



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS.

FACULTAD DE MEDICINA.

**“Efecto de la Infección Neonatal por el RSV en la Inflamación Pulmonar Generada  
con OVA”**

Tesis para optar por el grado de:

Doctor en Ciencias

**Presenta:**

M. C. S. Andreu Comas García

**Tutor principal:**

Dr. José Ramos Castañeda

Instituto Nacional de Salud Pública.

**Comité tutorial:**

Dr. Eduardo A. García Zepeda

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Enrique Espinosa Arciniega.

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Agradecimientos académicos**

La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca doctoral número 244009. Así mismo, el este proyecto fue financiado mediante los proyectos #1129497 (JRC) y #167913 (EGZ) financiados por CONACyT.

## **Agradecimientos personales**

*Agradezco a Lucía quien me ha acompañado de la mano durante este largo y muchas veces pesado camino. Nunca me dejaste tirar la toalla, y cada vez que perdía el rumbo ahí estabas para guiarme.*

*A mis padres y hermano, por el apoyo y el ejemplo que me han dado desde que tengo memoria. Su palabras, su cariño, sus críticas y bromas, hacen que la vida se más hermosa.*

*A mis abuelos (Josep, Engracia, José Manuel, Amparo, Olga y Luis) quienes me pusieron una estándar que cumplir y superar. Sin dudarlo su historia de lucha y coraje es una de las inspiraciones más fuertes que me mueven. Ustedes me enseñaron que todos los días tengo que trabajar para regresarle a México un poco de lo mucho que a ustedes les dio.*

*A Daniel Noyola, por haberme mostrado mi vocación.*

*A José Campos, por ser un ejemplo de éxito.*

*A José Ramos, por darme las herramientas y la calidad que se requiere para trabajar y avanzar.*

*A Eduardo García y Enrique Espinosa, gracias por haber aceptado ser parte de mi formación.*

*Gracias a Edna, Ruth, Yvonne, Karla y Jorge por haber formado parte de mi vida.*

*Pero sobre todo a Santiago, por ti trato de hacer mejor las cosas cada día.*

## Índice.

1. Resumen	6
2. Abstract	8
3. Antecedentes	
3.1 <i>Epidemiología y relevancia del RSV</i>	11
3.2 <i>Asociación epidemiológica entre infección severa por el RSV y el desarrollo del asma</i>	11
3.3 <i>Principales características del RSV</i>	12
3.4 <i>Respuesta inmune contra el RSV</i>	16
3.5 <i>Efecto de la edad de infección a la cual ocurre la infección en la respuesta inmune contra el RSV</i>	18
3.6 <i>Efecto de la infección por el RSV sobre la inflamación pulmonar inducida por OVA</i>	18
4. Justificación	21
5. Pregunta de investigación	23
6. Hipótesis	23
7. Objetivo general	23
8. Objetivos particulares	23
9. Materiales y métodos	24
10. Resultados	
10.1 <i>Infección de ratones neonatos Balb/c con la cepa A2 del RSV</i>	34
10.2 <i>Análisis histopatológico del proceso inflamatorio pulmonar</i>	40
10.3 <i>Análisis de la subpoblación de células <math>T CD4^+ CD25^+</math> y <math>T CD4^+ CD25^+ FoxP3^+</math> en tejido pulmonar</i>	44
10.4 <i>Análisis de la población de linfocitos <math>T CD4^+ CD25^+</math> y <math>T CD4^+ CD25^+ FoxP3^+</math> en BAL</i>	46
10.5 <i>Análisis de la expresión relativa de mRNA en pulmón</i>	49
10.6 <i>Análisis de las concentraciones IL-4, IL-12p40 y CCL5 en BAL y suero</i>	52
10.7 <i>Análisis de la población de linfocitos <math>T CD4^+ CD25^+</math> y <math>T CD4^+ CD25^+ FoxP3^+</math> en ganglios torácicos</i>	55

11. Discusión	58
12. Conclusiones	67
13. Bibliografía	68
14. Anexos	
14.1 <i>Anexo I. Propagación y amplificación del stock viral.</i>	77
14.2 <i>Anexo II. Protocolo de plaqueo para el RSV.</i>	78
15. Productividad científica durante el doctorado	82
16. Artículo original	83

## 1. Resumen

El virus Sincicial Respiratorio es el principal agente etiológico de las infecciones del tracto respiratorio inferior en niños <5 años de vida. Una característica de esta infección, es que el 40% de niños hospitalizados por este virus desarrollarán asma.

Aunque los ratones Balb/c adultos son el modelo animal más empleado que se ha utilizado para evaluar tanto la infección por el RSV como el proceso de inflamación alérgica de la vía. Recientemente se ha propuesto que la respuesta inmune generada contra el RSV en ratones de <1 semana de vida asemeja de mejor manera a la respuesta inmune de los niños con infección severa por el RSV.

El principal objetivo de este trabajo fue el determinar si la infección neonatal por el RSV modifico tanto la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> como el proceso de inflamación pulmonar aguda generada con OVA. Las características del modelo de alergenización respiratoria fueron la presencia de infiltrado inflamatorio pulmonar, incremento en el depósito de colágena peribronquial; incremento en el número de células en el BAL; incremento en la expresión de citocinas tipo Th1, e incremento las citocinas y quimiocinas de tipo Th2 en el tejido pulmonar de los ratones alergenizados con OVA.

En comparación con los ratones solo alergenizados, en los ratones infectados/alergenizados observamos una atenuación del proceso inflamatorio pulmonar. Las principales diferencias entre ambos grupos fueron: 1) atenuación del infiltrado inflamatorio pulmonar; 2) reducción del porcentaje de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> en el la vía aérea; 3) excepto el mRNA de IL-10, la expresión relativa de todo los mensajeros analizados se encontró significativamente reducida; 4) disminución de la concentración de IL-12p40 en BAL; y 5) incremento de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> en los ganglios linfáticos torácicos.

La atenuación de la inflamación pulmonar generada con OVA, pudiera ser una consecuencia de la disminución de la expresión relativa de IL-12b en la vía aérea. Ya que IL-10 es considerada como una citocina reguladora, es posible que la disminución en la expresión y concentración de IL-12 en los ratones infectados/alergenizados se expliquen por la sobre-expresión pulmonar de IL-10. Finalmente, concluimos que la respuesta inmune

neonatal contra el RSV genera consecuencias de larga duración sobre el microambiente pulmonar.

## 2. Abstract

The Respiratory Syncytial Virus (RSV) is the main etiological agent of lower respiratory tract infections in children under five years of age. This virus has three characteristics which differentiate it from other respiratory viruses: first, the high rate of incidence occurring between 2 and 6 months of age; second, the primary infection age, because this is one of the main factors that determine the type and magnitude of the immune response against the virus, and third, its relationship with asthma, because 40% of children hospitalized for this virus will develop asthma.

For thirty years different experimental models have been used to study the possible mechanisms that participate in the RSV-Asthma interaction. The Adult Balb/c mice animal model is the one that has been used the most to assess RSV infections as well as airway allergic inflammation. However, after comparing the immune response of adult mice with the immune response against RSV of mice less than a week old, it has been proposed that this is more similar to the immune response of children hospitalized for acute RSV infection. On the other hand, when the RSV-Asthma relationship in adult mice has been studied, it has been reported that if the infection occurs during or after the airway sensitization with ovalbumin (OVA), then the infection enhances the lung disease induced by the respiratory allergen. On the contrary, if the infection occurs before the allergenicity process, then the inflammation generated by OVA is not enhanced.

The main goal of this research was to determine if neonatal RSV infection modified the T CD4 lymphocyte population as well as the acute lung inflammation generated by OVA. In order to achieve this, Balb/c mice were infected on their fourth day of life and four weeks later the OVA sensitization process was started. The results obtained from these mice were compared to the ones obtained in three other study groups. The first group was mock-infected and mock-sensitized (SS/SS); the second group was infected and mock-sensitized (RSV/SS), and the third group was mock-infected and sensitized (SS/OVA).

First, we determined that newborn Balb/c mice were permissive to intranasal RSV infection. Then, we determined the main inflammatory characteristics of the OVA sensitization model. The characteristics for this model were: the presence of perivascular

and peribronchial inflammatory infiltrate with an increment of peribronchial collagen deposit; an increment of the total cell number, lymphocytes, granulocytes, and macrophages in the bronchoalveolar lavage; an increment in the Th1-type cytokines expression as well as in the Th2-type chemokines in the pulmonary tissue of OVA sensitized mice.

Compared to the SS/OVA mice, the infected and sensitized mice had a generalized attenuation of the pulmonary inflammatory process. The main differences in both groups were: 1) the attenuation of the magnitude of the pulmonary perivascular and peribronchial inflammatory infiltrate; 2) the reduction of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells percentage present in the pulmonary tissue and BAL; 3) with the exception of the mRNA of IL-10, the relative expression of all the messengers analyzed was significantly reduced, specially the IL-12b, CCL11, CCL24 expression which were reduced 136.8 34.9 and 38.4 times, respectively; 4) less concentration of IL-12p40 in BAL, and 5) the group of mice with the greatest amount and percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells in their thoracic lymph nodes were infected and sensitized.

The reduction of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocyte population in the RSV/OVA mice airway could be a consequence of the reduced relative expression of IL-12b in the pulmonary tissue and IL-12p40 in BAL. Also, because IL-10 is considered a regulatory cytokine with pleiotropic effects in the immune system, it is possible that the reduction of expression and concentration of IL-12 in RSV/OVA mice could be explain by the IL-10 pulmonary over-expression.

It should be mentioned that although seven weeks after having the RSV infection there was a residual pulmonary inflammatory infiltrate, it was not possible to detect the viral genome in both infected groups of mice. Therefore, we consider that the modifications in the type and magnitude of the pulmonary inflammatory response generated by OVA in adult mice is a consequence of the neonatal immune response generated by the RSV.

Finally, we conclude that the neonatal immune response against RSV has long lasting consequences in the pulmonary microenvironment. As part of such consequences, the type

and magnitude of the pulmonary immune response induced by a non-virus related respiratory allergen was modified.

### 3. Antecedentes

#### 3.1 Epidemiología y relevancia del RSV

El virus sincicial respiratorio (RSV) pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae*, género *Pneumovirus*<sup>1</sup>. Desde que fue descubierto hace 60 años, el RSV ha sido considerado como el principal agente etiológico de las infecciones del tracto respiratorio inferior en niños menores de cinco años. El pico de incidencia de la infección ocurre entre los 2 y 6 meses de edad; para los 2 o 3 años de vida casi el 100% de los niños tienen evidencia serológica de infección por el RSV. A nivel mundial, se ha estimado que el RSV genera anualmente 33.8 millones de infecciones respiratorias agudas en niños menores de cinco años, esta cifra representa el 22% de todos los episodios de infecciones respiratorias registradas en el mundo. De todos los niños infectados cada año, aproximadamente 3.4 millones de niños van a requerir de hospitalización<sup>2-6</sup>.

El periodo de incubación del RSV es de aproximadamente de 4 a 5 días. El espectro de la enfermedad causada por este virus es amplio, ya que su única manifestación puede ser fiebre, infección del tracto respiratorio superior sin complicaciones, otitis media, hasta apnea del recién nacido, neumonía, bronquitis o bronquiolitis<sup>7-9</sup>.

Epidemiológicamente la infección por el RSV tiene dos características muy particulares que lo distinguen de otros virus respiratorios. La primera es la alta tasa de reinfecciones durante los primeros cinco años de vida; la segunda, es su asociación con el desarrollo de sibilancias crónicas o la generación de asma. Se calcula que al año posterior a la primera infección por el RSV, el 47% de los niños se van a reinfestar. Un porcentaje similar se reinfestará durante el tercer año de vida. De hecho, un mismo individuo se puede reinfestar en años sucesivos por el mismo subtipo y genotipo del RSV<sup>10</sup>. En el caso de los adultos, la tasa de reinfección es menor que en niños, aún así, esta oscila entre el 5-10% cada año, siendo la población más afectada los trabajadores de la salud<sup>11,12</sup>.

### *3.2 Asociación epidemiológica entre infección severa por el RSV y el desarrollo del asma*

Desde hace 40 años se ha estudiado la asociación epidemiológica entre la hospitalización por el RSV y el desarrollo de sibilancias crónicas o de asma. Aproximadamente el 40% de los niños que durante los primeros dos años de vida se hospitalizan por esta infección desarrollarán asma, sin embargo, la frecuencia del asma asociado al RSV disminuye después de los 10 años de vida y casi desaparece para los 18 años de edad. Cabe mencionar que hasta el momento no se han postulado hipótesis o se ha presentado evidencia que explique por que el asma asociado a la infección por el RSV desaparece a esta edad. Evidencia reciente ha mostrado que la hospitalización por el RSV antes de los dos años de vida, incrementa en 3.84 veces la probabilidad de desarrollar asma <sup>13</sup>.

Para entender los posibles mecanismos de esta asociación epidemiológica se han propuesto cuatro hipótesis. La primer hipótesis propone que la infección por el RSV promueve la sensibilización alérgica de la vía aérea <sup>14-18</sup>. La segunda establece que la infección del tracto respiratorio inferior causada por el RSV afecta el desarrollo funcional de los pulmones <sup>2, 19-27</sup>. La tercer hipótesis sugiere que los niños con infección severa por el RSV generan una respuesta inmune tipo Th2. Esta respuesta no solo sería inefectiva para evitar la replicación del virus, también facilitaría tanto las reinfecciones sintomáticas como el desarrollo de asma <sup>28-31</sup>. La última hipótesis propone que los niños atópicos o hiperreactores bronquiales - quienes eventualmente se volverán asmáticos- son mas vulnerables a padecer infección severa por el RSV <sup>32-35</sup>.

Debido a que se han reportado múltiples mecanismos mediante los cuales, el RSV inhibe las respuestas tipo Th1 y Th17, y promueve la tipo Th2 (ver tabla 1). Consideramos que la tercera mencionada anteriormente, pudiera proveer la mejor explicación sobre la base biológica entre la infección severa por el RSV y el desarrollo de asma. Los trabajos que soportan esta hipótesis han mostrado que a mayor severidad de la infección, menor será el perfil de citocinas tipo Th1 y mayor serán las del tipo Th2. Por lo cual, la infección severa a edades tempranas de la vida facilitaría tanto las reinfecciones, como sesgaría al sistema inmune hacia un fenotipo predominantemente Th2.

### *3.3 Principales características del RSV*

El RSV es un virus envuelto, de estructura pleomórfica y con un diámetro que varía entre los 100 y 350 nm. Su genoma está compuesto por una molécula lineal de RNA, de cadena sencilla en sentido negativo y con una longitud aproximada 15.2 kb. Su genoma contiene 10 genes que codifican para 11 proteínas, estas son: las proteínas no estructurales 1 y 2 (NS1 y NS2), la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), la proteína de matriz (M), la proteína pequeña hidrofóbica (SH), la proteína de adhesión (G), la proteína de fusión (F), las proteínas de matriz 2-1 y 2-2 (M2-1 y M2-2), y la RNA polimerasa dependiente de RNA (L). En la figura 1 se muestra una representación gráfica del genoma viral, en la tabla 1 se resumen las características más relevantes de dichas proteínas <sup>7, 36-41</sup>.

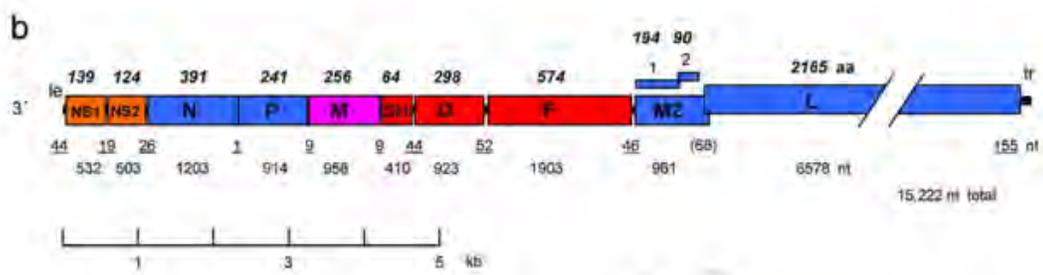


Figura 1. Representación gráfica del genoma del RSV <sup>40</sup>.

