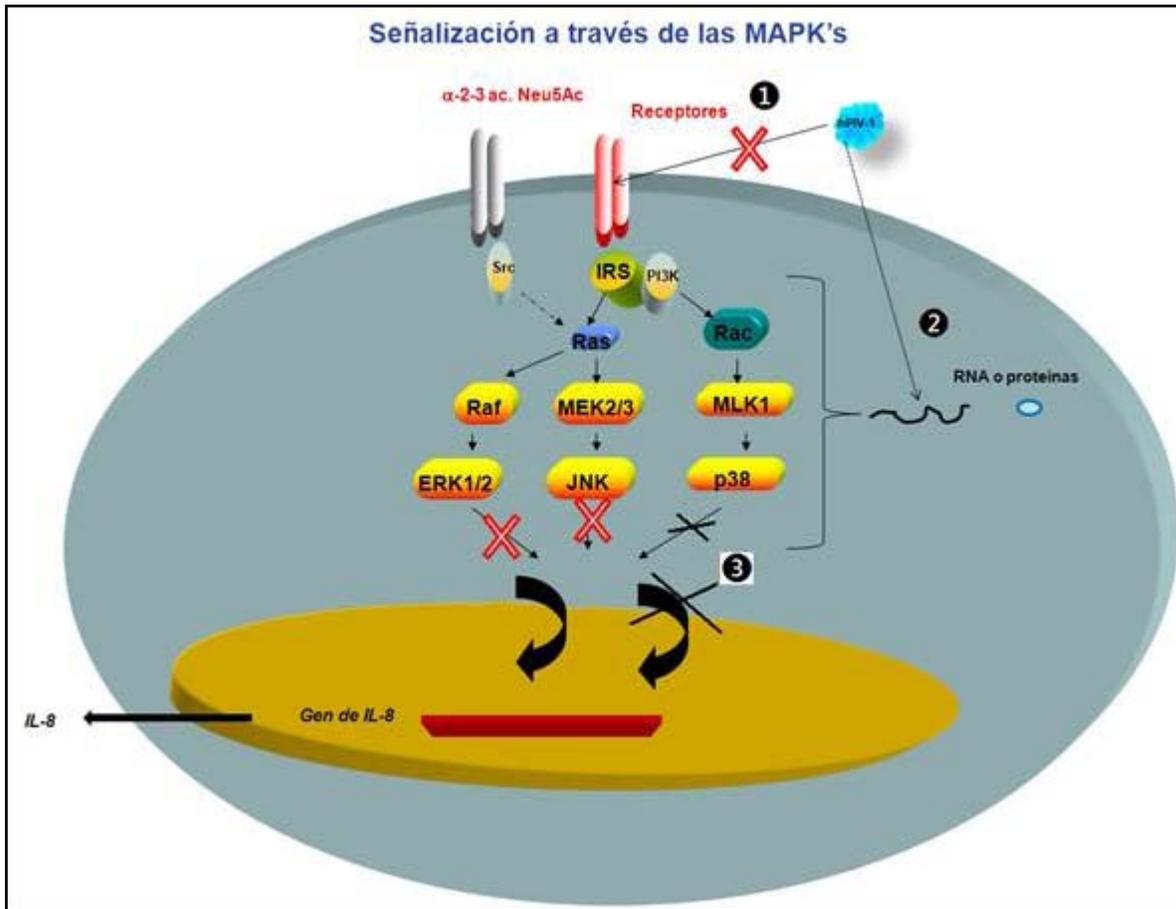


Figura 17. Esquema de la activación de p38 para la secreción de IL-8 en la infección con hPIV-1 vivo. La activación de la vía de las MAPKs no se lleva a cabo con la unión a su receptor **1**, Mientras que, cuando el virus se replica, hay secreción de IL-8, aunque se desconoce si el RNA viral o alguna proteína del virus activa alguna proteína de la vía o algún sensor viral **2**. Tras la inhibición de las cinasas ERK, JNK, IL-8 se siguió secretando. Y solo cuando p38 fue inhibida dejó de secretarse **3**.



VI. DISCUSIÓN

En el presente estudio se utilizó un modelo de infección con hPIV-1 a diferentes tiempos *in vitro* con dos líneas de células epiteliales para determinar si se producía un aumento de la secreción de la IL-8. Nuestro ensayo mostró que la secreción de IL-8 aumentó gradualmente durante los tiempos evaluados en ambas líneas celulares. Estos resultados son consistentes con los reportados para otros virus respiratorios, incluyendo el virus de Influenza A (H3N2) y VSR, que inducen la secreción de IL-8 en células epiteliales bronquiales (104, 105).

Se sabe que la IL-8 es responsable del reclutamiento de neutrófilos y macrófagos, y que realiza otras funciones tales como la adhesión y degranulación además, se ha encontrado en los infiltrados inflamatorios de pulmón y laringe de humanos. Estudios realizados con diferentes virus han revelado que las células epiteliales infectadas con virus específicos liberan IL-8 sin necesidad de la replicación viral, como ocurre en las infecciones por VSR (14, 106). El contacto con el receptor celular es suficiente para desencadenar la secreción de IL-8, mientras que otros virus sólo promueven la síntesis de IL-8 durante la replicación (18, 107). En este estudio se llevaron a cabo ensayos usando tanto con hPIV-1 activo (viable) como inactivo, para determinar si la replicación era necesaria para inducir la secreción de IL-8 o si era independiente como sucede con el VSR que pertenece a la misma familia. Los resultados indican que el contacto entre el virus y la célula diana es insuficiente para inducir la secreción de IL-8, incluso cuando la actividad de hemaglutinación está presente con el virus inactivado, lo que sugiere que la



replicación del virus es necesaria para la secreción de IL-8 como ocurre en las infecciones con Rhinovirus.

Trabajos previos han demostrado que, en la secreción de IL-8 está implicada la activación de la vía de las MAPKs (8, 108). Estas cinasas responden a diferentes ligandos y estímulos y están implicadas en la señalización y en procesos celulares, tales como la proliferación, la diferenciación, la inflamación, la respuesta inmune y la apoptosis.

En la infección con hPIV-1, la vía de JNK/SAPK a las 12 h de infección no se fosforila por lo que, se cree que no interviene en la secreción de IL-8 mientras que, p38 y ERK son fosforiladas cuando IL-8 está presente en el sobrenadante después de la infección. Por lo tanto, para definir que cinasa se requiere para la secreción de la IL-8, se realizaron ensayos con inhibidores específicos para cada cinasa mostrando que incluso en la presencia de inhibidores específicos para ERK y JNK/SAPK, la IL-8 fue todavía secretada, pero no hubo secreción cuando se utilizó el inhibidor para p38. En este caso, se observó una supresión completa de la secreción de IL-8, lo que sugiere que la MAPK p38 es la vía a través de la cual el hPIV-1 induce la secreción de IL-8.

Los paramyxovirus tienen dos glicoproteínas que son importantes durante la infección. La glicoproteína de unión al receptor HN en los virus parainfluenza y virus de la parotiditis, H para el virus del sarampión y G en neumovirus (VSR y metapneumovirus). La segunda glicoproteína es la proteína de fusión (F), que cataliza la fusión de membranas (viral y celular). Se ha sugerido que las glicoproteínas HN forman un complejo que se inicia con la unión y activación de la proteína de fusión, la cual actúa de inmediato de tal manera que el virus puede



entrar en la célula. Sin embargo, hay que señalar que la glicoproteína HN actúa como hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) en estos virus, la unión a moléculas de ácido siálico a través de su actividad de HA y la mediación de la escisión enzimática del ácido siálico promueven la fusión a través de su actividad de la neuraminidasa. Esta doble actividad sugiere que sean co-expresadas HN y F formando un complejo. La glicoproteína H de morbillivirus sólo tiene actividad de hemaglutinina y la glicoproteína G no tiene ninguna de estas dos actividades. Por lo tanto, estas glicoproteínas presentan diferencias significativas. Tales diferencias están probablemente relacionadas con las vías de señalización que se activan cuando los virus interactúan con la célula del hospedero. Aunque el hPIV-1 y VSR pertenecen a la misma familia, los dos virus tienen diferentes glicoproteínas, lo que puede explicar por qué el VSR utiliza la cinasa ERK (cinasa de receptores extracelulares) y hPIV-1 utiliza la cinasa p38. Tras la unión a su receptor celular, el VSR activa el estímulo extracelular que se transmite a ERK y de ahí al núcleo para activar la expresión de diversos genes implicados en una actividad biológica dada. El virus activa estas vías de acuerdo con la co-evolución del complejo parásito-hospedador y, es probable, que el virus también pueda tomar ventaja de la activación de la vía para proporcionar un medio ambiente mejor y por lo tanto lleve a cabo libremente la replicación. Virus, tales como virus del herpes (¹⁰⁸), virus de la hepatitis B (¹⁰⁹), el VIH, el virus de la influenza (¹⁰⁴), virus Coxsackie y el virus vaccinia entre otros, activan la vía de las MAPKs en particular en las primeras etapas de la infección. En este estudio, se encontró que las MAPK se activan durante las primeras etapas de la infección (60 min post-infección). Es posible que la activación de la vía de la cinasa p38 posterior a la infección del hPIV-1 juegue