Tabla 1. Principales características estructurales y funcionales del RSV			
Gen	Proteína	Función	Referencia
NS1	NS1	Bloquea la activación de IRF3 y Jak/STAT2, disminuye la fosforilación STAT2 y STAT1, degrada STAT2, disminuye la expresión del gen <i>stat2</i> . Mediante lo anterior disminuye la producción de INF-I. También suprime la maduración de células dendríticas, la proliferación de células CD8 <sup>+</sup> CD103 <sup>+</sup> y células Th17. Evita la diferenciación de células Th0 hacia Th1, Th2 y Th17 y suprime apoptosis.	7, 37-40, 42-44
NS2	NS2	Bloquea la activación de IRF3 y Jak/STAT2, disminuye la fosforilación STAT2 y STAT1, degrada STAT2, disminuye la expresión del gen <i>stat2</i> . Mediante lo anterior disminuye la producción de INF-I. Bloquea la activación de RIG-I, suprime	7, 37-40, 42-44

		la maduración de células dendríticas, la diferenciación de células Th0 h hacia Th2 y Th17, y también la apoptosis.	
<i>N</i>	<i>N</i>	Se une al genoma y al antígeno viral, reduciendo la probabilidad de que el RNA viral sea reconocido por RIG-I, por los TLRs endosomales y por las RNAsas citosólicas. Antagoniza con la respuesta inmune innata mediada por MDA5 y RIG-1. Durante la síntesis del RNA viral interactúa con la fosfoproteína, su fosforilación modula la síntesis de RNA viral. Para la replicación viral se asocia con el factor celular eEF1A. En células dendríticas infectadas se expresa en su superficie celular, limitando la sinapsis inmune con células T.	7, 37, 39, 45-48
<i>P</i>	<i>P</i>	Interactúa con las proteínas virales N y M2-1, asociándose con la nucleocápside viral. Este es un cofactor esencial para la síntesis de RNA, ya que favorece que la RdRp acceda al genoma. Además permite que las proteínas N y RdRp estén solubles para el ensamblaje viral.	7, 39, 40, 49
<i>M</i>	<i>M</i>	Es una proteína monomérica asociada tanto con la envoltura viral y con la RNP. Esta es relevante durante el proceso de salida del virus, y además silencia la síntesis de RNA durante el empaquetamiento viral.	40
<i>M2</i>	<i>M2-1</i>	Proteína homotetramérica que contiene un motivo de dedo de zinc el cual interactúa con el RNA. Se une a la proteína P y al RNA viral, es un factor para la procesividad transcripcional, y potencia la lectura en las uniones entre los genes virales para sí poder generar el antígeno. Media la asociación de la proteína de matriz con la nucleocápside.	7, 39, 40, 50, 51
	<i>M2-2</i>	Regula el balance entre la síntesis del mRNA viral y la replicación del genoma viral. El incremento en sus concentraciones citosólicas inhibe la replicación viral. Además induce la activación de NF-κB.	7, 39, 40, 52

<i>SH</i>	SH	Esta proteína cuenta con dos inicios de traducción y varios sitios variables <i>N</i> -glicosilación. Funciona como canal catiónico que se inserta en la membrana de las células infectadas. Debido a la inducción de TNF- $\alpha$ , SH inhibe la apoptosis temprana, activa el inflamósoma (NLRP3) y además se acumula en balsas lipídicas del Complejo de Golgi.	7, 37, 40, 41, 53
<i>F</i>	F	Esta es una de las dos glicoproteínas mayores de superficie del virus. La proteína viral F genera la fusión de la envoltura viral con la membrana celular, además de que forma sincicios con células vecinas. Esta proteína sintetizada inicialmente como un precursor no funcional (F <sub>0</sub> ), para su funcionamiento requiere de una doble escisión en su extremo N-terminal. Cuenta con dos regiones repetidas de siete aminoácidos que contienen únicamente dos secuencias (HRA y HRB) las cuales forman una estructura llamada 6HB (esta región es reconocida por los TLRs). La proteína F se une a: glicosaminoglicanos, ICAM-1 TLR-2/6, TLR-4, SP-A y nucleolina, y también se asocia con balsas lipídicas (durante el proceso de salida del virus). Induce la secreción de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8) y activa a las células CD8 <sup>+</sup> Ag-específicas. Contra esta proteína se generan anticuerpos neutralizantes, además es la proteína que determina la especificidad de la infección.	7, 40, 54-57
<i>G</i>	G	La proteína G es la otra glicoproteína mayor de superficie. Es también nombrada como proteína de adhesión y se une a: glicosaminoglicanos, SP-D, al TNFr y al CX3CR1. De todas las proteínas (y genes) del RSV, este es el que tiene mayor variabilidad y el más glicosilado. El 60% de su peso son glicosilaciones, particularmente <i>O</i> -glicosilada. Existen dos formas de la proteína, una transmembranal (mG) y una soluble (sG). Esta proteína induce eosinofilia y la producción de IL-4, IL-5, IL-13, IgE, histamina; inhibe la expresión de IL-2, CCL2, CCL3, INF-I e INF-II, CCL4 y CXCL2; e impide la	7, 37, 40, 41, 58-62

		<p>migración de células NK. La inmunización con esta proteína exacerba la respuesta tipo Th2. La región central denominada GCRR, es análoga a las moléculas CX3CL1 y al TNF, e inhibe la activación de CX3CR1, TNFr y de los TLR2, 3, 4, y 9. Contra esta proteína se generan anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes, sin embargo estos tiene una menor función de neutralización en comparación con los anticuerpos anti-F. La forma soluble, disminuye la respuesta y migración de células T que expresan CX3CR1, y bloquea la neutralización mediada por anticuerpos. La forma transmembranal interacciona con la proteína de matriz.</p>	
L	L	<p>Polimerasa viral (RdRp) dependiente de RNA, realiza la función de “<i>capping</i>” y poliadenilación del RNA, como templado utiliza al complejo RNA-NP. Para la síntesis de mRNA viral, la RdRp es reclutada en los primeros 11 nucleótidos de la región 3’ o región <i>leader</i>. Para la replicación viral la RdRp se une a la región <i>leader</i>-complementaria del antigenoma. El balance entre transcripción y replicación esta regulado por las concentraciones citosólicas de la proteína M2-2.</p>	7, 40, 41, 63

Las células blanco del RSV son las del epitelio respiratorio, sin embargo, también puede infectar células dendríticas (DC) y macrófagos. Inicialmente el virus infecta a las células del tracto respiratorio superior, la diseminación hacia el tracto respiratorio inferior se da tanto por contigüidad (al formar sincicios), como por secreción del virus hacia el lumen respiratorio <sup>7,8,64</sup>.

### 3.4 Respuesta inmune contra el RSV

La liberación de los mediadores inflamatorios arriba mencionados estimulan la migración hacia la vía aérea de DC, NK, macrófagos, polimorfonucleares y en algunos casos de eosinófilos. Para que inicie la respuesta inmune adaptativa, es necesario que las DC adquieran y procesen los antígenos del virus. Cuando una DC o un macrófago se infecta por

el RSV, entonces ocurre un impedimento de la sinapsis inmune entre estas células y los CD4<sup>+</sup> *naïve*. Este impedimento probablemente se deba a la expresión de la nucleoproteína del RSV cerca del complejo principal de histocompatibilidad. *In vitro*, cuando los macrófagos se infectan por el RSV estos se activan por la vía alterna y no por la clásica <sup>64-66</sup>.

<b>Tabla 2. Principales de respuesta inmune generada por el RSV.</b>			
<b>Modelo</b>	<b>Infección severa</b>	<b>Infección no severa</b>	<b>Referencias</b>
Citocinas, quimiocinas y anticuerpos	Mayores concentraciones de: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , IgE, IgG1. La producción de INF-I e IL-12 es prácticamente mínima.	Mayores concentraciones de: INF $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, CCL5, IgG2.	64-70
Células	Aumenta la producción de moco, se retrasa la migración de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> Ag específicas. Incrementa la migración hacia pulmón de eosinófilos y mastocitos. Los macrófagos se activan por la vía alterna, y la función de las DC esta disminuida. La respuesta linfoproliferativa esta disminuida.	Reclutamiento y activación de CTL, NK y macrófagos activados por al vía clásica. Mayores concentraciones de linfocitos T-CD4 <sup>+</sup> , T-CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> , T-CD8 <sup>+</sup> y T-CD8 <sup>+</sup> 25 <sup>+</sup> , y células NK en circulación periférica.	64-70

Las infecciones no severas por el RSV suelen caracterizarse por una respuesta inmune predominantemente tipo Th1 (ver tabla 2). Durante este tipo de respuesta y de manera transitoria, la infección por RSV genera hiperreactividad de la vía aérea, la cual desaparece al resolverse la infección. Por el contrario, en las infecciones severas o cuando estas ocurren en niños menores de 6 meses de vida la respuesta predominante será del tipo Th2, la cual se ha asociado con el desarrollo de hiperreactividad de la vía aérea de larga duración <sup>64-66</sup>.

La magnitud y el fenotipo de la respuesta inmune tipo Th generada contra el RSV dependen en gran medida del contexto en el cual ocurre la infección. En los modelos de infección

experimental, la severidad de la infección depende de la especie del animal empleado, la cepa viral, la dosis de inóculo, la edad de los animales al momento de la infección, de sí se trata de una primoinfección o de una re-infección, de sí el modelo incluye una vacunación o sensibilización previa con alguna de las dos glicoproteínas mayores de superficie del RSV <sup>68-71</sup>.

### *3.5 Efecto de la edad a la cual ocurre la infección en la respuesta inmune contra el RSV*

Uno de los factores más importantes que determina tanto la severidad como las consecuencias a largo plazo generadas por el RSV, es la edad a la cual ocurre la primera infección. Este factor no solo es importante en humanos, en ratones Balb/c la respuesta inmune generada contra el RSV es muy diferente sí la infección ocurre en la etapa neonatal o durante la adultez.

La infección por el RSV en ratones Balb/c adultos se caracteriza por pérdida transitoria de peso, altas cargas virales tanto en suero como en la vía aérea, y predominio de la respuesta tipo Th1. La respuesta de citocinas más características son el INF $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-12p40, con una escasa producción de IL-10. Así pues, se ha postulado que esta respuesta es semejante a la que ocurre en humanos con infección no severa por el RSV <sup>72-74</sup>.

Al contrario de lo arriba descrito, en los ratones neonatos la infección por RSV no genera pérdida de peso, únicamente se retrasa la tasa de crecimiento del ratón; las citocinas principalmente producidas son IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 y TNF- $\alpha$ , y la producción de IL-12 e INF-I es prácticamente nula. Algunos autores han postulado que la respuesta inmune generada durante de la infección neonatal por el RSV pudiera tener consecuencia a largo plazo en el sistema inmune del ratón. Como parte de estas consecuencias de larga duración, se ha propuesto que el antecedente de la respuesta inmune neonatal al RSV pudiera modificar la respuesta inmune generada contra un alérgeno respiratorio <sup>75-85</sup>.

### *3.6 Efecto de la infección por el RSV sobre la inflamación pulmonar inducida por OVA*

Aunque la asociación epidemiológica entre la infección severa por el RSV y el desarrollo

de asma ya está aceptada, actualmente es una incógnita si la infección severa por el RSV participa en el desarrollo del asma, o si la infección por RSV en individuos asmáticos es de mayor severidad. Durante los últimos 16 años, se ha estudiado experimentalmente el efecto de la infección por el RSV sobre el proceso de inflamación pulmonar alérgica e hiperreactividad de la vía aérea. En estos estudios se ha analizado el efecto de la infección por el RSV sobre el proceso de alergenización respiratoria con ovalbúmina (OVA) <sup>35,72-74,79,80,82,86-90</sup>.

Cabe recordar que por sí sola, la infección con el RSV en ratones Balb/c adultos puede generar hiperreactividad de la vía aérea (AHR), aunque la intensidad de la broncoconstricción y de la inflamación pulmonar dependerán de las características del modelo empleado. Durante la hiperreactividad respiratoria generada por el RSV, la respuesta inmune generada se caracteriza por migración de eosinófilos, basófilos y neutrófilos hacia la vía aérea; aumenta la deposición de moco en el epitelio respiratorio; y se induce la producción tanto de citocinas tipo Th1 como Th2. El balance de esta respuesta dependerá del modelo experimental empleado. Tanto la magnitud del infiltrado inflamatorio pulmonar, como el grado y la duración AHR generada por el RSV varían entre los diferentes trabajos analizados. Mientras que en algunos casos su magnitud es similar o mayor a la generada por la OVA, en otros reportes es menor y en algunos es nula <sup>35,73,86,87,90-94</sup>.

Previamente se ha demostrado que la respuesta inmune inflamatoria alérgica pulmonar y por ende la AHR inducida por el RSV dependen de la vía de señalización de IL-4, IL-5 e IL-13 en pulmón. La AHR en ratones infectados por el RSV dura entre 12 y 21 días después de la infección. En ratones con antecedente de primoinfección por RSV durante la etapa neonatal de vida, la magnitud de la AHR y de la inflamación pulmonar inducida por el RSV se potenció cuando los ratones fueron reinfectados durante la edad adulta <sup>35,73,86,97,90-94</sup>.

Uno de los dos factores más importantes que influyen en como la infección por el RSV modifica la sensibilización respiratoria con OVA, es la secuencia temporal de ambos

procesos. Cuando la infección ocurrió durante o después del proceso de alergenización respiratoria con OVA, el RSV potenció la inflamación pulmonar inducida por OVA. Este efecto sinérgico entre la OVA y el RSV se caracterizó por el incremento en las concentraciones de IL-4, IL-5, IL-13 e INF $\gamma$  en lavado bronquioalveolar y en pulmón; aumento en el número de linfocitos, eosinófilos y macrófagos en la vía aérea; elevación de los niveles séricos de IgE e IgG1; mayor producción de moco; y finalmente, la infección incrementó tanto la magnitud como la duración de la resistencia e hiperreactividad de la vía aérea <sup>35,77,79,83,86-90,95</sup>.

En el caso de que la infección preceda al proceso de alergenización respiratoria con OVA, entonces el resultado es muy diferente. En ratones adultos, la infección previa al proceso de alergenización respiratoria redujo el número de eosinófilos en vía aérea, la producción de IL-13 en pulmón y el grado la resistencia pulmonar en respuesta a metacolina <sup>77,95</sup>.

El segundo factor que afecta el efecto de la interacción entre el RSV y la OVA, es la edad a la cual ocurre la infección. Al contrario de lo observado en ratones adultos, en ratones de 21 días de vida se observó que infección durante el inicio del proceso de alergenización respiratoria con OVA no solo redujo la inflamación pulmonar inducida por la OVA, tampoco se generó AHR <sup>79</sup>.

A pesar de que la mayoría de los modelos experimentales han utilizado ratones adultos como modelo de infección por RSV, ya se han propuesto que la infección durante la etapa neonatal de vida del ratón asemeja de mejor manera la fisiopatogenia observada en niños con infección severa por el RSV que la infección a edades adultas <sup>76, 80, 83-85</sup>. Por lo tanto, los resultados antes mencionados al ser obtenidos ratones adultos, pudieran no estar reflejando el efecto de la inmunidad neonatal sobre el proceso de alergenización respiratoria.

## 4. Justificación

Aunque la asociación epidemiológica entre la infección severa por el RSV antes de los dos años de vida y el desarrollo de asma está ampliamente aceptada desde hace varias décadas, sus mecanismos biológicos subyacentes continúan siendo una incógnita. Para explicar dicha asociación se han propuesto varias hipótesis, de entre ellas, la hipótesis más plausible establece que durante la infección severa por el RSV se genera una respuesta inmune predominantemente tipo Th2. Esta no sería una respuesta inefectiva para eliminar al virus, también sesgaría al sistema inmune hacia un fenotipo pro-alérgico.

Mediante el empleo de modelos experimentales con ratones Balb/c adultos se ha estudiado el efecto de la infección por el RSV sobre el proceso de sensibilización respiratoria con OVA. Estos estudios han demostrado que si la infección ocurre durante o después del proceso de sensibilización respiratoria con OVA, el RSV potencia la inflamación pulmonar. A pesar de que este es un resultado que ha sido reportado en múltiples ocasiones y por varios autores, esto no explica los mecanismos mediante los cuales la infección por el RSV incrementa el riesgo de asma, solo detalla los mecanismos mediante los cuales el virus exacerba las crisis asmáticas. Recientemente, un estudio reportó que cuando la infección por el RSV se llevó a cabo en ratones adultos antes de iniciar el proceso de sensibilización respiratoria, el virus no potenció la inflamación pulmonar. Sin embargo, estos modelos experimentales no han tomado en cuenta la edad a la cual ocurren la mayor cantidad de infecciones por el RSV, la cual es durante los primeros seis meses de vida. Por lo cual, estos resultados no están tomando en cuenta las características de la respuesta inmune a edades tempranas de vida.

Recientemente, se ha demostrado que tanto la magnitud como el fenotipo de la respuesta inmune generada por el RSV depende en gran medida de la edad de infección. Así mismo, otros autores han propuesto que la infección experimental con RSV en ratones neonatos tiene mayores semejanzas con la infección severa en niños, que cuando la infección se realiza en ratones adultos. Tomando en cuenta lo anterior, el infectar ratones Balb/c durante la etapa neonatal de vida y posteriormente retarlos con OVA, pudiera ser un modelo capaz de representar adecuadamente las bases biológicas de la interacción entre la infección por el

RSV a edades tempranas y el desarrollo de asma.

## **5. Pregunta de investigación**

¿Cuál es el efecto de la infección neonatal por el RSV en la respuesta inmune generada durante el proceso de alergenización respiratoria con OVA?

## **6. Hipótesis**

La infección neonatal por el RSV previa al proceso de sensibilización respiratoria con OVA, disminuye la respuesta inmune pulmonar inducida por el alérgeno respiratorio.

## **7. Objetivo general**

Determinar si la infección neonatal por el RSV previa al proceso de sensibilización respiratoria con OVA, modifica la respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> generada por el alérgeno respiratorio.

## **8. Objetivos específicos**

1. Determinar si la infección neonatal con el RSV modifica el infiltrado inflamatorio pulmonar generado con la ovalbúmina.
2. Determinar si la infección neonatal con el RSV modifica la remodelación de la vía aérea generado con la ovalbúmina.
3. Determinar si la infección neonatal con el RSV modifica las frecuencia de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y otras células relevantes presentes en la vía aérea de los ratones durante el reto con ovalbúmina.
4. Determinar si en nuestro modelo, la infección neonatal con el RSV modifica la polaridad y magnitud de la respuesta inmune tipo Th.

## 9. Materiales y métodos

### *-Células y virus*

Para la propagación y cuantificación del virus se usaron células Hep-2, las cuales fueron cultivadas en el medio *Advanced DMEM* (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) suplementado con Penicilina G/Estreptomicina (10 U/ml, Gibco, ThermoScientific, Fisher), suero fetal bovino al 5% y L-glutamina (20 mM, Gibco, ThermoScientific, Fisher). La cepa del RSV empleada fue la RSV-A2, esta fue provista por la Dra. Rocío Tirado Mendoza (Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México).

El virus se propagó en células Hep-2 cuando se logró una confluencia del 80% en cajas de 75 cm<sup>2</sup>. Para la propagación del stock viral, la MOI de infección utilizada fue de 0.1 (ver anexo I). Al cuarto día post-infección se realizó la purificación del stock viral mediante un gradiente de sacarosa al 30% <sup>96</sup>. Una vez purificado el virus, se cuantificó su concentración mediante la técnica de plaqueo viral con metilcelulosa al 5% (ver anexo II). El título del stock viral con el que se trabajó fue de  $1 \times 10^7$  PFU/ml.

### *-Animales*

Se emplearon ratones Balb/c procedentes tanto del Bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública (Cuernavaca, Morelos) como del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (Ciudad Universitaria, Ciudad de México). Los ratones se mantuvieron a una temperatura promedio de 27°C, con ciclos alternados de luz y oscuridad de 12 h, el agua y alimento se les administró *ad libitum*. El destete se realizó al día 21 de vida. Todos los procedimientos se realizaron con estricto apego a las buenas prácticas para el manejo de animales, y estuvieron de acuerdo a los lineamientos de bioética de ambas instituciones.

### *-Protocolo de infección nasal con el RSV*

Al cuarto día de vida se realizó la infección con el RSV. Para infectar a los ratones el stock viral se diluyó en solución salina estéril y fría a una relación 1:3, la cual fue administrada mediante goteo intranasal (i.n). El goteo se realizó instilando sobre las narinas 5 µL de la solución de infección, este procedimiento se repitió hasta haber administrado un volumen

total de 40  $\mu$ L. Para el grupo control o no infectado se aplicaron 40  $\mu$ L de solución salina estéril.

Para valorar *in vivo* si la infección por el RSV enfermó a los ratones, se realizó una curva de ganancia de peso. Esta curva registró el peso ganado desde el día de la infección hasta el día 12 post-infección. El porcentaje de peso ganado por cada ratón se obtuvo con la relación entre el peso post-infección con respecto al peso del día de la infección. Para confirmar el éxito de la infección, en cada camada se eligieron al azar dos ratones por grupo y se analizó la presencia del RNA viral en el tejido pulmonar (ver adelante).