un papel igualmente esencial durante otras etapas de la infección. Es importante destacar que el estímulo por hPIV-1 aumentó y se mantuvo hasta 24 h, incluso cuando el efecto citopático era claramente visible en al menos el 90 % de las células del cultivo. Varios autores han afirmado que la activación de la cinasa podría ser un requisito para la regulación de señalización asociada con diferentes funciones biológicas durante la infección con otros virus (16). Por ejemplo, los primeros eventos durante la infección de VIH-1 dependen de la vía MAPK/ERK, lo que mejora la infectividad viral (110). El mecanismo por el cual hPIV-1 estimula la activación de p38 debe investigarse más a fondo. Quizá los hallazgos encontrados por Melchjorsen J. et al en 2005 (111) y Kitagawa Y. et al en 2013 (112) donde describen que células no inmunológicas (células A549), a través de la helicasa RIG-I (gen I inducible el ácido retinóico) y la proteína 5 asociada a la diferenciación del melanoma (MDA5) están involucradas en el reconocimiento de RNA de cadena sencilla de los virus vivos (y no así de los tratados con UV) Sendai y parainfluenza tipo 2 que activan la secreción de diferentes citocinas. Sin embargo, un producto de cualquiera de los genes del virus puede estar involucrado en el proceso, teniendo en cuenta que no hay activación de la cinasa, tras lo observado cuando hPIV-1 fue inactivado con rayos UV. Además, es posible que las MAPKs también influyan en la replicación del virus y en la promoción de la síntesis de algunas proteínas necesarias para el virus. La infección del hPIV-1 causa inflamación de la laringe y la tráquea en el croup en los niños. Los niños con croup son admitidos regularmente en la sala de emergencia con su vida en peligro debido al cierre de las vías respiratorias. Actualmente, el tratamiento para los pacientes con croup moderado a grave es la dexametasona oral a 0,6 mg/kg de



dosis (máximo 10-12 mg), que actúa sobre diferentes tipos de células involucradas en la respuesta inmune (113). Sin embargo, los datos muestran que los inhibidores de MAPK p38 pueden revertir la insensibilidad de glucocorticoides y tener efectos beneficiosos sobre las concentraciones de glucocorticoides en los pacientes con asma así como en la inflamación de las vías respiratorias, además de su papel como un sustituto en el tratamiento (114).

Una mejor comprensión de la patogénesis del hPIV-1 guiará el diseño de estrategias y terapias que permitan la inhibición del reclutamiento celular excesivo por aumento de síntesis de la IL-8 y con ello reducir el proceso inflamatorio no controlado. Por ahora, el mecanismo exacto en los procesos inflamatorios e inmunes se debe definir y se requiere más investigación para entender si estas vías son importantes para la patogénesis del HVIP-1.



VII. CONCLUSIÓN

Un modelo *in vitro* con dos líneas celulares infectadas con el hPIV-1 en diferentes puntos de tiempo fue utilizado para determinar si se produce un aumento de la secreción de la IL-8. Los resultados mostraron que la secreción de la IL-8 aumentó gradualmente durante los puntos de tiempo evaluados, requiriéndose la replicación viral para la secreción de la IL-8.

Además se encontró que las MAPKs se activan durante las primeras etapas de la infección. No se observó la activación de la cinasa cuando los virus fueron inactivados, lo que sugiere que algún producto de los genes del virus puede estar implicado en el proceso.

Cuando se usó el inhibidor de p38, la secreción de IL-8 disminuyó, lo que sugiere que hPIV-1 induce la secreción de IL-8 a través de p38. Además, es posible que las MAPKs también afecten la replicación del virus y la promoción de la síntesis de algunas proteínas necesarias para el virus.

Se necesitan más estudios para comprender si estas vías son importantes para la patogénesis del hPIV-1, con el fin de desarrollar estrategias y terapias que permitan inhibir la excesiva secreción de IL-8 para reducir el proceso inflamatorio no controlado.



VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schomacker H, Schaap-Nutt A, Collins PL, Schmidt AC. Pathogenesis of acute respiratory illness caused by human parainfluenza viruses. *Curr Opin Virol.* 2012; 2: 294-9.
2. Counihan ME, Shay DK, Holman RC, Lowther SA, Anderson LJ. Human parainfluenza virus-associated hospitalizations among children less than five years of age in the United States. *Pediatr Infect Dis J.* 2001; 20:646-53.
3. Marx A, Torok TJ, Holman RC, Clarke MJ, Anderson LJ. Pediatric hospitalizations for croup (laryngotracheobronchitis): biennial increases associated with human parainfluenza virus 1 epidemics. *J Infect Dis.* 1997; 176: 423-7.
4. Counihan ME, Shay DK, Holman RC, Lowther SA, Anderson LJ. Human parainfluenza virus-associated hospitalizations among children less than five years of age in the United States. *Pediatr Infect Dis J.* 2001; 20: 646-53.
5. Bermejo-Martin JF, Bernardo D, Dominguez-Gil M, Alonso A, Garcia-Arevalo MC, Pino M, de Lejarazu RO, Eiros JM, Ardura J, León AJ, Garrote JA, Resino S, Blanco-Quiros A, Muñoz-Fernández MA, Arranz E. Interleukin (IL)-1 β , IL-6 and IL-8 in nasal secretions: a common role for innate immunity in viral bronchial infection in infants. *Br J Biomed Sci.* 2006; 63: 173-5.
6. Garofalo R, Sabry M, Jamaluddin M, Yu RK, Casola A, Ogra PL, Brasier AR. Transcriptional activation of the interleukin-8 gene by respiratory syncytial virus infection in alveolar epithelial cells: nuclear translocation of the RelA



- transcription factor as a mechanism producing airway mucosal inflammation. *J Virol.* 1996; 70: 8773–81.
7. Bischoff DS, Zhu JH, Makhijani NS, Yamaguchi DT. Acidic pH stimulates the production of the angiogenic CXC chemokine, CXCL8 (interleukin-8), in human adult mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and NF-kappaB pathways. *J Cell Biochem.* 2008; 104:1378-92.
 8. Norzila MZ, Fakes K, Henry RL, Simpson J, Gibson PG. Interleukin-8 secretion and neutrophil recruitment accompanies induced sputum eosinophil activation in children with acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161: 769-74.
 9. Wendel M, Giebmann U, Behrend P, Augstein A, Koslowski R, Haufe D, Kasper M, Koch T. Inflammatory-activated microvascular endothelial cells regulate interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression of A549 cells in a paracrine fashion. *Exp Lung Res.* 2008; 34:85-100.
 10. Bennett BL, Garofalo RP, Cron SG, Hosakote YM, Atmar RL, Macias CG, Piedra PA. Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2007; 195: 1532-40.
 11. Kanig B, Krusat T, Streckertv HJ, Konig W. IL-8 release from human neutrophils by the respiratory syncytial virus is independent of viral replication. *Journal of Leukocyte Biology.* 1996; 60: 253-60.
 12. Jijon HB, Panenka WJ, Madsen KL, Parsons HG. MAP kinases contribute to IL-8 secretion by intestinal epithelial cells via a posttranscriptional mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 283: C31–C41.



13. König B1, Krusat T, Streckert HJ, König W. IL-8 release from human neutrophils by the respiratory syncytial virus is independent of viral replication. *J Leukoc Biol.* 1996; 60: 253-60.
14. Desloges N, Schubert C, Wolff MH, Rahaus M. Varicella-zoster virus infection induces the secretion of interleukin-8. *Med Microbiol Immunol.* 2008; 197: 277-84.
15. Rahaus M1, Desloges N, Wolff MH. Replication of varicella-zoster virus is influenced by the levels of JNK/SAPK and p38/MAPK activation. *J Gen Virol.* 2004; 85: 3529-40.
16. Andrade A, Silva PN, Pereira AC, De Sous L. The vaccinia virus-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is required for virus multiplication. *J Biochem.* 2004; 381: 437-46.
17. Johnston SL, Papi A, Monick MM, Hunninghake GW. Rhinoviruses induce interleukin-8 mRNA and protein production in human monocytes. *J Infect Dis.* 1997; 175: 323-9.
18. Johnston SL, Papi A, Bates PJ, Mastronarde JG, Monick MM, Hunninghake GW. Low-grade rhinovirus infection induces a prolonged release of IL-8 in pulmonary epithelium. *J Immunol.* 1998; 160: 6172-81.
19. Ströher U, West E, Bugany H, Klenk HD, Schnittler HJ, Feldmann H. Infection and activation of monocytes by Marburg and Ebola viruses. *J Virol.* 2001; 75: 11025-33.
20. Lukashevich IS, Maryankova R, Vladyko AS, Nashkevich N, Koleda S, Djavani M, Horejsh D, Voitenok NN, Salvato MS. Lassa and Mopeia virus replication in