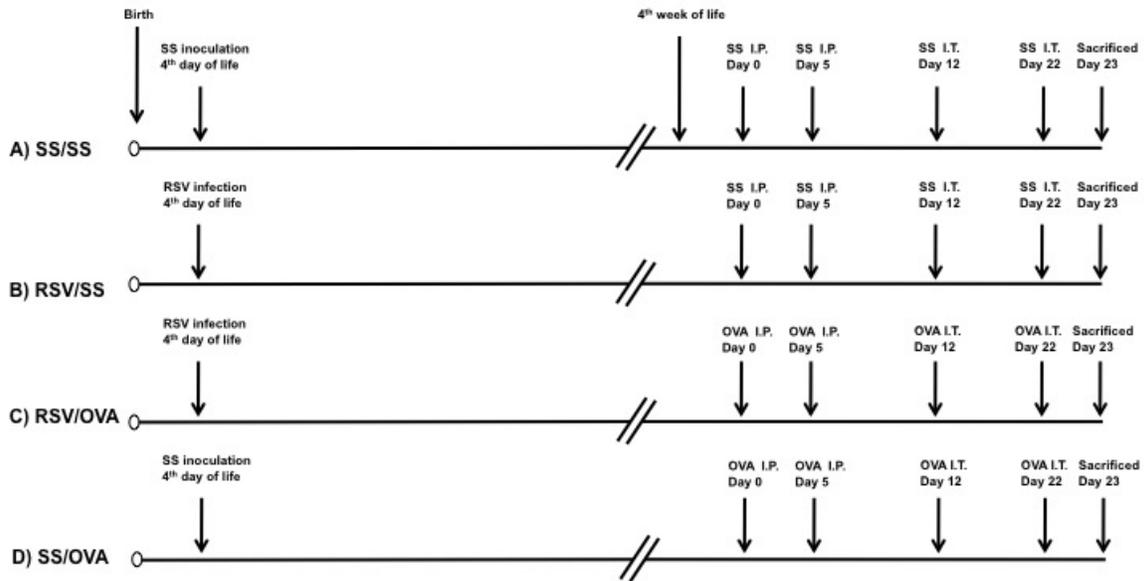
#### *-Protocolo de alergenización respiratoria y modelo experimental*

Una vez que los ratones alcanzaron la edad adulta (a la cuarta semana de vida), se inició el proceso de alergenización respiratoria con ovalbúmina (OVA). Este protocolo constó de dos partes, una parte inicial en la cual se sensibilizó sistémicamente al ratón con OVA; y una segunda parte, en la cual se llevó a cabo la activación pulmonar de la respuesta inmune contra el antígeno.

En la parte inicial (días 0 y 5) se administró intra-peritonealmente 100  $\mu$ L de OVA en una solución de OVA (USBiologicals) al 1% emulsificada con 1 mg de Imject alum (Pierce/Thermo Scientific). En la segunda parte y bajo anestesia respiratoria con Sevorane (días 12 y 22), se administró intra-traquealmente 100  $\mu$ L de una solución de OVA al 0.75%, la OVA se disolvió con solución salina estéril.

Para cada experimento se utilizaron 4 grupos de ratones, los cuales contenían cada uno 8 ratones. Los grupos de ratones empleados fueron los siguientes: 1) SS/SS, ratones no infectados y no alergenizados; 2) RSV/SS, ratones infectados con RSV y no alergenizados; 3) RSV/OVA, ratones infectados con el RSV y alergenizados con OVA; y 4) SS/OVA, ratones no infectados y alergenizados con OVA (ver figura 2).

Todos los ratones fueron sacrificados 24 horas después de la segunda estimulación intra-traqueal (día 23 del protocolo de alergenización respiratoria). Las muestras que se obtuvieron en el sacrificio fueron: suero, lavado bronquioalveolar, tejido pulmonar, y ganglios torácicos.



**Figura 2. Esquema del modelo experimental.** Grupos experimentales: A) no infectado y no alergenizado (SS/SS), B) infectado y no alergenizado (RSV/SS), C) infectado y alergenizado (RSV/OVA), D) ratones no infectados y alergenizados (SS/OVA).

*-Muestras de suero, lavado bronquioalveolar, ganglios torácicos y pulmón*

Posterior al sacrificio y mediante punción intra-cardiaca, a todos los ratones se les extrajo un 1 mL de sangre. Para obtener el suero, la sangre se centrifugó a 10,000 RPM, 10 minutos y a 4°C, el suero obtenido fue almacenado hasta su análisis a -70°C.

El lavado bronquioalveolar (BAL) fue obtenido mediante la instilación intra-traqueal de PBS frío y estéril. Para analizar las concentraciones de citocinas y quimiocinas en este lavado, se recolectaron los primeros 600 µL del BAL y se almacenó a -70°C. Para analizar el tipo y frecuencia de las células presentes en el BAL, se realizaron lavados con un volumen cada uno de 1 mL de PBS, esto se repitió hasta haber 5 mL de BAL. Mientras el lavado bronquioalveolar era procesado, este fue colocado en 1 ml de medio DMEM frío sin suero fetal. Posteriormente la muestra se centrifugó a 2,500 RMP durante 5 minutos y a 4°C, el sobrenadante se decantó y las células fueron resuspendidas en solución de buffer de lisis de eritrocitos durante 15 minutos a 4°C.

Una vez eliminados los eritrocitos, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 1 mL de PBS frío y estéril. Utilizando un contador digital de células (Scepter® 2.0 Cell

Counter, EMD Millipore) se obtuvo el número de células totales en cada muestra, posteriormente las células fueron teñidas para su análisis mediante citometría de flujo.

El tejido pulmonar fue disgregado mecánicamente con un homogeneizador tipo *Dounce* de 15 mL. El tejido pulmonar fue homogeneizado en un volumen de 2 mL, de los cuales se separaron 200  $\mu$ L de la suspensión y se le agregó 500  $\mu$ L buffer de lisis de eritrocitos. Esta mezcla se incubó durante 15 minutos a 4°C, posteriormente las células se lavaron en dos ocasiones con PBS frío y estéril. Después de los lavados se contabilizaron el número de células presentes, para el análisis mediante citometría de flujo, separaron 10 millones de células por ratón. El resto del tejido pulmonar fue almacenado a -70°C para su posterior análisis mediante qPCR.

Los ganglios torácicos fueron colocados en una caja Petri, se disgregaron mecánicamente y se resuspendieron en 1 ml solución de PBS estéril. La muestra se centrifugó a 2,500 RPM a 4°C durante 5 minutos. Las células recuperadas se incubaron en buffer de lisis de eritrocitos durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente las células fueron centrifugadas de nuevo, resuspendidas en PBS, se contaron, y se tiñeron para su análisis mediante citometría de flujo.

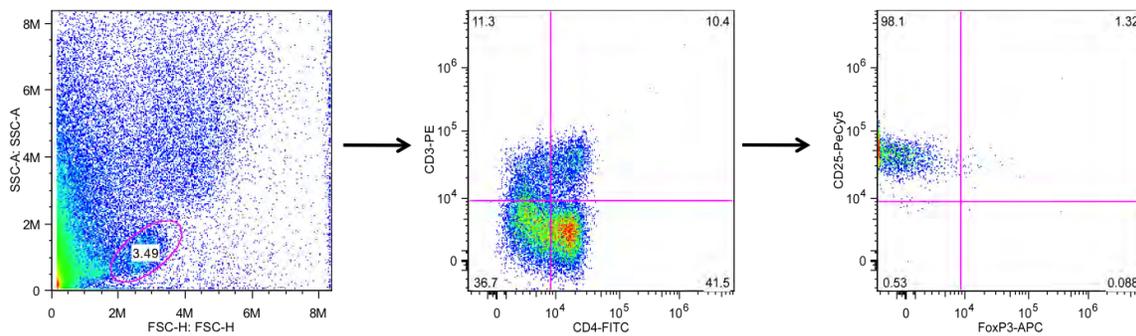
#### *-Citometría de flujo*

Todas las células que se analizaron mediante de flujo, fueron bloqueadas durante 30 minutos con buffer de EDTA/FACS/FBS-1%. Posteriormente, las células se incubaron con los anticuerpos primarios durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Ya teñidas las células se realizaron dos lavados con buffer EDTA/FACS. Finalmente, las células se fijaron con el kit BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) y se almacenaron a 4°C y oscuridad para su análisis al día siguiente.

Para la tinción intracelular contra FoxP3, las células previamente teñidas para marcadores de superficie, fijadas y permeabilizadas, se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo anti-FoxP3-APC. Pasado este tiempo se realizaron otros dos lavados con buffer EDTA/FACS y las células se almacenaron hasta el día siguiente para su análisis.

Los anticuerpos utilizados para las tinciones fueron los siguientes: anti-CD3-PE (BD Biosciences), anti-CD4-FITC (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), anti-CD4-Pe/Cy5 (BioLegend, San Diego, CA, USA), anti-CD25-Pe/Cy5 (BioLegend), anti-Gr1-Pe/Cy5 (BioLegend), anti-F4/80-Pe/Cy5 (BioLegend) and anti-FoxP3-APC (eBiosciences, Santa Clara, CA, USA).

Las células T reguladoras fueron definidas como aquellas  $CD3^+ CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ , para lo cual primero seleccionamos a las células doblemente positiva para tinción CD3-CD4, y luego seleccionamos a las células doblemente positivas para la tinción CD25-FoxP3 (figura 3). El equipo de citometría de flujo empleado fue el Attune® Acoustin Focussing Flow Cytometer, Blue/Red Laser (Applied Biosystem, Life Technologies). La información obtenida de este aparato se analizó con el programa FlowJo 8.0 (Tree Star, Inc).



**Figura 3. Esquema de selección de células T reguladoras mediante citometría de flujo.**

#### *-Extracción del mRNA total y síntesis de cDNA*

La detección de mRNA de citocinas y quimiocinas se realizó en tejido pulmonar. Una vez descongelado el tejido pulmonar homogeneizado, este fue centrifugado 10,000 RPM a 4°C durante 30 minutos. A 500  $\mu$ L de sobrenadante se le agregaron 500  $\mu$ L de Trizol (Invitrogen). La extracción del mRNA se realizó de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante del producto. Una vez obtenido el mRNA, tanto su concentración como la relación 280/260 fue obtenida mediante espectrofotometría con el equipo Nanodrop (Thermo Scientific).

La síntesis de cDNA se realizó con el kit *RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific), para esto se siguió el protocolo del proveedor y se obtuvo un

volumen final de 20  $\mu$ L de cDNA. El mismo día que el cDNA se sintetizó, se analizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

*-Diseño de oligonucleótidos y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real*

Para la detección de la expresión relativa del mRNA mensajero de las citocinas y quimiocinas de interés, los oligonucleótidos utilizando fueron diseñados con el programa “*RealTime qPCR Assay Entry*” (<http://www.idtdna.com>). Los oligonucleótidos candidatos a utilizarse debían de cumplir los siguientes criterios: 1) que el oligonucleótidos 5’-3’ y el 3’-5’ se alinearan en diferentes exón (para lo cual el producto de PCR debería de amplificar únicamente en una región inter-exónica), 2) que la longitud de producto de amplificación fuera menor a 150 bp, 3) que la  $T_m$  óptima fuera aproximadamente de 68°C ( $\pm$  2°C), 4) que el contenido de GC fuera cercano al 50% ( $\pm$  15%), y 5) que bajo las condiciones estándar de la qPCR, la formación de *hairpin*, *self-dimer* y *hetero-dimer* fueran casi nulas.

Una vez diseñados los oligonucleótidos, la especificidad de su secuencia se analizó con el algoritmo *blastn* del programa “*Nucleotide blast*” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El porcentaje de cobertura del análisis de secuencia debería de ser de 100%, y que la alineación entre la secuencia del oligonucleótido con el gen de interés fuera específica (el menor *E value* posible con respecto al alineamiento con otras secuencias que no eran de interés).

Por cada mRNA de interés se diseñaron de dos pares de oligonucleótidos, los cuales fueron analizados tanto por PCR en punto final como por qPCR. La selección final de los oligonucleótidos se realizó bajo los siguientes dos criterios: 1) que mediante PCR en punto final solo generaran un amplicón, y 2) que mediante qPCR las curvas *melt* fueran adecuadas.

La amplificación de los mRNA se realizó el termociclador ViiA-7 (Applied Biosystems), el kit de qPCR utilizado fue el Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific). El Master Mix del kit utilizado contiene la enzima Maxima Hot Start DNA polimerasa, dNTPs, fluoróforo Syber Green I, el fluoróforo para referencia (Rox), KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , y  $\text{MgCl}_2$ . La cantidad de cDNA utilizado fue de 1 $\mu$ L, y todas las muestras se amplificaron por duplicado. En la tabla 3, se muestran las secuencias de oligonucleótidos

utilizados; en la tabla 4, la mezcla de la reacción para qPCR; y en la tabla 5, el programa de termociclador utilizado.

Todos los resultados fueron normalizados mediante la expresión endógena de GAPDH (TaqMan Rodent GAPDH control Reagents, Applied Biosystems). La expresión relativa calculó mediante la fórmula =  $2^{-(\Delta Ct)}$  del grupo experimental /  $2^{-(\Delta Ct)}$  del grupo control (SS/SS)<sup>97</sup>.

<b>Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos utilizados</b>			
<b>Gen</b>	<b>Gen ID</b>	<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia</b>
<i>Il-4</i>	16189	IL-4.F	5'-GCATTTTGAACGAGGTCACAG-3'
		IL-4.R	3'-TGGAAGCCCTACAGACGAG-5'
<i>Il-10</i>	16153	IL-10.F	5'-TTGAATTCCCTGGGTGAGAAG-3'
		IL-10.R	3'-ATGGCCTTGTAGACACCTTG-5'
<i>Il-12b</i>	16160	IL-12b.F	5'-ACTCCCCATTCCCTACTTCTCC-3'
		IL-12b.R	3'-CATTCCCGCCTTTGCATTG-3'
<i>Il-13</i>	16163	IL-13.F	5'-GCATGGTATGGAGTGTGGAC-3'
		IL-13.R	3'-ATTGGAGATGTTGGTCAGGG-5'
<i>Ccl5</i>	20304	CCL5.F	5'-GGGTACCATGAAGATCTCTGC-3'
		CCL5.R	3'-TCTAGGGAGAGGTAGGCAAAG-5'
<i>Ccl11</i>	20292	CCL11.F	5'-CTGAAGAGCTACAAAAGAATCACCAACA-3'
		CCL11.R	3'-GACCCCAAGAAGAAGTGGGTCCAGGATG-5'
<i>Cc24</i>	56221	CCL24.F	5'-TCCAAGAAAATTCCAGAAAACCG-3'
		CCL24.R	3'-TTGTATGTGCCTCTGAACCC-5'
<i>INFg</i>	15978	INF $\gamma$ .F	5'-AAACTATTGCCACATGCTG-3'
		INF $\gamma$ .R	3'-CCCCTGCTCTTCCACTAAC-5'

<b>Tabla 4. Mezcla de reacción para qPCR.</b>		
<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Concentración final</b>
Master mix (2x)	5.0 $\mu$ L	1 x
Oligonucleótido sentido (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ L	1 $\mu$ M
Oligonucleótido antisentido (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ L	1 $\mu$ M
Agua libre de endonucleasas.	3.6 $\mu$ L	---
cDNA	1.0 $\mu$ L	---
Volumen final	10 $\mu$ L	---

<b>Tabla 5. Programa del termociclador.</b>		
<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
50°C	2 minutos	1
95°C	10 minutos	1
95°C	15 segundos	40
60°C	30 segundos	
72°C	30 segundos	
95°C	15 segundos	1
60°C	1 minuto	1
95°C	15 segundos	1

### *-Detección del RNA viral*

Para la detección del RNA de RSV, al día 4 post-infección se eligieron aleatoriamente dos ratones por grupo. Los ratones fueron sacrificados y los pulmones homogeneizados de manera mecánica (ver arriba), posteriormente el tejido pulmonar se centrifugó durante 30 minutos a 12,000 RPM a 4°C. Utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen®) se extrajo el RNA total procedente de las muestras almacenada a -70°C. Posterior a la extracción del RNA, se emplearon de acuerdo a las especificaciones del proveedor 2 µL de RNA total con el kit *RevertAid H minus First Strand cDNA synthesis Kit* (Thermo Scientific), para la detección del RNA viral, el cDNA fue sintetizado con hexámeros al azar.

La detección del RNA viral se realizó mediante PCR en punto final, para lo cual se diseñaron un par de oligonucleótidos que amplificaban desde el extremo 5' de gen P del RSV hasta el extremo 3' de la secuencia final no codificada del mismo gen (desde el nucleótido 3086 al nucleótido 3188 del genoma viral de RSV, NCBI References Sequence: NC\_001803.1). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron: RSV-Pe-F (5'-TGTACATCAACACACAACACCAACAG-3') y RSV-Pe-R (3'-TGTACATCAACACACAACACCAACAG-5'). El kit de PCR utilizado fue *GoTaq® DNA polymerase* (Promega). El buffer para la Master Mix fue el "5X Green GoTaq® Reaction Buffer" el cual contenía MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 1.5 mM. En la tabla 6 se muestra los reactivos y concentraciones para la reacción de PCR en punto final.

<b>Tabla 6. Mezcla de reacción para PCR en punto final.</b>		
<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Concentración final</b>
5x Green GoTaq® Reaction Buffer	5.0 µL	1 x
PCR Nucleotide Mix (#C1141) (10 mM)	0.25 µL	0.3 mM
Oligonucleótido sentido (10 µM)	0.25 µL	0.2 µM
Oligonucleótido antisentido (10 µM)	0.25 µL	0.2 µM
GoTaq® DNA Polymerase (5u/µL)	0.15 µL	1.25 u
Agua libre de endonucleasas.	16.6 µL	---
cDNA	2.0 µL	---
Volumen final	25 µL	---

El producto de amplificación por PCR esperado fue de 105 bp. El programa de termociclado utilizado fue el siguiente: 94°C/2 min, 45 ciclos de 94°C/20 seg, 55°C/20 seg, 68°C/30 seg, extensión final de 68°C/7min. Del total del producto de PCR, se utilizaron 5

µL para electroforesis en un gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio. El amplicón fue detectado utilizando luz UV y posteriormente fotografiado.

#### *-Detección de citocinas y quimiocinas mediante perlas magnéticas*

La detección de IL-4, IL-12p40, CCL5 y CCL11 en suero y BAL se realizó con el kit Milliplex Map Kit, 96-well Plate Assay, MCYTOMAG-70K-04.MOU. La detección de estas moléculas se realizó con el dispositivo MEGAPIX®, y sus concentraciones fueron obtenidas mediante el análisis con el programa xPonent (localizado en el Instituto Nacional de Rehabilitación). Para la detección de citocinas tipo Th1/Th2/Th17 en BAL se empleó el panel de ELISA múltiple “Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine multi-analyte ELISAarray Kit (Qiagen).

#### *-Análisis histopatológico*

Posterior al sacrificio de los ratones, los pulmones fueron fijados mediante la instilación intra-traqueal de 1ml de etanol al 90%. Posteriormente, las muestras fueron llevadas al Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina (Ciudad Universitaria, UNAM), en donde los pulmones fueron embebidos en parafina y procesados para su análisis histopatológico.

El análisis morfométrico de las imágenes histopatológicas se realizó con el programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). El análisis histopatológico se realizó evaluando a seis ratones por grupo (cinco campos por animal), el análisis se realizó por triplicado (experimentos independientes). Para la cuantificación del infiltrado celular, el tejido pulmonar fue teñido con hematoxilina y eosina (H&E); la producción de mucina fue analizada mediante la tinción del ácido periódico (PAS); el grado de depósito colágeno peribronquial se cuantificó con la tinción tricrómica de Masson (MT). Los cortes transversales de pulmón ya procesados fueron fotografiados a tres niveles de amplificación, 4x, 10x y 40x.

Los bronquiolos fueron identificados por la presencia de conductos cubiertos de epitelio cúbico ciliado con presencia de músculo liso en la periferia. Los vasos pulmonares se identificaron debido a la presencia de las capas adventicia, media e íntima. La magnitud del

infiltrado celular peribronquial se calculó al medir la distancia ( $\mu\text{m}$ ) existente entre la lámina basal y la capa de músculo liso. En el caso del infiltrado perivascular, se analizó al medir la distancia ( $\mu\text{m}$ ) existente entre la capa de adventicia y el tejido conectivo adyacente. El depósito de colágena se cuantificó al obtener la distancia ( $\mu\text{m}$ ) entre la lámina basal y la capa de músculo liso <sup>98,99</sup>.

#### *-Análisis estadístico*

Para decidir el tipo de pruebas estadísticas a realizar, primero se evaluó la distribución y normalidad de los datos. En caso de datos con distribución normal, las diferencias entre las varianzas de las medias de los cuatro grupos se analizó con la prueba de ANOVA, si el valor de  $p < 0.05$ , entonces se realizó la prueba *post-hoc* de Bonferroni. Para los datos con distribución no normal, primero realizamos la prueba de Kruskal Wallis con el objetivo determinar si existían diferencias en la distribución de las medianas de los grupos. Si el valor de  $p < 0.05$ , entonces se determinó la diferencia entre las medianas de los grupos con la prueba de U de Mann-Whitney. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de  $p < 0.05$ . El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 20.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

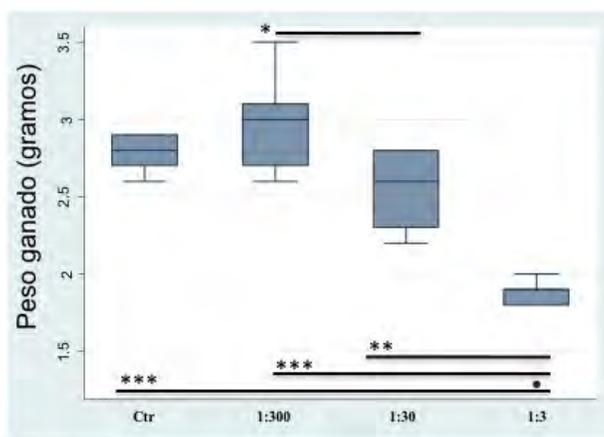
## 10. Resultados

### - 10.1 - Infección de ratones neonatos Balb/c con la cepa A2 de RSV.

El primer paso fue el determinar si los ratones Balb/c neonatos eran permisivos a la infección con el RSV. Para realizar esto, se evaluaron dos parámetros: el primero fue el porcentaje de peso ganado con respecto al día de la infección; el segundo fue la detección del genoma viral en el tejido pulmonar.

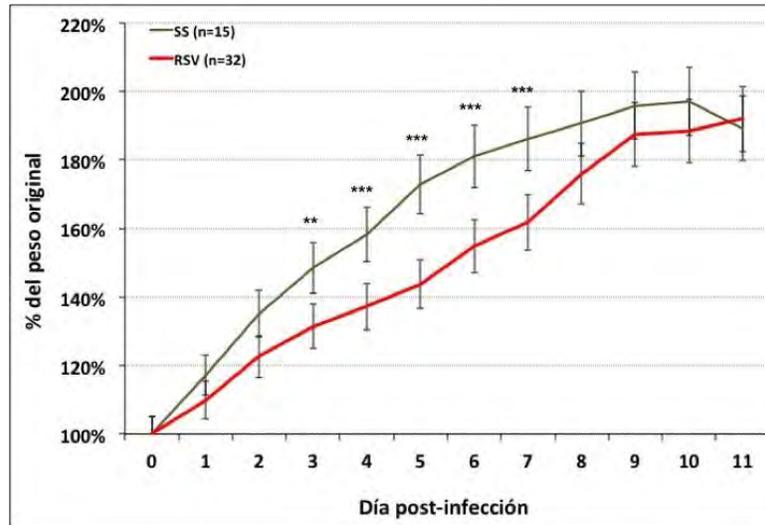
La curva de ganancia de peso es un marcador indirecto que ha sido ampliamente utilizado para evaluar *in vivo* la infección por el RSV. Antes de realizar dicha curva, determinamos la dosis del stock viral suficiente que generara disminución significativa en el porcentaje de peso diario ganado, pero que no causara mortalidad. El título viral del stock de RSV con el que contamos era de  $1 \times 10^5$  PFU/ml. El stock viral se diluyó a tres concentraciones diferentes (1:3, 1:30 y 1:300), a cada ratón se le aplicó intranasalmente 40  $\mu$ L de esta solución.

En la figura 4 se muestra el resultado de tres experimentos independientes en donde se analizó la ganancia de peso al séptimo día post-infección. El grupo de ratones con la menor ganancia de peso al séptimo día post-infección fue el grupo a quien se le administró la dilución del stock viral 1:3. En comparación con los otros dos grupos infectados y el no infectado (control), esta diferencia fue significativa (prueba U de Mann-Whitney,  $p < 0.001$  comparando contra cada uno de los otros tres grupos). Debido a este resultado, se decidió utilizar durante todo el proyecto una dilución 1:3 del stock viral.



**Figura 4. Análisis de la ganancia de total de peso al séptimo día post-infección neonatal con el RSV.** Representación gráfica del porcentaje de peso ganado al séptimo día post-infección. Se comparan cuatro grupos; control (no infectado), infectado a una dilución 1:300, infectado a una dilución 1:30 e infectado a una dilución 1:3. Resultados representativos de tres experimentos independientes, se realizó la prueba de U de Mann-Whitney (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

En la figura 5 se muestra la curva de ganancia de peso de los ratones infectados y no infectados. En esta curva se graficó el porcentaje de peso ganado para cada grupo con respecto al día de la infección. Entre los días 3 al 7 post-infección, el porcentaje de peso ganado en los ratones infectados fue menor que el de los ratones no infectados (diferencia significativa). A partir al octavo día post-infección, ambas curvas de crecimiento de peso fueron similares y sin diferencias significativas. La disminución transitoria en la ganancia de peso durante los primeros siete días después de la inoculación viral, es un dato altamente sugerente de que los ratones se infectaron y desarrollaron enfermedad. Para poder confirmar este resultado, se realizó la detección del genoma viral en el tejido pulmonar al cuarto día post-infección.



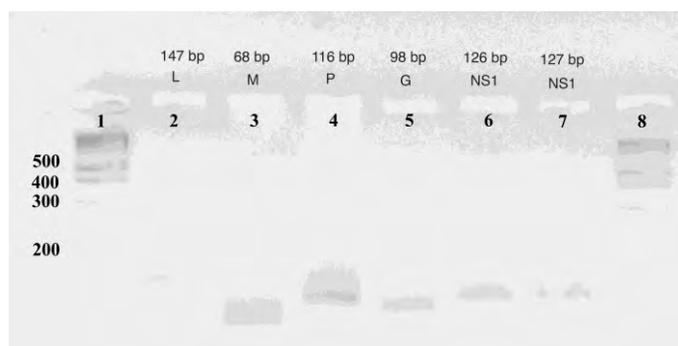
**Figura 5. Curva de ganancia diaria de peso en ratones neonatos infectados y no infectados.** Representación gráfica del porcentaje de peso ganado con respecto al día de la infección viral (día 0), la línea verde representa al grupo de ratones no infectados y la línea en rojo representa a los ratones infectados con el RSV. Resultados representativos de tres experimentos independientes, se realizó la prueba de ANOVA (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Para confirmar la infección neonatal por el RSV, se diseñaron oligonucleótidos que amplificaran el genoma viral. Estos oligonucleótidos deberían de amplificar específicamente tanto una región codificante y no codificante de alguno los siguientes genes virales: NS1, P, M, G y L. Con esta estrategia, se buscaba únicamente amplificar genoma viral y no el mRNA viral. En la tabla 7 se detallan las secuencias de los oligonucleótidos, sus posiciones en el genoma de referencia, Tm y el tamaño del producto de amplificación. Para todos los oligonucleótidos diseñados se realizó un análisis BLAST (*standard nucleotide BLAST analysis, blastn program*).

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para la detección del genoma de RSV.					
Nombre	Secuencia	Gen	Posición	Tm	Amplicón
RSVns1F1	CTTGACAGAAGATAAAAATGGGGC	NS1	577	54.3°C	125 bp
RSVns1F	GTCTCAAGTGACAAATGGTCTC	NS1	701	53.0°C	
RSVns1F2	CAAAGCAGCAATACATACAATTA	NS1	125	58.3°C	127 bp
RSVns1R2	TCCCATATGTATCCTCCGTTT	NS1	252	58.2°C	
RSVPGEF	CTGTACATCAACACACAACACCAACAG	P	2086	58.2°C	102 bp
RSVPGER	GGTGGCTAGTTTTGGATTGGCTG	P	3188	58.6°C	
RSVNPF	GACTTGACAGCAGAAGAACTAGAGGC	N-P	2244	58.8°C	137 bp
RSVNPR	CTTCTCCATGGAATTCAGGAGCAAAC	N-P	2381	57.9°C	
RSVmF	TGCCAGCAAATTTACCATA	M	3483	59.0°C	69 bp
RSVmR	CTTGATTTACAGGGTGTGG	M	3552	58.9°C	
RSVGR	TGTCAAGTCAACCCTGCAAT	G	5021	59.1°C	98 bp

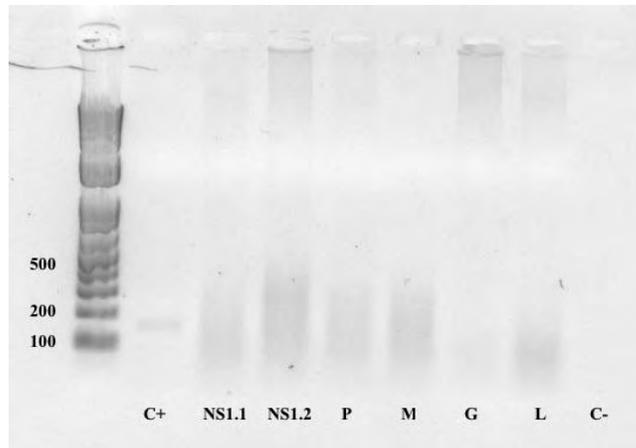
<b>RSVGR</b>	ATTGGGTTTGTGGTGGTT	G	5119	59.0°C	173 bp
<b>RSV-LCs</b>	TCTTCATCACCATACTTTCTGTTA	L	12647	52.1°C	
<b>RSV-LCS</b>	GCCAAAAAATTGTTCCACAATA	L	12500	50.9°C	

Una vez diseñados dichos oligonucleótidos, procedimos a estandarizar las condiciones de PCR. Para esto, se infectaron células Hep2 con el RSV a una MOI de 0.1, 72 horas después de la infección se extrajo el RNA total. Posteriormente se realizó una RT-PCR en un solo paso. En la figura 6 se muestra el producto de amplificación de PCR para cada uno de los pares de oligonucleótidos diseñados.



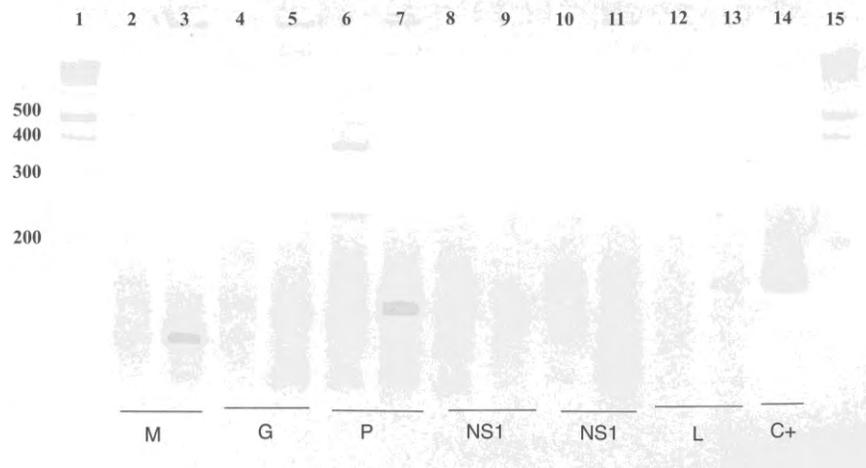
**Figura 6. Detección del genoma viral en cultivo celular (Hep-2).** Carril 1 muestra el marcador de peso molecular; carril 2 corresponde a la amplificación del gen L; carril 3 al gene M; carril 4 al gene P; carril 5 al gene G; carril 6 al primer par de oligonucleótidos para el gen NS1; carril 7 para el segundo para de oligonucleótidos para el gene NS2; carril 8 marcador de peso molecular. El producto de PCR se analizó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 3%.

Una vez obtenido este resultado en las células Hep2, procedimos a detectar al cuarto día post-infección el genoma viral en el tejido pulmonar de los ratones neonatos. Sin embargo, mediante esta estrategia no fue posible obtener un producto de amplificación de las muestras provenientes del tejido pulmonar (figura 7). El único amplicón obtenido fue el correspondiente al control positivo (células Hep2 infectadas con el RSV). Cabe mencionar, que el amplicón detectado se obtuvo con un par de oligonucleótidos previamente diseñados y validados para diagnóstico molecular del RSV (gen L del RSV).



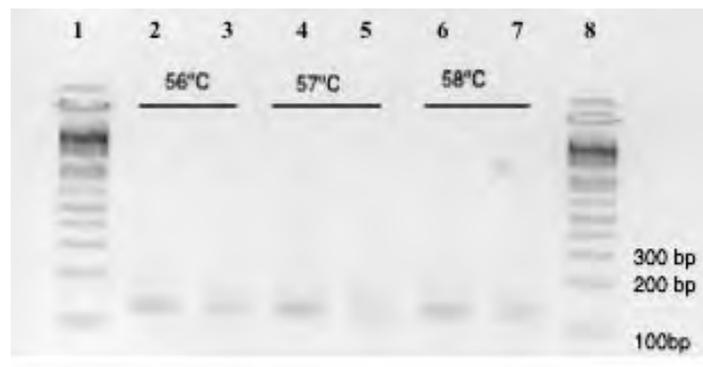
**Figura 7. Detección del genoma viral en tejido pulmonar, cDNA sintetizado con oligodT.** Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, amplificación del gen L obtenido de células Hep2 infectadas con el RSV (control positivo); carril 9, células Hep2 no infectadas. Carriles 3 a 8 corresponden a cDNA obtenido del RNA de tejido pulmonar, en el carril 3 se muestra el producto obtenido con el primer par de oligonucleótidos para NS1; el carril 4 corresponde al segundo par de oligonucleótidos de NS1.; carril 5 corresponde al gen P; carril 6 corresponde al gen M; carril 7 al gen G; y el carril 8 al gen L. El producto de PCR se analizó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 3%. Figura representativa de uno de tres experimentos realizados independientemente.

Después de analizar dichos resultados, se decidió sintetizar el cDNA con hexámeros al azar y repetir la amplificación de las muestras del tejido pulmonar. En la figura 8 mostramos el resultado de la electroforesis de los productos de PCR para todos oligonucleótidos diseñados. Los carriles 2, 4, 5, 6, 8, 10 y 12 corresponden a muestras de sintetizado con oligodT; carriles 3, 5, 7, 9, 11, 13 corresponden a la amplificación de cDNA sintetizado con hexámeros al azar. Con estos resultados decidimos sintetizar el cDNA con hexámeros al azar y no con oligodT, así mismo decidimos únicamente optimizar la PCR para la amplificación del gen P del RSV (oligonucleótidos RSVPGEF y RSVPGER).



**Figura 8. Detección del genoma viral en tejido pulmonar, cDNA sintetizado con oligodT y hexámeros al azar.** Carriles 1 y 15, marcador de peso molecular. Las muestras que se observan carriles pares (2 al 12), el cDNA fue sintetizado con oligodT; las muestras de los carriles nones (3 al 13), el cDNA fue sintetizado con hexámeros al azar. Gen M se observa en los carriles 2 y 3; el gen G en los carriles 4 y 5; el gen P en los carriles 6 y 7; el primer par de oligonucleótidos para NS1 en el carril 8 y 9; el segundo para de oligonucleótidos para NS2 en los carriles 10 y 12; el gen L en los carriles 12 y 13; control positivo (células Hep2 infectadas con RSV, detección del gen L). El producto de PCR se analizó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 3%. Figura representativa de uno de tres experimentos realizados independientemente

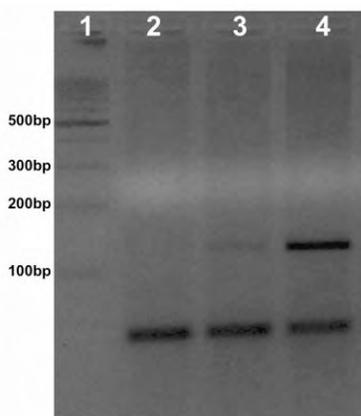
En la figura 9 se muestra una imagen representativa del proceso de optimización de la  $T_m$  y concentración de  $MgCl_2$ . Esta PCR se realizó los oligonucleótidos RSVPGEF y RSVPGER. Con estos resultados decidimos que las mejores condiciones para dicha PCR eran con una  $T_m$  de  $57^\circ C$  y una concentración de  $MgCl_2$  de 1.0 mM.



**Figura 9. Optimización de las condiciones de  $T_m$  y  $MgCl_2$  para la detección del RSV en tejido pulmonar.** Carriles 1 y 8, marcador de peso molecular. Carriles 2, 4, y 6 corresponden a una concentración de  $MgCl_2$  de 1.0 mM; carriles 3, 5 y 7 corresponden a una concentración de  $MgCl_2$  de 1.5 mM. El producto de PCR se analizó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 3%.

En la figura 10 se muestra la electroforesis de los productos de PCR correspondientes a las muestras del tejido pulmonar de los ratones infectados (carriles 3 y 4). En la muestra de tejido pulmonar del ratón no infectado no se observó amplificación (carril 2). La detección del RNA viral en el tejido pulmonar del grupo de ratones nos confirma la infección viral. Por lo tanto, con los datos mostrados en las figuras 4 y 9 podemos concluir que los ratones neonatos Balb/c sí fueron permisivos a la infección con el RSV. Cabe mencionar, que como control de infección, para cada camada de ratones infectados se tomaban al azar tres ratones y se les realizaba la detección del genoma viral mediante PCR en punto final.