- human monocytes/macrophages and in endothelial cells: different effects on IL-8 and TNF-alpha gene expression. *J Med Virol.* 1999; 59: 552-60.
21. Booth JL, Coggeshall KM, Gordon BE, Metcalf JP. Adenovirus type 7 induces interleukin-8 in a lung slice model and requires activation of Erk. *J Virol.* 2004; 78: 4156-64.
22. Sasakawa A1, Hirase C, Yamaguchi T, Morita Y, Miyatake J, Matsumura I, Maeda Y. Interleukin-8 in the pathogenesis of primary central nervous system lymphoma in association with HIV infection. *Hematology.* 2012; 17: 144-50.
23. D'Aversa TG, Eugenin EA, Berman JW. CD40-CD40 ligand interactions in human microglia induce CXCL8 (interleukin-8) secretion by a mechanism dependent on activation of ERK1/2 and nuclear translocation of nuclear factor-kappaB (NFkappaB) and activator protein-1 (AP-1). *J. Neurosci Res.* 2008; 86: 630-39.
24. Rajaiya J, Xiao J, Rajala R, Chodosh J. Human adenovirus type 19 infection of corneal cells induces p38 MAPK-dependent interleukin-8 expression. *Virol J.* 2008; 5: 1-17.
25. Sumbayevy VV, Yasinska IM. Role of MAP Kinase-Dependent Apoptotic Pathway in Innate Immune Responses and Viral Infection. *J of Immunol.* 2006; 63: 391–400.
26. Nelson JD. Pleural empyema. *Pediatr Infec Dis* 1985; 4: S31-3
27. *Enfermedades respiratorias Pediátricas.* Mexico D.F. (Mexico): Mc Graw Hill Interamericana; 2003. p. 216-219.
28. Maton, Anthea; Jean, Hopkins Susan, Johnson Charles William, McLaughlin Maryanna Quon Warner David, LaHart Wright, Jill (2010). *Human Biology and*



- Health. Englewood Cliffs: Prentice Hall. pp. 108–118. IJump up West, John B. Respiratory physiology- the essentials. Baltimore: Williams & Wilkins. Pp. 1–10.
29. Brook I. Microbiology of empyema in children and adolescent. *Pediatrics*. 1990; 85 :722-26
30. Torales TN, González SN. Infección de las vías respiratorias inferiores. En González SN et al. (Eds). *Infectología Clínica Pediátrica*, 6ª edición. México, Trillas, 1997 pp. 193-230.
31. Chanock RM, Murphy BR, Collins PL. Parainfluenza Viruses. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Strauss SE, eds. In *Fields Virology*. 4th ed. Vol 1. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2001:1341-79.
32. Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med*. 2001; 344: 1917-28.
33. Magnusson L. Analysis of the human parainfluenza virus replication promoter. *UW-L J Und Res X*. 2007; 6: 1-4.
34. Kondo K, Bando H, Tsurudome M, Kawano M, Nishio M, Ito Y. Sequence analysis of the phosphoprotein (P) genes of human parainfluenza type 4A and 4B viruses and RNA editing at transcript of the P genes: the number of G residues added is imprecise. *Virology*. 1990; 178: 321-26.
35. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular cell biology*. Viruses: structure, function. 4th. Ed. New York, NY: Freeman; 2001: pp.1084.
36. Latorre P, Kolakofsky D, Curran J. Sendai virus Y proteins are initiated by a ribosomal shunt. *Mol Cell Biol*. 1998; 18: 5021-31.
37. Henrickson KJ. Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16: 242-64.



38. Matsuoka Y, Curran J, Pelet T, Kolakofsky D, Ray R, Compans RW. The P gene of human parainfluenza virus type 1 encodes P and C proteins but not a cysteine-rich V protein. *J. Virol.* 1991; 65: 3406-10.
39. Ah-Tye, C, Schwartz S, Huberman K, Carlin E, Moscona A. Virus-receptor interactions of human parainfluenza viruses types 1, 2, and 3. *Microb. Pathog.* 1999; 27: 329-36.
40. Henrickson KJ, Savatski L. Antigenic structure, function, and evolution of the hemagglutinin-neuraminidase protein of human parainfluenza virus type 1. *J Infect Dis.* 1997; 176: 867-75.
41. Andrus L, Marukian S, Jones CT, Catanese MT, Sheahan TP, Schoggins JW, Barry WT, Dustin LB, Trehan K, Ploss A, Bhatia SN, Rice CM. Expression of paramyxovirus V proteins promotes replication and spread of hepatitis C virus in cultures of primary human fetal liver cells. *Hepatology.* 2011; 54: 1901-12.
42. Henrickson KJ, Kuhn SM, Savatski L, Sedmak J. Recovery of human parainfluenza virus types one and two. *J Virol Methods.* 1994; 46: 189-06.
43. Kawano M1, Kaito M, Kozuka Y, Komada H, Noda N, Nanba K, Tsurudome M, Ito M, Nishio M, Ito Y. Recovery of infectious human parainfluenza type 2 virus from cDNA clones and properties of the defective virus without V-specific cysteine-rich domain. *Virol.* 2001; 284: 99-12.
44. Gotoh B, Komatsu T, Takeuchi K, Yokoo J. Paramyxovirus strategies for evading the interferon response. *Rev Med Virol.* 2002; 12: 337-57.
45. Gotoh B, Komatsu T, Takeuchi K, Yokoo J. Paramyxovirus accessory proteins as interferon antagonists. *Microbiol. Immunol.* 2001; 45: 787-00.