Aunque en este punto se podrían considerar dos limitantes del proyecto: 1) no haber secuenciado los productos de PCR, 2) no haber realizado un ensayo de plaqueo del tejido pulmonar homogeneizado. Sin embargo, los resultados de la curva de peso y de la amplificación específica parcial del genoma viral, son datos lo suficientemente robustos como para confirmar la infección por el RSV.



**Figura 10. Detección del genoma viral en tejido pulmonar al cuarto días post-infección.** Carril 1 corresponde con el marcador de peso molecular; carril 2 corresponde a una muestra el tejido pulmonar de un ratón no infectado; carriles 3 y 4 corresponden con tejido pulmonar de ratones infectados. El cDNA se sintetizó con hexámero al azar. La PCR se realizó en tejido pulmonar homogeneizado cuatro días después de la infección, el producto de PCR se analizó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 3%. Figura representativa de uno de tres experimentos realizados independientemente.

#### *- 10.2 - Análisis histopatológico del proceso inflamatorio pulmonar.*

Los primeros dos objetivos específicos de estas tesis fueron determinar si la infección neonatal con el RSV modificó tanto el infiltrado inflamatorio pulmonar, como la

remodelación de la vía aérea generados con la OVA. Para cumplir con estos dos objetivos específicos, se analizaron las imágenes de histopatología de pulmón y posteriormente se cuantificó la magnitud del infiltrado inflamatorio pulmonar peribronquial y perivascular, así como la magnitud del depósito peribronquial de colágena al final del protocolo de sensibilización con OVA.

Cuatro semanas después de haber infectado a los ratones, se inició el protocolo de alergenización respiratoria con OVA. Debido a que este proyecto fue diseñado para evaluar el efecto de la infección neonatal por el RSV sobre el proceso de inflamación pulmonar aguda generada por la OVA, decidimos analizar la respuesta inmune generada 24 h después del segundo estímulo respiratorio (día 23 del protocolo de alergenización respiratoria). Con lo cual, este modelo nos permitiría analizar las modificaciones ocurridas en la etapa temprana de la inflamación pulmonar. Por lo anterior, todos los resultados de este modelo se obtuvieron al día posterior del último estímulo intra-traqueal con OVA. Debido a que este trabajo no se analizaron otros tiempos o momentos después de la segunda estimulación intra-traqueal con OVA, esto abre las posibilidades a futuros proyectos que evalúen el efecto de la infección neonatal en tiempos más tardíos del proceso de alergenización respiratoria con OVA.

Mediante el análisis histopatológico del tejido pulmonar, analizamos el grado de inflamación pulmonar generada durante la alergenización respiratoria con OVA. Con la tinción de hematoxilina y eosina (H&E) se evaluó la magnitud de la inflamación peribronquial y perivascular (figura 11A, D y E ); con la tinción de ácido periódico de Schiff (PAS) se detectó la presencia de mucina en las células de Goblet (figura 11B); con la tinción tricrómica de Masson se cuantificó el incremento en el depósito peribronquial de colágena (figura 11C y F).

De los cuatro grupos de ratones analizados, quienes presentaron el mayor grado de infiltrado inflamatorio peribronquial y perivascular fueron los ratones SS/OVA. Al analizar la magnitud de dicho infiltrado, se encontró que existía una diferencia significativa entre el grupo SS/OVA y los otros tres grupos (figuras 11A, 11D y 11E). En este grupo de ratones observamos la presencia de mucina en las células de Goblet (flechas en la figura 11B) e incremento en el depósito peribronquial de colágena (figuras 11C y 11F). Mientras que

entre los ratones SS/OVA y RSV/OVA no se encontró diferencia significativa en la magnitud del depósito peribronquial de colágena, los ratones SS/OVA tuvieron mayor depósito que los ratones RSV/SS y SS/SS. En conjunto, los resultados del análisis histopatológico del tejido pulmonar en el grupo de ratones SS/OVA son congruentes con el éxito el proceso inflamatorio inducido por OVA.

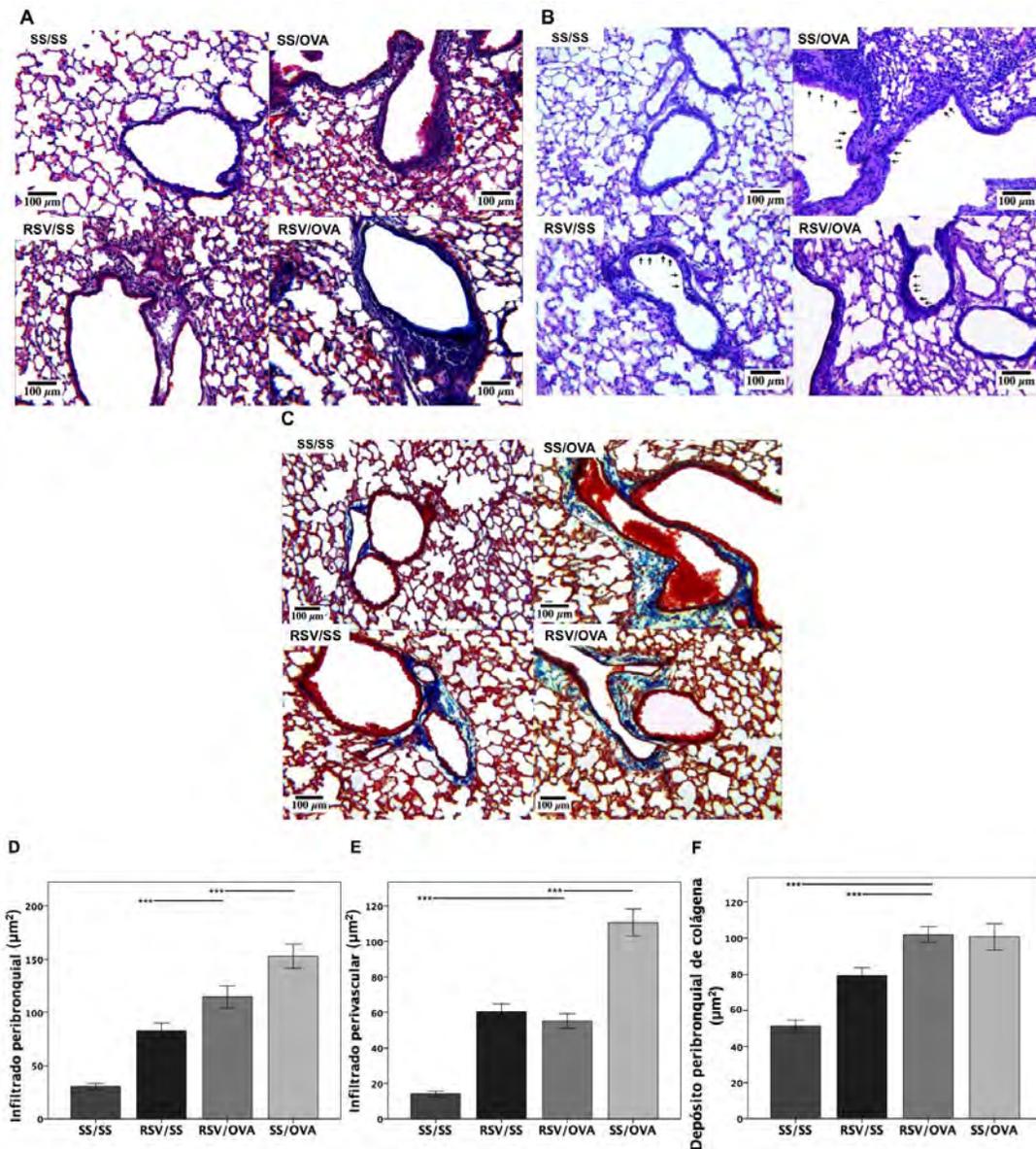
En cuanto al grupo de ratones RSV/OVA, el antecedente de la infección neonatal disminuyó significativamente la magnitud del área de infiltrado inflamatorio peribronquial y perivascular (figuras 11A, 11D y 11E) (diferencia significativa en comparación con el grupo SS/OVA). Al comparar a este grupo con los ratones SS/SS y RSV/SS, la magnitud del infiltrado inflamatorio peribronquial en los ratones RSV/OVA fue significativamente mayor. En los ratones RSV/OVA, también se detectó la presencia mucina en las células de Goblet (flechas en la figura 11B) e incremento en el depósito de colágena peribronquial (figuras 11C y 11F). Como era esperado, en los ratones RSV/OVA se observó incremento en los depósitos de colágena, presencia de infiltrado inflamatorio y producción de mucina. De manera inesperada observamos que en estos ratones, se atenuó la magnitud infiltrado inflamatorio pulmonar. Esta atenuación pudiera ser considerada como un resultado relevante y novedoso, ya que pudiera ser una consecuencia de la infección neonatal por el RSV. Con lo cual, la infección neonatal estaría modificando el proceso de sensibilización respiratoria a OVA.

Para confirmar la validez de la atenuación del infiltrado inflamatorio pulmonar, evaluamos si la infección neonatal también redujo la frecuencia de las poblaciones de linfocitos T  $CD4^+ CD25^+$  y T  $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$  en tejido pulmonar, así como si se atenuó la expresión relativa de mRNA y las concentraciones de citocinas/quimiocinas en la vía aérea de estos ratones.

De manera sorprendente, siete semanas después de la infección en el grupo de ratones únicamente RSV/SS aún fue posible documentar la persistencia de infiltrado inflamatorio peribronquial y perivascular. Mientras que el grado de inflamación peribronquial fue estadísticamente menor en comparación con los grupos RSV/OVA y SS/OVA, la inflamación perivascular fue muy similar a la observada en el grupo RSV/OVA (figura 11D y 11E). Al igual que en ambos grupos de ratones alergenizados, en los ratones RSV/SS

también se detectó la presencia de mucina en las células de Goblet (flechas en la figura 11B). El depósito de colágena peribronquial de los ratones RSV/SS fue estadísticamente mayor que en los ratones control (SS/SS), pero menor que en ambos grupos de ratones alergenizados (figura 11F,  $p < 0.005$ ). Este resultado nos sugiere que el proceso de inflamación pulmonar generado durante la infección neonatal por el RSV, en los ratones Balb/c puede durar al menos siete semanas después de haber sido infectados. Cabe mencionar que siete semanas después de la infección, ni en el tejido pulmonar de los ratones RSV/SS ni en el de los RSV/OV, se detectó mediante PCR el genoma viral. Por lo cual es probable que la inflamación pulmonar en los ratones RSV/SS sea un efecto residual de la respuesta a la infección, y no sea como respuesta a un estado de infección crónica o latente por el RSV.

Como era de esperarse, en el grupo de ratones control (SS) no se detectó la presencia de infiltrado inflamatorio peribronquial ni perivascular, tampoco se visualizaron células de Goblet positiva para mucina, y el grado de depósito peribronquial de colágena fue significativamente menor que el obtenido en los otros tres grupos. Por lo tanto, con los resultados observados en la figura 11 se cumplen con los dos primeros objetivos específicos de la tesis.



**Figura 11. Análisis histopatológico del proceso inflamatorio pulmonar.** Cortes histopatológicos teñidos con (A) H&E, (B) PAS, y (C) tricrómica de Masson. Análisis cuantitativo del infiltrado inflamatorio peribronquial (D) y perivascular (E). Análisis del área de depósito peribronquial de colágena (F). Imágenes y resultados representativo de tres experimentos independientes ( $n = 6$  ratones por grupo, 5 campos por animal). Se realizó la prueba de ANOVA con la corrección *post hoc* de Bonferroni (\*\*\*)  $p < 0.005$ .

- 10.3 - Análisis de la subpoblación de células T  $CD4^+ CD25^+$  y T  $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$  en tejido pulmonar.

El tercer objetivo específico de esta tesis fue determinar si la infección neonatal con el RSV modificó la frecuencia de las poblaciones de linfocitos T  $CD4^+$  y otras células relevantes presentes en la vía aérea de los ratones durante el reto con OVA. Para cumplir con este

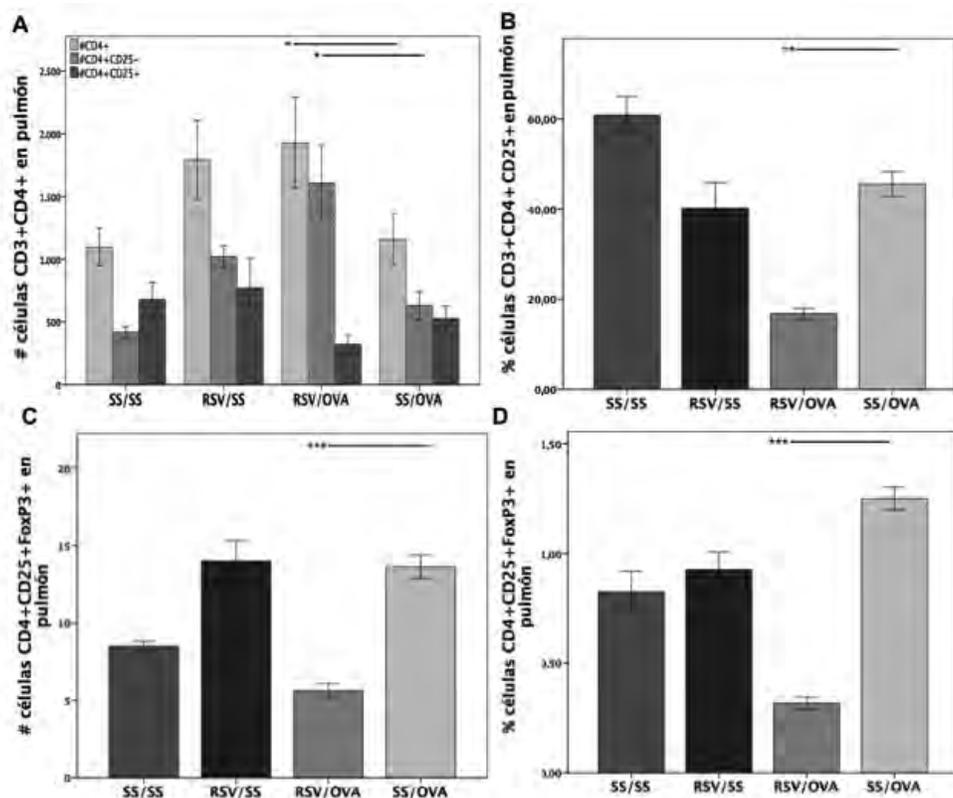
objetivo, primero se analizó mediante citometría de flujo la frecuencia de las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, y CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> presente en pulmón. Posteriormente se mostrarán los resultados de este análisis pero en el lavado bronquioalveolar.

La mayor cantidad de linfocitos T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> localizados en el tejido pulmonar se encontraron en el grupo RSV/OVA (figura 12A). En los grupos SS/OVA y RSV/SS, el número de linfocitos T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> presentes en el tejido pulmonar fue estadísticamente mayor con respecto a los ratones SS/SS (figura 12A,  $p < 0.01$ ).

En congruencia con los resultados del análisis histopatológico, en los ratones RSV/OVA se redujo la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>. En este grupo de ratones, las células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> representaron el 16.7% de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales en pulmón (figura 12B,  $p < 0.01$  en comparación con los otros tres grupos). En el caso de los grupos SS/OVA y RSV/SS, el porcentaje de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> fue muy similar entre ellos (45% y 43% respectivamente).

Una vez evaluada a la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, obtuvimos la frecuencia de la subpoblación de linfocitos CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> en el tejido pulmonar (figuras 12C y 12D). En concordancia con los resultados obtenidos con las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, el grupo con el mayor porcentaje de esta células fueron los ratones SS/OVA, este grupo fue seguido por ratones RSV/SS y SS/SS. En el caso de los ratones RSV/OVA, tanto el número como el porcentaje de los linfocitos CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> se encontraron disminuidos ( $p < 0.005$ ).

La disminución en de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> en los ratones RSV/OVA es un resultado acorde con la atenuación del infiltrado inflamatorio pulmonar. En la literatura suele considerarse que las células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> están activadas, por lo cual un proceso que disminuya la activación de estas células, estaría disminuyendo la respuesta inflamatoria pulmonar inducida por OVA. Tomando en cuenta que los linfocitos CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> son un subpoblación de las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, la disminución en su frecuencia era un resultado esperado. Una limitante de esta serie de análisis fue que no se evaluó la funcionalidad de estas poblaciones de linfocitos.



**Figura 12. Análisis de las poblaciones de linfocitos T  $CD4^+$ ,  $CD4^+ CD25^+$  y  $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$  en el tejido pulmonar.** (A) media del número total de linfocitos  $CD3^+ CD4^+$ ,  $CD3^+ CD4^+ CD25^-$  y  $CD3^+ CD4^+ CD25^+$ , (B) media del porcentaje de linfocitos  $CD3^+ CD4^+ CD25^+$  con respecto a la población de linfocitos  $CD3^+ CD4^+$ , (C) media del número total y (D) porcentaje de linfocitos  $CD3^+ CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ . Las células se analizaron mediante citometría de flujo, resultados representativos de tres experimentos independientes ( $n = 4$  ratones por grupo/experimento). Se realizó la prueba de ANOVA con la corrección *post hoc* de Bonferroni (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ ).

#### - 10.4 - Análisis de la población de linfocitos T $CD4^+ CD25^+$ y de T $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ en BAL.

Como segunda estrategia para cumplir el tercer objetivo específico, se evaluó la frecuencia de del número de células totales, macrófagos y granulocitos presentes en el lavado bronquioalveolar (BAL).

En comparación con el grupo SS/SS, en ambos grupos de ratones alergenizados (RSV/OVA y SS/OVA) se incrementó significativamente el número de células totales, macrófagos y granulocitos en BAL (figura 13A-C). Con este resultado, más los datos de

histopatología y qPCR de tejido pulmonar podemos confirmar que la sensibilización con OVA sí generó un proceso inflamatorio pulmonar agudo.

De manera sorprendente, en el grupo de ratones RSV/OVA se encontró incrementado el número de granulocitos en BAL (figura 13C,  $p < 0.05$  vs SS/OVA,  $p < 0.01$  vs RSV/SS, y  $p < 0.001$  vs SS/SS). Debido a que este parámetro fue uno de varios que se emplearon para determinar si la OVA generó inflamación pulmonar, no se analizó con mayor profundidad este resultado. Por lo cual, aunque pudiera ser una limitante el hecho de que no se realizaron mayores experimentos que buscaran explicar la causa y/o importancia de este resultado, este hallazgo da pauta para la generación de un nuevo proyecto de investigación.

Como era de esperarse, en el grupo de ratones RSV/SS también se observó incrementado el número de células totales, macrófagos y granulocitos en el BAL (figura 13A-C). De estas tres poblaciones celulares, únicamente el número de granulocitos fue estadísticamente menor en comparación con los grupos SS/OVA y RSV/OVA (figura 13C,  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente).

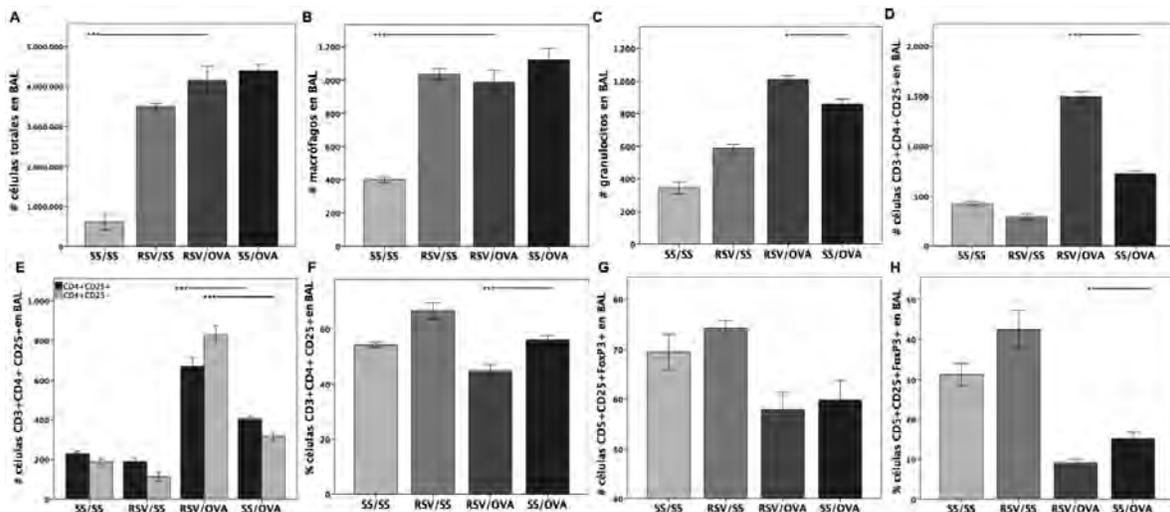
Una vez analizado el parámetro de células totales, granulocitos y macrófagos en BAL, evaluamos la frecuencia poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> en el BAL.

Al igual que lo encontrado en el tejido pulmonar, en el grupo de ratones RSV/OVA se observaron el doble de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que los ratones SS/OVA ( $p < 0.005$ ), y el triple que los ratones SS/SS y RSV/SS ( $p < 0.005$  para ambos grupos) (figura 13D). En el caso de los ratones SS/OVA, estos tuvieron 1.7 y 2.5 veces más de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que los ratones SS/SS y RSV/SS (figura 13D,  $p < 0.005$  contra cada grupo). A pesar de que en ambos grupos de ratones alergenizados se incrementó la cantidad de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en el BAL, la magnitud del incremento en el grupo RSV/OVA fue mayor que en el grupo SS/OVA.

En el caso de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, los resultados del BAL fueron similares a los obtenidos en el tejido pulmonar. En el grupo RSV/OVA, el 55% de los linfocitos T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> eran CD25<sup>-</sup> (figura 13F,  $p < 0.005$  contra los tres grupos). Para los grupos SS/SS, RSV/SS y SS/OVA, la mayoría de los linfocitos T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> eran CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (54%, 67% y 56% respectivamente). Los resultados mencionados en los dos últimos

párrafos son congruentes con la atenuación del infiltrado pulmonar y también con la disminución de la expresión de citocinas/quimiocinas en los ratones RSV/OVA. Al igual que con los resultados de pulmón, una limitante en nuestro estudio sería que no se evaluó la funcionalidad de estas poblaciones celulares.

En cuanto a la subpoblación de linfocitos T  $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ , encontramos que el proceso de sensibilización respiratoria disminuyó la frecuencia de esta población en el BAL (figura 13G y H). Al igual que lo observado en tejido pulmonar, el grupo con el menor porcentaje de estas células fue de los ratones RSV/OVA, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en comparación con los otros tres grupos ( $p < 0.05$  contra el grupo SS/OVA,  $p < 0.005$  contra el grupo SS/SS y contra el grupo RSV/SS). La serie de resultados mostrados en las figuras 12 a 14, sugieren que es muy poco probable que las diferencias en la cantidad de linfocitos T  $CD4^+$ ,  $CD4^+ CD25^+$  y  $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$  observadas en la vía aérea de los ratones sean un artefacto.



**Figura 13. Análisis de las células totales, macrófagos, granulocitos y linfocitos T  $CD4^+$  localizados en el BAL.** (A) media del número de células totales, (B) macrófagos, (C) granulocitos, (D) linfocitos T  $CD4^+$ . (E) Media de la subpoblación de linfocitos T  $CD4^+ CD25^-$  y T  $CD4^+ CD25^+$ , (F) porcentaje de la población de linfocitos T  $CD4^+ CD25^+$ . Número total (G) y porcentaje (H) de la población de  $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$  en BAL. Las células se analizaron mediante citometría de flujo, resultados representativos de tres experimentos independientes ( $n = 4$  ratones por grupo/experimento). Se realizó la prueba de ANOVA con la corrección *post hoc* de Bonferroni ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.005$ ).

- 10.5 - *Análisis de la expresión relativa de mRNA en pulmón.*

El cuarto objetivo específico de esta tesis era determinar si en nuestro modelo, la infección neonatal con el RSV modificó la polaridad y magnitud de la respuesta inmune tipo Th. Para lo cual, primero se analizó la expresión relativa del mRNA de los siguientes mensajeros: IL-4, IL-10, IL-12b, IL-13, CCL5 (RANTES), CCL11 (Eotaxina-1), CCL24 (Eotaxina-2) e INF $\gamma$  (figura 14, tabla 8 y 9).

Para la detección de estos mensajeros se utilizaron oligonucleótidos ya previamente diseñados, estandarizados y optimizados para la técnica de qPCR-Syber Green por el laboratorio del Dr. Eduardo A. García Zepeda. En la tabla 3 (materiales y métodos), se detallan las secuencias de los oligonucleótidos empleados. Todos los resultados se obtuvieron de tejido pulmonar homogeneizado, los niveles de expresión se calcularon mediante la fórmula  $2^{-(\Delta Ct)}$ , y como referencia para el cálculo de la expresión relativa se utilizó el grupo de ratones control o (SS/SS).

En los ratones SS/OVA, los mensajeros con mayor expresión relativa fueron los de las quimiocinas CCL11 y CCL24, cuya expresión relativa fue 156.6 y 267.9 veces mayor que en el grupo de control (figura 14F y 13G). En cuanto a la expresión relativa de CCL5, IL-4 e IL-13, esta fue 21.5, 33.3 y 21.1 veces mayor con respecto al grupo control (figura 14C a E). La sobre-expresión de los mensajeros asociados con la respuesta inmune tipo Th2 y en particular la sobre-expresión de CCL11 y CCL24, son resultados que concuerdan con inflamación pulmonar inducida por OVA. Así mismo, estos resultados son congruentes con los hallazgos histopatológicos.

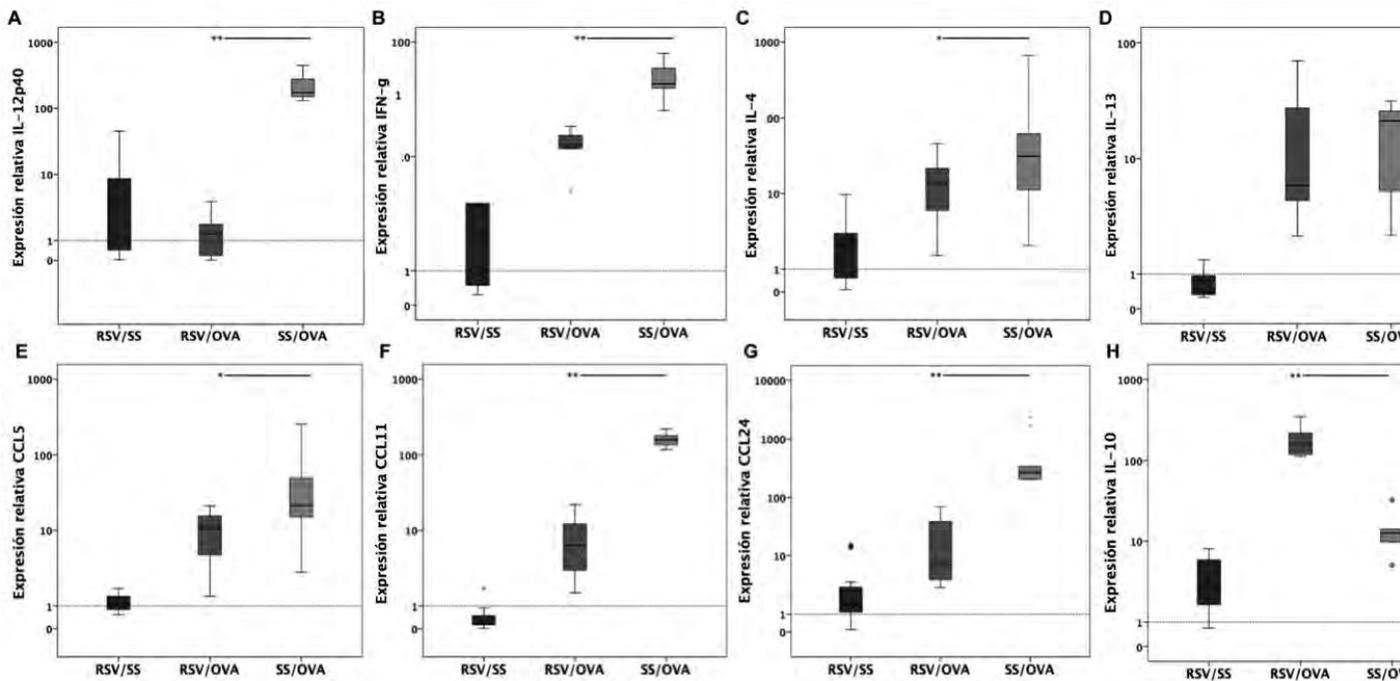
Al evaluar la expresión relativa de los mensajeros de la respuesta tipo Th1 en los ratones SS/OVA, encontramos que la expresión relativa de IL-12b e INF $\gamma$  fueron 172.4 y 43.1 veces mayor que en el grupo de referencia (figura 14A y 14B). En el caso del mRNA de IL-10, su expresión relativa fue 10.8 veces mayor en el grupo SS/OVA que en el grupo SS/SS (figura 14H). Aunque de primera intención, el incremento en los mensajeros tipo Th1 pudiera parecer contradictorio con el proceso de inflamación alérgica pulmonar, ya se ha descrito en la literatura que dicha sobre-expresión funciona como un mecanismo regulatorio de la respuesta inmune tipo Th2 <sup>120,121</sup>.

En los pulmones de los ratones RSV/OVA se detectó sobre-expresión de los mensajeros de IL-4, IL-13, CCL5, CCL11, CCL24 e INF $\gamma$  (figura 14 y tabla 8). Sin embargo, los niveles de expresión de dichos mensajeros fueron entre 2 y 38 veces menores que lo registrado en los ratones SS/OVA (tabla 9). A pesar de la atenuación en la magnitud de la sobre-expresión relativa de estos mensajeros, los resultados de qPCR son congruentes con el proceso de inflamación pulmonar inducido por OVA y con los resultados mostrados en las dos secciones previas. Cabe mencionar, que este es el primer trabajo que muestra que la infección neonatal por el RSV disminuyó la expresión relativa de CCL11 y CCL24, quimiocinas involucradas con el proceso de inflamación alérgica de la vía aérea.

El único mensajero no sobre-expresado en los ratones RSV/OVA, fue el de IL-12b (figura 14A), la expresión relativa de este mensajero fue prácticamente igual a la del grupo control (1.2 veces con respecto al SS/SS). El nivel expresión relativa de IL-12b se redujo 136 veces en comparación con lo obtenido en los ratones SS/OVA (tabla 9). Este resultado es congruente con la disminución en la expresión de células CD25<sup>+</sup> en tejido pulmonar.

En el caso del mensajero de IL-10, su expresión relativa en relación con los ratones SSSS fue 158.1 veces mayor, 55.4 veces mayor que en los ratones RSV/SS, y 12.5 veces mayor que en los ratones SS/OVA (figura 14H). Esta sobre-expresión pudiera considerarse como otro de los resultados más relevantes de este proyecto. El incremento en los niveles de esta citocina junto con la supresión de IL-12b, podrían explicar la atenuación del infiltrado inflamatorio pulmonar y la disminución en la expresión de la molécula de superficie CD25.

En congruencia con el infiltrado inflamatorio pulmonar observado en los ratones RSV/SS, siete semanas después de la infección todavía fue posible detectar sobre-expresión de los mensajeros de IL-12b, INF $\gamma$  e IL-10 (figura 14A, 14B, 143H y tabla 8). El resto de los mRNA analizados no se sobre-expresaron. Aunque en la actualidad, el análisis de la expresión relativa de mRNA es ampliamente utilizado, su principal limitante recae en el hecho de que no siempre existe una correlación entre el grado de transcripción con el de traducción.



**Figura 14. Expresión relativa de citocinas y quimiocinas en el tejido pulmonar.** Expresión relativa del mRNA de: (A) IL-12b, (B)  $\text{INF}\gamma$ , (C) IL-4, (D) IL-13, (E) CCL5 o RANTES, (F) CCL11 o Eotaxina 1, (G) CCL24 o Eotaxina 2, y (H) IL-10. Resultados representativos de tres experimentos independientes ( $n = 4$  ratones por grupo/experimento). El gen endógeno utilizado fue GADPH, la expresión de mRNA fue analizada con el método  $2^{-(\Delta\text{Ct})}$  y la expresión relativa se calculó con respecto al grupo SS/SS. La prueba estadística utilizada fue la U de Mann-Whitney (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.0005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )

Grupo	IL-12b*	$\text{INF}\gamma$ ***	IL-4***	IL-13**	IL-10**	CCL5**	CCL11***	CCL24***
RSV/SS	3.44	2.10	1.14	0.57	2.85	1.05	0.27	1.48
RSV/OVA	1.26	12.55	13.93	6.08	158.11	10.84	6.28	6.96
SS/OVA	172.44	43.12	31.33	21.17	12.63	21.56	156.64	267.94
SS/SS	1	1	1	1	1	1	1	1

Resultados obtenidos de tres experimentos independientes ( $n=4$  por grupo y por experimento). El gen endógeno utilizado fue GADPH, la expresión de mRNA fue analizada con el método  $2^{-(\Delta\text{Ct})}$  y la expresión relativa se calculó con respecto al grupo SS/SS. La prueba estadística utilizada fue la de Kruskal Wallis: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

IL-12b	$\text{INF}\gamma$	IL-4	IL-13	CCL5	CCL11	CCL24
136.8	3.4	2.2	3.4	2.2	34.9	38.4

Esta razón se obtuvo mediante el siguiente cálculo: [media de la expresión relativa del grupo [SS/OVA]/ [media de la expresión relativa del grupo RSV/OVA].

- 10.6 - *Análisis de las concentración de IL-4, IL-12p40 y CCL5 en BAL y suero.*

Tanto para complementar el cuarto objetivo específico de esta tesis como para corroborar el patrón de resultados obtenidos mediante qPCR, se analizaron las concentraciones de IL-4, IL-12p40, CCL5 y CCL11 en suero y BAL.

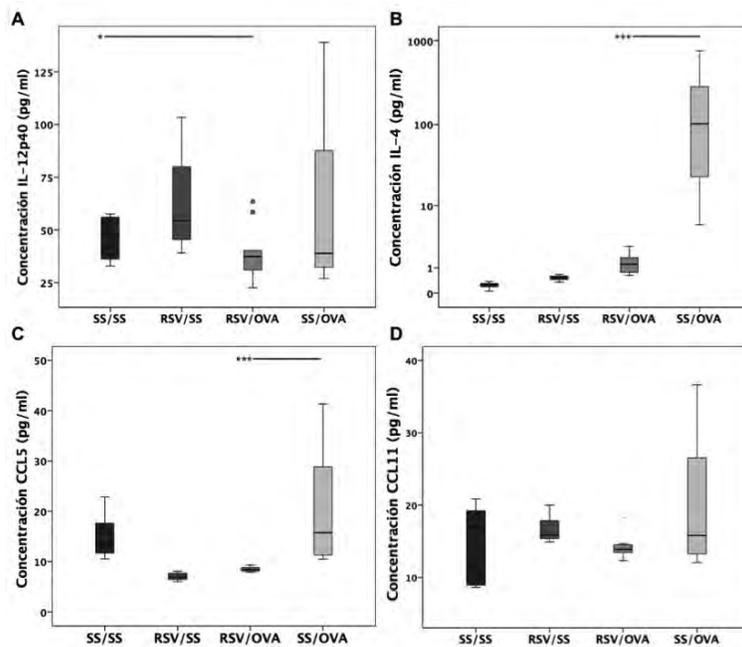
Como era de esperarse, en los ratones SS/OVA se encontró incrementada la concentración de IL-4 en BAL (figura 15B, tabla 10) y de IL-4 y CCL11 en suero (figura 16B y 16D, tabla 11). Con respecto a los ratones SS/SS, el incremento de estas moléculas en los ratones SS/OVA y SS/SS fueron significativos ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.05$ , y  $p < 0.05$ , respectivamente). Estos resultados también son congruentes con lo observado para este grupo mediante las técnicas de qPCR e histopatología pulmonar.

Las concentraciones de IL-4, IL-12p40 y CCL5 en BAL de los ratones RSV/OVA fueron significativamente menores que en el grupo SS/OVA (figura 15A-C, tabla 10). Aunque la concentración de CCL11 en el BAL de los ratones RSV/OVA fue menor que en los SS/OVA, esta no alcanzó diferencia significativa (figura 16D). Al analizar los niveles de IL-4 y CCL11 en suero, encontramos que estos fueron similares a los registrados en los ratones SS/OVA (figura 16B y 16D, tabla 11). En congruencia con los resultados de qPCR obtenidos en el tejido pulmonar, la infección neonatal previa a la exposición a OVA disminuyó las concentraciones de IL-4, IL-12p40 y CCL5 en el BAL.