46. Andrejeva J, Young DF, Goodbourn S, Randall RE. Degradation of STAT1 and STAT2 by the V proteins of simian virus 5 and human parainfluenza virus type 2, respectively: consequences for virus replication in the presence of alpha/beta and gamma interferons. *J Virol.* 2002; 76: 2159-67.
47. Kusel MM, de Klerk NH, Holt PG, Keadze T, Johnston SL, Sly PD. Role of respiratory viruses in acute upper and lower respiratory tract illness in the first year of life: a birth cohort study. *Pediatr Infect Dis J.* 2006; 25: 680-6.
48. Pierangeli A, Gentile M, Di Marco P, Pagnotti P, Scagnolari C, Trombetti S, Lo Russo L, Tromba V, Moretti C, Midulla F, Antonelli G. Detection and typing by molecular techniques of respiratory viruses in children hospitalized for acute respiratory infection in Rome, Italy. *J Med Virol.* 2007; 79: 463-8.
49. Karron RA, Collins P. L. "Parainfluenza viruses," in *Fields Virology Vol. 5 1st Edn.* Knipe M, Howley PM, editors. (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins) 2007; 1497–1526.
50. Reed G, Jewett PH, Thompson J, Tollefson S, Wright PF. Epidemiology and clinical impact of parainfluenza virus infections in otherwise healthy infants and young children <5 years old. *J Infect Dis.* 1997; 175: 807–13.
51. Lamb RA, Paterson RG, Jardetzky TS. Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures. *Virology.* 2006; 344: 30-7.
52. Borraz-Argüello MT, Hernández J, Ramírez-Mendoza H, Reyes-Leyva J, Santos-López G, Vallejo V. Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del Rubulavirus porcino. *Archivos de medicina veterinaria.* 2004; 36: 119-36.



53. Berman S. Epidemiology of acute respiratory infections in children of developing countries. *Rev Infect Dis.* 1999; 13:S454-S462.
54. Murphy B, Phelan PD, Jack I, Uren E. Seasonal pattern in childhood viral lower respiratory tract infections in Melbourne. *Med J Aust.* 1980; 12: 22-4.
55. Frost HM, Robinson CC, Dominguez SR. Epidemiology and clinical presentation of parainfluenza type 4 in children: a 3-year comparative study to parainfluenza types 1-3. *J Infect Dis.* 2014; 209: 695-02.
56. Lucas JR1, Haas EA, Masoumi H, Krous HF. Sudden death in a toddler with laryngotracheitis caused by human parainfluenza virus-1. *Pediatr Dev Pathol.* 2009; 12: 165-8.
57. Fry AM, Curns AT, Harbour K, Hutwagner L, Holman RC, Anderson LJ. Seasonal trends of human parainfluenza viral infections: United States, 1990-2004. *Clin Infect Dis.* 2006; 43: 1016-22.
58. Malhotra A, Krilov LR. Viral Croup. *Pediatrics in Review.* 2001; 22: 5-12.
59. Cressman WR, Myer CM. Diagnosis and Management of Croup and Epiglottitis. *Pediatr Clin North Am.* 1994; 41: 265–76.
60. Bradshaw RA, Dennis EA. Intercellular Signaling in Development and Disease. Academic Press is an imprint of Elsevier. Capítulo 17. First edition 2011; pp: 177-182.
61. Williams AE. Immunology Mucosal and Body Surface Defences. By John Wiley & Sons, Ltd, Wiley-Blackwell. Capítulo 6 y 11. First edition 2012; pp: 111-132 y 217-237.
62. Young M. Endothelial cells in the eyes of an immunologist. *Cancer Immunol Immunother.* 2012; 61: 1609-16.