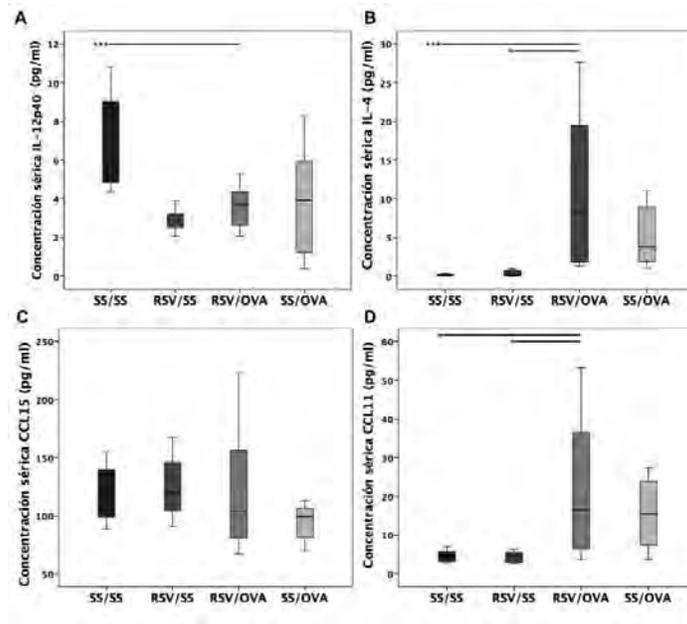
En cuanto a la concentraciones de IL-12p40 en suero en los tres grupos experimentales, esta fue mínima y se encontró cerca del límite de detección del sistema empleado (figura 16A y tabla 11). Una primera limitante de esta sección de resultados pudiera ser el pequeño número de ratones empleados, ya que por razones técnicas únicamente se analizaron 10 ratones por grupo. Por lo cual un análisis con mayor un número de ratones pudieran disminuir la dispersión de los datos y por lo tanto mostrar mayores diferencias estadísticas. Una segunda limitante es el reducido número de citocinas/quimiocinas analizadas; el medir un mayor número de moléculas efectoras del sistema inmune nos podría dar pauta a la generación de otro proyecto de investigación.

En los ratones SS/OVA, los resultados arriba mencionados junto los de histopatología, el incremento de la celularidad en el BAL, la elevada sobre-expresión relativa de

citocinas/quimiocinas en pulmón y el incremento en las concentraciones de IL-4 y CCL5, es posible concluir que en estos ratones el proceso de sensibilización respiratoria a OVA sí generó inflamación pulmonar. En el caso de los ratones RSV/OVA, estos resultados confirman que la infección neonatal participa en la atenuación de la respuesta inflamatoria pulmonar inducida por OVA.



**Figura 15. Concentración de IL-4, IL-12p40, CCL5 y CCL11 en BAL.** Concentración en pg/mL de: (A) IL-12b, (B) IL-4, (C) CCL5, (D) CCL1. Resultados representativos de dos experimentos independientes ( $n = 10$  ratones por grupo/experimento). La prueba estadística utilizada fue la U de Mann-Whitney ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.0005$ ,  $***p < 0.001$ ).



**Figura 16. Concentración séricas de IL-4, IL-12p40, CCL5 y CCL11 en suero.** Concentración en pg/mL de: (A) IL-12b, (B) IL-4, (C) CCL5, (D) CCL1. Resultados representativos de dos experimentos independientes ( $n = 10$  ratones por grupo/experimento). La prueba estadística utilizada fue la U de Mann-Whitney (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.0005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Tabla. 10 Concentración de citocinas y quimiocinas en BAL (pg/ml)				
Grupo	IL-4****	IL-12p40	CCL5	CCL11*
RSV/SS	0.5	51.1	6.9	14.5
RSV/OVA	1.2	37.3	8.4	13.6
SS/OVA	103.0	38.3	15.7	14.5
SS/SS	0.27	48.1	13.2	16.8

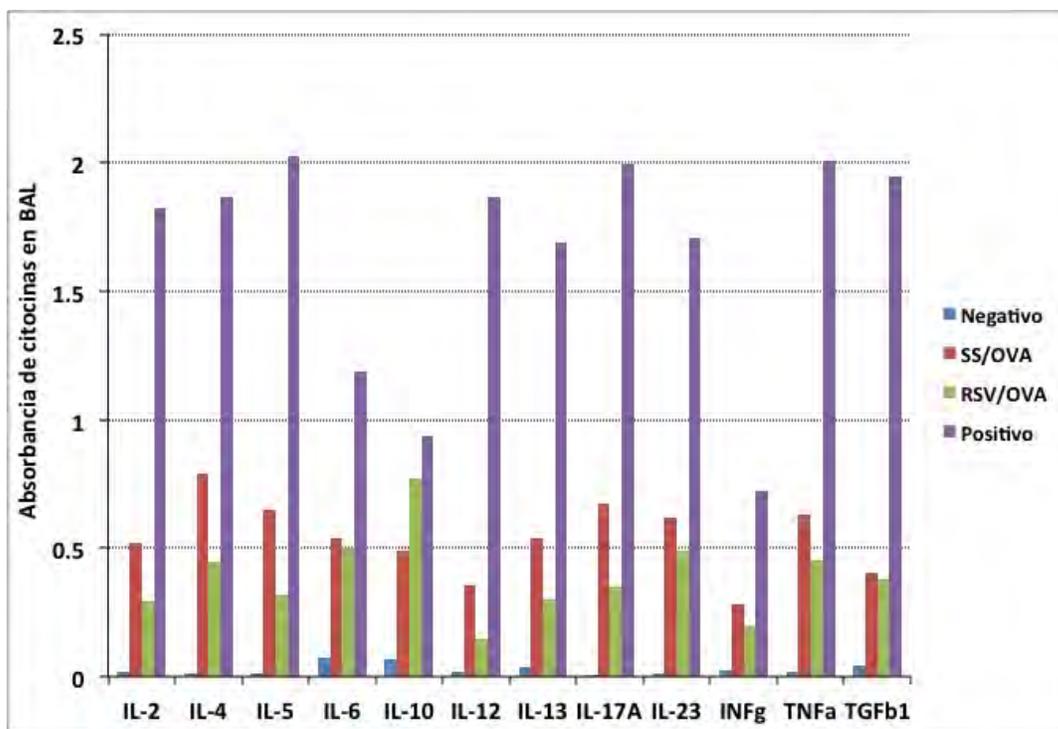
Prueba de medianas independientes: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ . El límite de detección de IL-4 era de 0.4 pg/ml

Tabla. 11 Concentración de citocinas y quimiocinas en suero (pg/ml)				
Grupo	IL-4**	IL-12p40**	CCL5	CCL11*
RSV/SS	0.8	2.7	108.4	4.4
RSV/OVA	8.3	3.6	104.1	16.5
SS/OVA	3.8	3.9	994	15.5
SS/SS	0.4	6.7	118.8	4.4

Prueba de medianas independientes: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ . El límite de detección de IL-4 era de 0.4 pg/ml, de IL-12p40 es de 3.9 pg/ml

Mediante un ensayo de ELISA múltiple que detecta citocinas tipo Th1/Th2/Th17, se analizó un *pool* de muestras de BAL de los grupos de ratones RSV/OVA y de los SS/OVA (figura 17). Este análisis mostró que la absorbancia de las citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-23, INF- $\gamma$ , y TNF $\alpha$  fue mayor en el *pool* de ratones SS/OVA que en los

ratones RSV/OVA. Para IL-6 y TGF- $\beta$ 1 ambos grupos de ratones mostraron niveles de absorbancia similar. En el caso de IL-10, esta fue la única citocina cuya absorbancia fue mayor en el grupo RSV/OVA que en el SS/OVA. Este ensayo tuvo dos grandes limitantes: la primera fue que el análisis se realizó a un *pool* o conjunto de muestras, y no a cada muestra por separado; la segunda fue que debido al número de pozos disponibles en el ensayo únicamente se pudo evaluar a dos grupos de ratones.



**Figura 17. Absorbancia de citocinas tipo Th1/Th2/Th17 en BAL.** Absorbancia absoluta de citocinas analizadas en un *pool* de muestras de BAL de los ratones SS/OVA y RSV/OVA

- 10.7 - Análisis de la población de linfocitos  $T CD4^+ CD25^+$  y de  $T CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$  en ganglios torácicos.

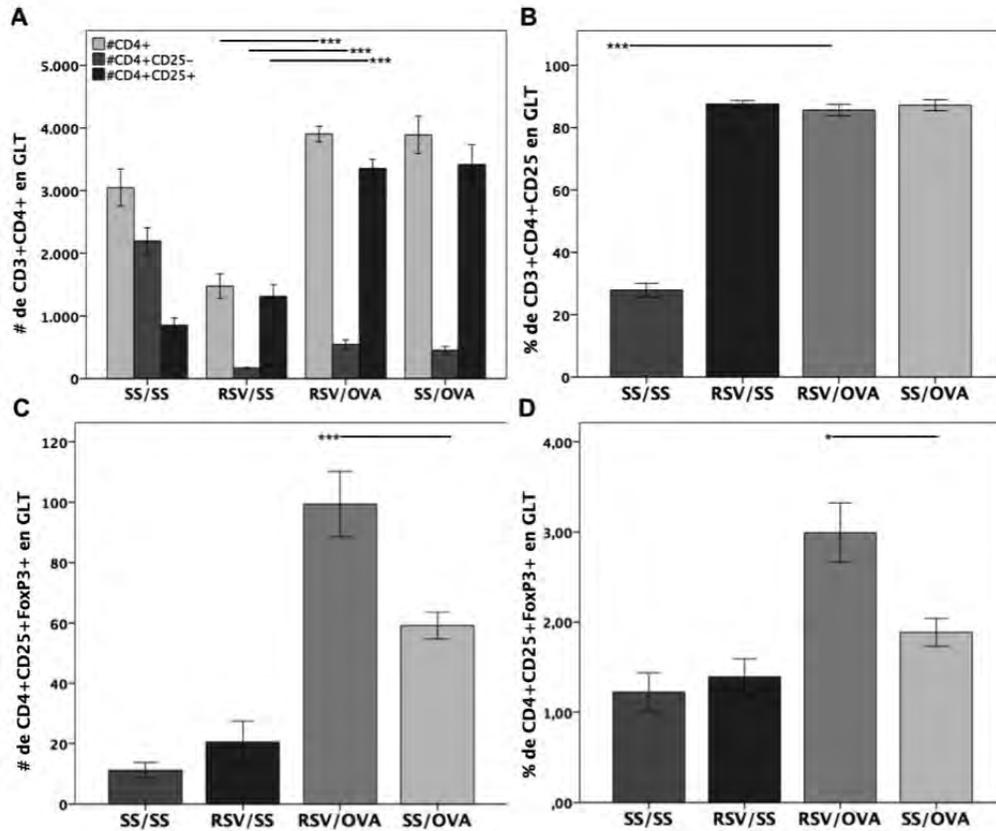
Finalmente y después de observar la reducción en la cantidad y porcentaje de los linfocitos  $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$  observada en la vía aérea de los ratones RSV/OVA, analizamos tanto la población de linfocitos  $T CD4^+$  como sus subpoblaciones de células  $CD4^+ CD25^+$  y  $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$  presentes en los ganglios linfáticos torácicos. De manera acorde a la presencia de un proceso inflamatorio agudo, en ambos grupos de ratones alergenizados se observó la mayor cantidad de las células  $T CD4^+$ . Esta diferencia fue significativa en

comparación con los otros dos grupos de ratones (figura 18A,  $p < 0.01$  vs SS/SS, y  $p < 0.005$  vs RSV/SS).

En los grupos SS/OVA y RSV/OVA, la subpoblación de linfocitos  $CD4^+ CD25^+$  fue 3.5 veces mayor que en los dos grupos de ratones no alergenizados (figura 18A,  $p < 0.01$  vs SS/SS, y  $p < 0.005$  vs RSV/SS). Al analizar el porcentaje de células  $CD4^+ CD25^+$  con respecto a la población de células  $CD4^+$  totales, encontramos que el 80% de los linfocitos T  $CD4^+$  en los ratones RSV/OVA y SS/OVA eran  $CD4^+ CD25^+$  ( $p < 0.005$  con respecto con respecto al grupo SS/SS). En el caso de los ratones RSV/SS, a pesar de ser el grupo con la menor cantidad de linfocitos T  $CD4^+$  en ganglios torácicos, el porcentaje de células que expresaron la molécula de superficie CD25 fue similar a lo registrado en ambos grupos de ratones sensibilizados (figura 18B).

Al contrario de lo observado en la vía aérea de los ratones RSV/OVA, el grupo con el mayor número y porcentaje de linfocitos T  $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$  en los ganglios linfáticos torácicos fue el RSV/OVA (figura 18C y 18D,  $p < 0.0001$  en comparación con los otros tres grupos). En estos ratones, la subpoblación de células T  $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$  fue 1.6 veces mayor que en los ratones SS/OVA, 5 veces mayor que en los ratones RSV/SS y 10 veces mayor que en los ratones SS/SS.

La principal limitante de esta sección fue el hecho de que no se analizó la función de los linfocitos T  $CD4^+$  detectados. A pesar de esto, los resultados mostrados en la figura 18 nos pudieran explicar la atenuación observada durante el proceso inflamatorio pulmonar inducido por OVA en los ratones infectados neonatalmente por el RSV. Esta atenuación pudiera deberse a la actividad regulatoria de las células T  $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$  localizadas en los ganglios torácicos.



**Figura 18. Frecuencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> en ganglios linfáticos torácicos.** (A) Media de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, (B) porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> con respecto al número total de célula T CD4<sup>+</sup>, (C) media del número total y (D) porcentaje de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> en ganglios torácicos. Las células se analizaron mediante citometría de flujo, resultados representativos de tres experimentos independientes ( $n = 4$  ratones por grupo/experimento). Se realizó la prueba de ANOVA con la corrección *post hoc* de Bonferroni (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ ).

## 11. Discusión

En este estudio evaluamos el efecto de la infección neonatal por el RSV sobre el proceso de inflamación pulmonar generado por OVA. En los ratones infectados y alerginizados, encontramos que el antecedente de la infección neonatal por el RSV redujo la magnitud del infiltrado inflamatorio pulmonar generado por OVA, disminuyó el porcentaje de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> presente en la vía aérea, y atenuó tanto la expresión como la concentración de las citocinas y quimiocinas tipo Th1 y Th2 detectadas en la vía aérea. En nuestra hipótesis, la infección neonatal por el RSV previa al proceso de sensibilización respiratoria con OVA, disminuiría la respuesta inflamatoria pulmonar inducida por el alérgeno respiratorio. Por lo tanto los resultados arriba mencionados comprueban dicha hipótesis.

Antes de analizar el efecto de la infección sobre el proceso de sensibilización con OVA fue necesario determinar si los ratones neonatos se infectaban con el RSV. Para determinar esto se emplearon dos estrategias, la primera fue saber si la curva de crecimiento de los ratones neonatos se modificaba durante la infección; la segunda fue detectar el genoma viral en el tejido pulmonar homogeneizado. En concordancia con los resultados publicados en la literatura, entre el segundo y séptimo día posteriores a la inoculación, el grupo de ratones infectados ganaron menos porcentaje peso que los ratones no infectados <sup>76,84,100</sup>. En congruencia con el dato del retraso en la ganancia de peso, únicamente fue posible detectar el genoma viral en el tejido pulmonar de los ratones inoculados con el RSV.

Debido a que nos interesaba saber si en los ratones neonatos se podría llegar a establecer infección crónica o latente por el RSV, se utilizó la reacción de PCR que amplificara únicamente el genoma viral. Para esto se diseñaron un par de oligonucleótidos que se anidaran entre el extremo 5' - del gen P del RSV y el extremo 3' - de la región no codificante de dicho gen (GE-P). Por lo cual, el producto obtenido de la PCR únicamente podría provenir del genoma viral y no del mRNA viral. Esta conclusión es apoyada por el hecho de que únicamente fue posible obtener un producto de amplificación al sintetizar el cDNA con hexámeros al azar y no con oligodT.

El genoma viral únicamente fue detectado durante la infección aguda y no fue detectado en los ratones adultos. Por lo cual proponemos que las modificaciones observadas durante la respuesta inmune pulmonar inducida por OVA, son consecuencia del microambiente pulmonar generado durante la infección neonatal por el RSV, y no se deben a la presencia de una infección crónica o latente por el RSV. Con los resultados de la curva de ganancia de peso y de la amplificación del genoma en el tejido pulmonar podemos concluir que los ratones Balb/c neonatos fueron permisivos a la infección por el RSV. Por lo cual consideramos que las modificaciones en la respuesta inmune inducida por la OVA en el ratón adulto, son una consecuencia de la respuesta inmune neonatal contra el virus y no de la magnitud de la replicación del RSV.

La detección del RSV en nuestro proyecto tiene dos limitantes. La primera es que no se cuantificó la carga viral; esto no fue posible realizarlo ya que se desconoce la sensibilidad, especificidad y el rango dinámico de los oligonucleótido diseñados. La segunda es que no se detectó la presencia de proteínas virales en el tejido pulmonar homogeneizado; a pesar de contar con anticuerpos contra el RSV que funcionaron tanto mediante inmunofluorescencia indirecta como en Western Blot, en cultivo celular, estos anticuerpos mediante Western Blot no detectaron las proteínas virales en el tejido pulmonar.

El principal resultado obtenido en este trabajo fue que como consecuencia de la infección neonatal por el RSV, se redujo la magnitud del infiltrado inflamatorio pulmonar generado durante el proceso de sensibilización respiratoria a OVA. Este resultado pudiera ser interpretado de dos maneras. Una primera interpretación sería que como consecuencia de la infección neonatal por el RSV, se atenuó la respuesta inflamatoria dependiente de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>. Una segunda explicación sería que la reducción en la magnitud del infiltrado inflamatorio fuera consecuencia de una inhibición subóptima dependiente de las células Treg. Las diferencias observadas entre nuestro trabajo con respecto a lo publicado en la literatura, pudieran deberse principalmente a tres factores; la edad de infección, el hecho de que la infección ocurrió antes del inicio del proceso de sensibilización con OVA, y el intervalo de tiempo entre ambos eventos <sup>35,77,79,82,88,89,93,101</sup>.

Dentro del contexto de la asociación entre el RSV y el asma, es importante tomar en cuenta que la respuesta inmune generada contra este virus tanto en humanos como en ratones,

depende de la edad de infección. El tipo y la magnitud de la respuesta inmune inducida por el RSV es muy diferente entre los ratones adultos y los neonatos. En los ratones adultos la infección por RSV genera pérdida de peso; induce altas concentraciones de citocinas tipo Th1 y Th2; y causa abundante infiltrado inflamatorio pulmonar. En cambio, en los ratones neonatos la enfermedad pulmonar es menos severa; el ratón no pierde peso, únicamente retrasa la ganancia de peso; la carga viral es menor que en el ratón adulto; las concentraciones de citocinas son bajas con predominio de IL-10 e IL-4; y finalmente, el infiltrado inflamatorio pulmonar es de menor intensidad que en el ratón adulto <sup>73,76,77,81,83-85,100,102,103</sup>.

A la par con lo anterior, la disminución del infiltrado inflamatorio pulmonar, de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> y de la expresión de citocinas/quimiocinas, podrían estar explicados por el hecho de que la edad infección determina la respuesta inmune mediada por linfocitos T. Este fenómeno alteraría tanto la dinámica como el balance entre las repuestas tipo Th1/Th2, generando una respuesta inmune predominantemente tipo Th2 <sup>76,77,83-85,104</sup>.

El segundo factor a considerar, es el orden de la secuencia de eventos entre infección e inicio del proceso de sensibilización respiratoria. Otros autores han reportado que cuando la infección por el RSV ocurrió durante o después del proceso de sensibilización respiratoria con OVA, la infección potenció la intensidad de la patología pulmonar inducida por OVA <sup>35,77,79,82,86,80,93,101</sup>.