63. Goodbourn, S, Didcock L, Randall RE. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol.* 2000; 81: 2341-64.
64. Weber F, Kochs G, Haller O. Inverse interference: how viruses fight the interferon system. *Viral Immunol.* 2004; 17: 498-15.
65. Kohlmeier JE, Woodland DL. Immunity to respiratory viruses. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27:61-82.
66. Suárez A, Mozo L, Gutiérrez Martín C. www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/etexto09.htm
67. Steinke JW, Borish L. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117: 441-5.
68. Moser B, Willmann K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63 Suppl 2: ii84-ii89.
69. Rollins BJ. Chemokines *Blood.* 1997; 90: 909-28.
70. Baldwin ET, Weber IT, St Charles R, Xuan JC, Appella E, Yamada M, Matsushima K, Edwards BF, Clore GM, Gronenborn AM, et al. Crystal structure of interleukin 8: symbiosis of NMR and crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88: 502-6.
71. Wolff B, Burns AR, Middleton J, Rot A. "Endothelial cell "memory" of inflammatory stimulation: human venular endothelial cells store interleukin 8 in Weibel-Palade bodies". *J Exp Med.* 1998; 188: 1757-62.
72. Modi WS, Dean M, Seunanz HN, Mukaida N, Matsushima K, O'Brien SJ. "Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF/IL-8) resides in a



- gene cluster along with several other members of the platelet factor 4 gene superfamily". *Hum Genet.* 1990; 84: 185–7.
73. Siddiqui RA1, Akard LP, Garcia JG, Cui Y, English D. Chemotactic migration triggers IL-8 generation in neutrophilic leukocytes. *J Immunol.* 1999; 162: 1077-83.
74. Koch AE1, Volin MV, Woods JM, Kunkel SL, Connors MA, Harlow LA, Woodruff DC, Burdick MD, Strieter RM. Regulation of angiogenesis by the C-X-C chemokines interleukin-8 and epithelial neutrophil activating peptide 78 in the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 31-40.
75. Ben-Baruch A, Michiel DF, Oppenheim JJ. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J Biol Chem.* 1995; 270: 11703-6.
76. Baggiolini M1, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15: 675-05.
77. Bozic CR1, Gerard NP, Gerard C. Receptor binding specificity and pulmonary gene expression of the neutrophil-activating peptide ENA-78. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996; 14: 302-8.
78. Ahuja SK1, Lee JC, Murphy PM. CXC chemokines bind to unique sets of selectivity determinants that can function independently and are broadly distributed on multiple domains of human interleukin-8 receptor B. Determinants of high affinity binding and receptor activation are distinct. *J Biol Chem.* 1996; 271: 225-32.
79. Katancik JA, Sharma A, de Nardin E. Interleukin 8, neutrophil-activating peptide-2 and GRO-alpha bind to and elicit cell activation via specific and different amino acid residues of CXCR2. *Cytokine.* 2000; 12: 1480-8.



80. Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, Maysushima K, Murphy P, Nomiyama H, Oppenheim J, Rot A, Schall T, Tsang M, Thorpe R, Van Damme J, Wadhwa M, Yoshie O, Zlotnik A, Zoon K; IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res.* 2002; 22: 1067-8.
81. Pichert A, Schlorke D, Franz S, Arnhold J. Functional aspects of the interaction between interleukin-8 and sulfated glycosaminoglycans. *Biomatter.* 2012; 2: 142-8.
82. Wang SZ, Forsyth KD. The interaction of neutrophils with respiratory epithelial cells in viral infection. *Respirology.* 2000; 5: 1-10.
83. Muller WA. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab Invest.* 2002; 82: 521-33.
84. Burrows SD, Doyle ML, Murphy KP, Franklin SG, White JR, Brooks I, et al. Determination of the monomer-dimer equilibrium of interleukin-8 reveals it is a monomer at physiological concentrations. *Biochemistry.* 1994; 33: 12741-5.
85. Padrines M, Wolf M, Walz A, Baggiolini M. Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3. *FEBS Lett* 1994; 352: 231-5.
86. Köhidai L, Csaba G. Chemotaxis and chemotactic selection induced with cytokines (IL-8, RANTES and TNF-alpha) in the unicellular *Tetrahymena pyriformis*. *Cytokine.* 1998; 10: 481-6.
87. Robinson MJ1, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1997; 9: 180-6.



88. Ouaked F1, Rozhon W, Lecourieux D, Hirt H. A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO J.* 2003; 22: 1282-8.
89. Davis, RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 1993; 268:14553-556.
90. Schaeffer HJ1, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol.* 1999; 19: 2435-44.
91. Silvers AL, Bachelor MA, Bowden GT. The role of JNK and p38 MAPK activities in UVA-induced signaling pathways leading to AP-1 activation and c-Fos expression. *Neoplasia.* 2003; 5: 319-29.
92. Cowan KJ, Storey KB. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol.* 2003; 206: 1107-15.
93. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 2001; 81: 807-69.
94. Loeser RF, Erickson EA, Long DL. Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2008; 20: 581-6.
95. Cabello C, Manjarrez ME, Olvera R, Villalba J, Valle L, Páramo I. *Mem Inst O Cruz.* 2006; 101: 21- 24.
96. Fry AM, Curns AT, Harbour K, Hutwagner L, Holman RC, Anderson LJ. Seasonal trends of human parainfluenza viral infections: United States, 1990-2004. *Clin Infect Dis.* 2006; 43: 1016-22.



97. Wahid R, Cannon MJ, Chow M. Virus-specific CD4+ and CD8+ cytotoxic T-cell responses and long-term T-cell memory in individuals vaccinated against polio. *J Virol.* 2005; 79: 5988-95.
98. Clarke DH, Casals J, Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg.* 1958; 7: 561-73.
99. Trybala E, Svennerholm B, Bergström T, Olofsson S, Jeansson S, Goodman JL. Herpes simplex virus type 1-induced hemagglutination: glycoprotein C mediates virus binding to erythrocyte surface heparansulfate. *J Virol.* 1993; 67: 1278-85.
100. Wiriyarat W, Lerdsamran H, Pooruk P, Webster RG, Louisirootchanaikul S, Ratanakorn P, Chaichoune K, Nateerom K, Puthavathana P. Erythrocyte binding preference of 16 subtypes of low pathogenic avian influenza and 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses. *Vet Microbiol.* 2010; 146: 346-49.
101. Kittigul L, Suthachana S, Kittigul C, Pengruangrojanachai V. Immunoglobulin M capture biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 59: 352-56.
102. Zhu YM, Webster SJ, Flower D, Woll PJ. "Interleukin-8/CXCL8 is a growth factor for human lung cancer cells. *Br J Cancer.* 2004; 11; 1970–76.
103. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-85.
104. Matsukura S, Kokubu F, Noda H, Tokunaga H, Adachi M. Expression of IL-6, IL-8, and RANTES on human bronchial epithelial cells, NCI-H292, induced by influenza virus A. *J Allergy Clin Immunol.* 1996; 98: 1080-87.



105. Chen W, Monick MM, Carter AB, Hunninghake GW. Activation of ERK2 by respiratory syncytial virus in A549 cells is linked to the production of interleukin 8. *Exp Lung Res.* 2000; 26: 13-26.
106. Arnold R, Humbert B, Werchau H, Gallati H, König W. Interleukin-8, interleukin-6, and soluble tumour necrosis factor receptor type I release from a human pulmonary epithelial cell line (A549) exposed to respiratory syncytial virus. *Immunology.* 1994; 82: 126-33.
107. Hall DJ, Bates ME, Guar L, Cronan M, Korpi N, Bertics PJ. The role of p38 MAPK in rhinovirus-induced monocyte chemoattractant protein-1 production by monocytic-lineage cells. *J Immunol.* 2005; 174: 8056-63.
108. Li X1, Liang D, Lin X, Robertson ES, Lan K. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded latency-associated nuclear antigen reduces interleukin-8 expression in endothelial cells and impairs neutrophil chemotaxis by degrading nuclear p65. *J Virol.* 2011; 85: 8606-15.
109. Parhar K1, Ray A, Steinbrecher U, Nelson C, Salh B. The p38 mitogen-activated protein kinase regulates interleukin-1beta-induced IL-8 expression via an effect on the IL-8 promoter in intestinal epithelial cells. *Immunology* 2003; 108: 502-12.
110. Yang X, Chen Y, Gabuzda D. ERK MAP kinase links cytokine signals to activation of latent HIV-1 infection by stimulating a cooperative interaction of AP-1 and NF-kappaB. *J Biol Chem.* 1999; 274: 27981-8.
111. Melchjorsen J, Jensen SB, Malmgaard L, Rasmussen SB, Weber F, Bowie AG, Matikainen S, Paludan SR. Activation of innate defense against a



- paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner. *J Virol* 2005; 79:12944-51.
112. Kitagawa Y, Yamaguchi M, Zhou M, Nishio M, Itoh M, Gotoh B. Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits TRAF6-mediated ubiquitination of IRF7 to prevent TLR7- and TLR9-dependent interferon induction. *J Virol* 2013; 87:7966-76.
113. Rittichier KK. The role of corticosteroids in the treatment of croup. *Treat Respir Med* 2004; 3: 139-52.
114. Irusen NE, Matthews JG, Takahashi A, Barnes PJ, Chung KF, Adcock IM. p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 649-57.