Mientras que son múltiples los estudios que han evaluado el efecto de la infección durante o después del proceso de sensibilización respiratoria, solo hay dos trabajos previos que han evaluado el efecto de la infección antes de iniciar la sensibilización respiratoria a OVA <sup>77,105</sup>. El primero trabajo mostró que la infección siete días previa al proceso de sensibilización respiratoria con OVA ni potenció ni atenuó la patología pulmonar inducida por el alérgeno. Los autores concluyeron que la infección por el RSV antes de iniciar el proceso de sensibilización crónica con OVA protegió al ratón del desarrollo de hiperreactividad de la vía aérea e inflamación pulmonar <sup>77</sup>. En el segundo trabajo, You *et al.*, infectaron ratones neonatos con el RSV y 10 semanas después iniciaron el proceso de sensibilización

respiratoria con OVA <sup>105</sup>. En este trabajo los autores encontraron mediante pletismografía que la infección neonatal disminuyó la función pulmonar de los ratones.

A pesar de la similitud de resultados, el trabajo publicado Peebles *et al.*, y el nuestro tienen grandes diferencias <sup>77</sup>. La primera es que ellos infectan ratones de 8 semanas de vida, nosotros infectamos a ratones de 4 días de vida. La segunda es que ellos esperaron dos semanas entre infección y alergenización, nosotros cuatro semanas. Tercero, ellos emplearon un modelo de alergenización crónica a OVA, nosotros sensibilización aguda. Cuarto, Peebles *et al.*, únicamente valoraron hiperreactividad de la vía aérea, infiltrado eosinofílico pulmonar y producción de IL-13; mientras que nosotros evaluamos la magnitud del infiltrado inflamatorio pulmonar, la frecuencia de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y el microambiente de citocinas/quimiocinas presentes en vía aérea. Otra diferencia, pudiera ser que en este trabajo los autores no propusieron ningún mecanismo que explicara sus resultados, y nosotros sí.

Como un tercer factor a considerar, está el intervalo de tiempo entre la infección neonatal y la sensibilización respiratoria a OVA. Previamente You *et al.*, evaluaron el efecto de la infección neonatal por el RSV 41 días antes de iniciar el proceso de sensibilización crónica a OVA <sup>105</sup>. En este trabajo los autores concluyeron que la infección neonatal por el RSV disminuyó la función pulmonar, lo cual que estaría asociado con la presencia de inflamación pulmonar crónica, incremento en la producción de moco y remodelación de la vía aérea. Las diferencias de los resultados obtenidos por You *et al.*, y nosotros se pueden explicar por dos factores. El primero es que el protocolo de sensibilización OVA fue diferente; nosotros empleamos un modelo de sensibilización respiratoria aguda y ellos emplearon un modelo crónico. El segundo factor es el periodo de tiempo entre la infección y el inicio de la sensibilización con OVA; mientras que nosotros solo esperamos 4 semanas entre ambos eventos, ellos esperaron 10 semanas. Tomando en cuenta dichas diferencias, la relevancia de nuestro modelo recae en el hecho de que demostramos que siete semanas después de haber infectado a los ratones todavía se observa un infiltrado inflamatorio pulmonar residual, el cual pudiera relacionado con la disminución de la respuesta inmune inducida por OVA.

Existe un segundo estudio donde se evaluó el efecto de la infección neonatal con el *pneumonia virus of mice* (PVM) 28 días antes del inicio de la sensibilización respiratoria con OVA. Aunque el PVM es un Paramyxovirus específico del ratón, debido a su estrecha homología con el RSV, este virus murino se ha utilizado para estudiar los efectos o consecuencias de una infección semejante al RSV. En este estudio encontraron que la infección por PVM antes de la sensibilización respiratoria con OVA potenció la inflamación pulmonar <sup>106</sup>. En contraste, nosotros encontramos que la infección neonatal por el RSV atenuó la magnitud de la inflamación pulmonar generada por OVA. Estas diferencias pudieran explicarse por varios motivos. Primero, el RSV es un patógeno específico de humanos y el PVM es específico de ratones. Segundo, dosis de PVM necesaria para generar enfermedad severa es menor que la dosis requerida con el RSV. Tercero, la viremia generada por el PVM es mayor que la viremia por RSV. Cuarto, en los ratones la infección por RSV es menos agresiva que la infección por PVM. Por lo cual, las diferencias observadas entre estos modelos probablemente se deben a las diferencias en la magnitud de la respuesta inmune generada por estos virus.

En nuestro trabajo, tanto la supresión en la sobre-expresión del mRNA de IL-12b en el tejido pulmonar como la disminución en las concentraciones de IL-12p40 en BAL, pudieran los resultados más sorprendentes. IL-12 es una citocina que se relaciona con el mantenimiento y la inducción de la respuesta inmune tipo Th1. Esta citocina provee señales adicionales que ayudan a la proliferación y activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Así mismo, incrementa la duración y grado de expresión de la molécula CD25 en las los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> <sup>107-110</sup>. Por lo tanto, la disminución en la frecuencia de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> en la vía aérea de los ratones pudiera ser una consecuencia de la disminución de IL-12.

Para demostrar que en nuestro modelo la disminución de IL-12 esta relacionada con la reducción de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> en la vía aérea, proponemos un nuevo proyecto. Como primera estrategia para dicho proyecto, a los ratones se les administraría anticuerpos contra IL-12 durante la administración de OVA. Como segunda estrategia, se pudieran utilizar ratones KO para IL-12. Finalmente, la tercer estrategia sería

administrar IL-12 a los ratones durante el proceso de sensibilización y reto con OVA. En estos tres escenarios se evaluaría sí el bloqueo, ausencia o suplementación de IL-12 modifica la expresión de CD25.

Es posible que la disminución en la expresión y concentración de IL-12 en los ratones RSV/OVA se expliquen por la sobre-expresión de IL-10 que se registro en el tejido pulmonar. IL-10 es una citocina reguladora con efectos pleiotrópicos en el sistema inmune. Siendo sus funciones más importantes las de: 1) reducir la producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias; 2) inhibir en las células T la producción de citocinas; 3) suprimir la expresión de MHC-II, CD40, DC80 y CD96; 4) disminuir la activación y proliferación de células T; y 5) promover una respuestas inmune predominantemente tipo Th2 <sup>65,77,81,83-85,95,104,111-118</sup>.

Acorde con lo antes descrito, se ha reportado que en co-cultivos de células presentadoras de antígeno (APC) murinas con clonas de células tipo Th1, la presencia de IL-10 e IL-4 inhiben la producción de IL-12. Por otra parte, durante la infección *in vivo* con *Listeria monocytogenes*, la presencia de IL-10 e IL-4 determinan el fenotipo Th que tendrán los linfocitos T que están en desarrollo <sup>65,77,118</sup>. Tomando en cuenta estos antecedentes, y con el objetivo de valorar sí la función de las células APC se modifica debido a la infección por el RSV, proponemos realizar estudios *in vitro* en los cuales primero se obtengan células APC de ratones adultos que fueron infectados neonatalmente con el RSV. Posteriormente, se realizarían co-cultivos de células APC con linfocitos T, en las cuales se analizaría la capacidad de generar respuestas tipo Th y el fenotipo de dichas respuestas.

Como una explicación complementaria a la disminución de la subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> en la vía aérea de los ratones infectados y alergenizados, hay que considerar el efecto del RSV sobre el proceso de sinapsis inmune entre APC y las células T. *In vitro*, en las DC infectadas por el RSV se ha demostrado disminución en la formación de la sinapsis inmune entre la APC y el linfocito T *naïve*. Este impedimento reduce la proliferación y activación de los linfocitos T. En congruencia con nuestros resultados, otros autores ha reportado que la infección por el RSV disminuye la expresión de CD25 en linfocitos T y que esta disminución correlaciona con la severidad de la infección <sup>46,65,119</sup>.

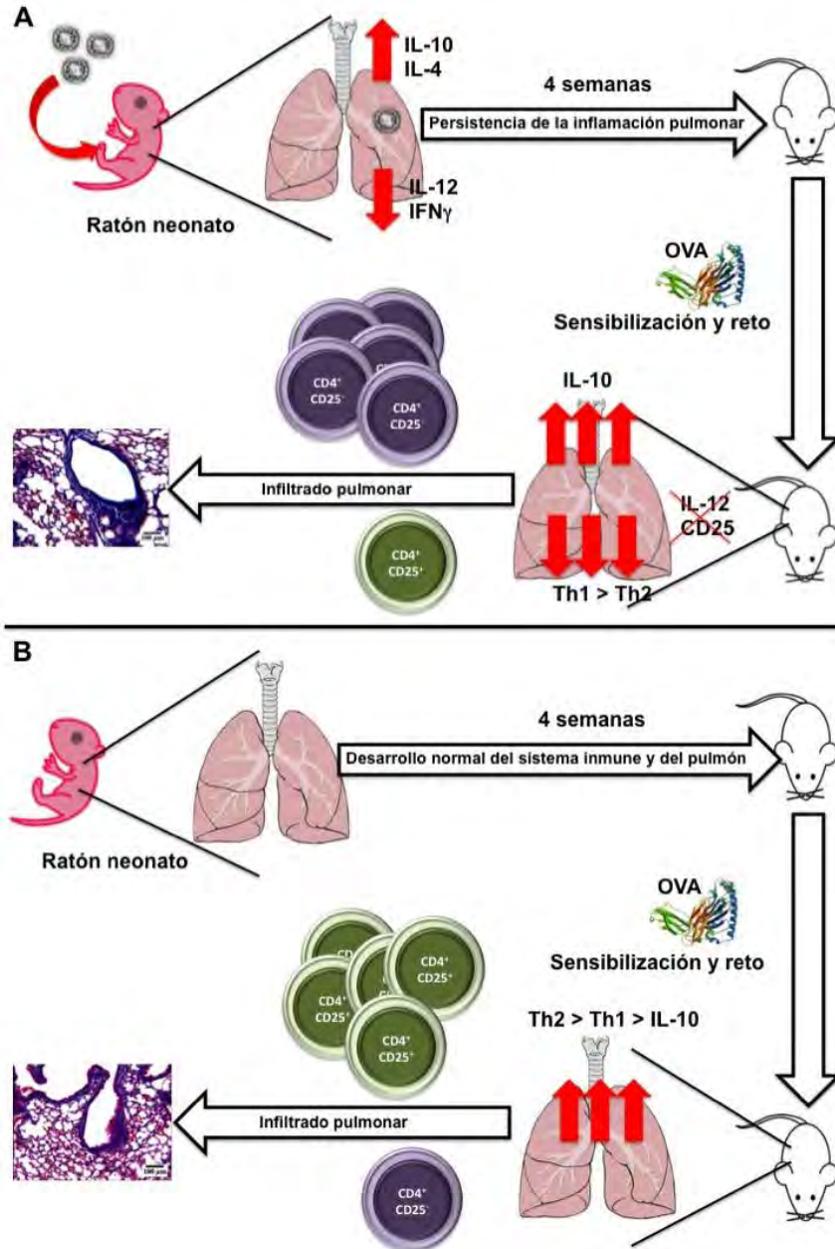
En el caso de los ratones SS/OVA, al analizar todos los resultados disponibles podemos concluir que la sensibilización a OVA sí generó un fenómeno inflamatorio pulmonar. De todos estos resultados, uno de los más interesantes a destacar es el incremento en la expresión relativa de IL-12 e INF $\gamma$  en el tejido pulmonar. Este incremento no es contradictorio con el proceso de inflamación pulmonar inducido por OVA, por el contrario, ya se ha reportado que la presencia de IL-12 forma parte del proceso de regulación de la respuesta inmune inducida por OVA <sup>120,121</sup>.

Por otra parte, aunque en la literatura se ha considerado que la infección por el RSV es un proceso agudo, ya otros trabajos han reportado que el infiltrado inflamatorio pulmonar en los ratones Balb/c puede persistir entre 42 y 154 días después de la infección <sup>72,74,90,92</sup>. Estos trabajos son coherentes con los resultados de histopatología de los ratones RSV/SS, en los cuales, 49 días después de la infección no solo fue posible detectar la presencia del infiltrado inflamatorio pulmonar, también se visualizaron depósitos de mucina y datos sugerentes de remodelación de la vía aérea. Es posible que este infiltrado inflamatorio pulmonar pudiera estar participando en la atenuación de la respuesta inmune local generada durante la sensibilización a OVA. Aunque no tenemos evidencia de que existan diferencias cualitativas en cuanto la composición del infiltrado inflamatorio pulmonar presente entre los grupos RSV/SS, RSV/OVA y SS/OVA, tanto las diferencias observadas en la expresión y producción de citocinas/quimiocinas, como los resultados del análisis de citometría de flujo del BAL así lo sugieren. Por lo cual proponemos que en un proyecto derivado de este, se pudiera analizar tanto por inmunohistopatología como por citometría de flujo, las diferentes poblaciones de células (y sus fenotipos) que componen dicho infiltrado inflamatorio pulmonar.

Acorde con lo anterior, se observó un moderado incremento en la expresión relativa de los mensajeros de IL-12b e INF $\gamma$  en el tejido pulmonar de estos ratones. De hecho, otros autores ya han publicado que la sobre-expresión de IL-12b puede detectarse hasta 42 días después del inicio de la infección por RSV <sup>74</sup>.

Por lo tanto, proponemos que la infección neonatal por el RSV previa al proceso de sensibilización con OVA influye en la respuesta inmune del ratón adulto ante el alérgeno respiratorio (figura 18). Finalmente, las consecuencias de la respuesta inmune contra el

RSV generadas durante la primera semana de vida tienen un efecto a largo plazo sobre el microambiente pulmonar, el cual afectaría la respuesta inmune local ante un estímulo alérgico no relacionado con el virus.



**Figura 18. Diagrama hipotético del efecto de la infección neonatal con el RSV sobre el proceso de sensibilización respiratoria con OVA.** (A) Se representa el efecto de la respuesta inmune neonatal inducida por el RSV sobre el desarrollo del sistema inmune y del pulmón. En la infección neonatal por RSV predomina la producción de IL-10 e IL-4, el infiltrado inflamatorio pulmonar persiste hasta por 4 semanas. En este grupo se suprimió la expresión de IL-12b, así como se redujo la población de T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, la expresión de citocinas/quimiocinas y el infiltrado inflamatorio pulmonar. (B) En los ratones no infectados el desarrollo del sistema inmune y del pulmón fue normal. En ellos, el proceso de sensibilización y reto con OVA generó un perfil de citocinas/quimiocinas predominantemente Th2 sobre el Th1. En comparación con el grupo RSV/OVA, tanto la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> como el infiltrado inflamatorio pulmonar fue de mayor magnitud.

## 12. Conclusiones

1. Los ratones Balb/c fueron permisivos a la infección neonatal con el RSV.
2. Cuarenta y nueve días después de la infección con el RSV, todavía fue posible documentar la presencia de un proceso inflamatorio pulmonar.
3. En ambos grupos de ratones sensibilizados con OVA, se detectó infiltrado inflamatorio pulmonar con incremento tanto en la expresión como en las concentraciones de citocinas y quimiocinas relacionadas con este proceso.
4. La infección neonatal afectó el proceso inflamatorio pulmonar inducido por OVA, atenuando el infiltrado inflamatorio pulmonar, reduciendo la subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> localizadas la vía aérea, y reprimiendo la expresión de IL-12b.
5. A excepción del mRNA de IL-10, el antecedente de la infección neonatal con el RSV disminuyó la sobre-expresión de todos los mRNA de citocinas y quimiocinas analizados, particularmente los pertenecientes a la respuesta tipo Th1.
6. Finalmente, la respuesta inmune neonatal contra el RSV genera consecuencias de larga duración sobre el microambiente pulmonar. Como parte de estas consecuencias, se modificó el tipo y la magnitud de la respuesta inmune pulmonar inducida por un alérgeno respiratorio no relacionado con el virus.

### 13. Bibliografía

1. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> [última fecha de acceso 7 de Julio del 2015, 15:43].
2. Pullan CR, Hey EN. Wheezing, asthma, and pulmonary dysfunction 10 years after infection with respiratory syncytial virus in infancy. *Br Med J.* 1982;284:1665-1669.
3. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, *et al.* Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet.* 1999;354:541-45.
4. Zambon MC, Stockton JD, Clewley JP, Fleming DM. Contribution of influenza and respiratory syncytial virus to community cases of influenza-like illness: an observational study. *Lancet.* 2001;27;358(9291):1410-6.
5. Nair H, Nokes J, Gessner BD, *et al.* Global burden of acute lower respiratory infection due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2010;375:1545-55.
6. Taboada B, Espinoza MA, ISA P, Aponte FE, Arias-Ortíz MA, *et al.* Is there still room for novel viral pathogens in pediatric respiratory tract infections? *PLoS One.* 2014;9(11):e113570.
7. Collins, P.L. and B.S. Graham, Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Virol.* 2008;82:2040-55.
8. Bennett, B.L., *et al.*, Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis* 2007;195:1532-40.
9. Scott PD, Ochola R, Ngama M, Okiro EA, James Nokes D, *et al.* Molecular analysis of respiratory Syncytial virus reinfections in infants from coastal Kenya. *J Infect Dis.* 2006;193:59-67.
10. Agoti CN, Mwihuri AG, Sande CJ, Onyago CO, Medley CF, *et al.* Genetic relatedness of infecting and reinfecting respiratory Syncytial virus strains identified in a birth cohort from rural Kenya. *J Infect Dis.* 2012;206:1532-41.
11. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory Syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Eng J Med.* 2005;352:1749-59.
12. Falsey AR. Respiratory Syncytial virus infection in adults. 2997;28:171-81.
13. Régnier SA, Huels J. Association between respiratory Syncytial virus hospitalizations in infants and respiratory sequelae: systematic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32:820-6.
14. Welliver RC, Wong DT, Sun M, *et al.* The development of respiratory syncytial virus-specific IgE and the release of histamine in nasopharyngeal secretions after infection. *N Eng J Med.* 1981;305(15)841-846.
15. Welliver RC, Duffy L. The relationship of RSV-specific immunoglobulin E antibody responses in infancy, recurrent wheezing, and pulmonary function at age 7.8 years. *Pediatr Pulmonol.* 1993;15(1):19-27.

16. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B, Björkstén B. Asthma and immunoglobulin E antibodies after respiratory syncytial virus bronchiolitis: a prospective cohort study with matched controls. *Pediatrics*. 1995;95(4):500-505.
17. Busse WW, Banks-Schlegel SP, Larsen GL. Effect of growth and development on lung function. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156:314-319.
18. Balfour-Lynn I. Difficult asthma: beyond the guidelines. *Arch Dis Child*. 1999;80(2):20-16.
19. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1501-1507.
20. Sigurs N, Gustafsson PM, Bjarnason R, *et al*. Severe respiratory bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respirat Care Med*. 2005;171(2):137-141.
21. Jackson DJ, Gangon RE, Evans MD, *et al*. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178:667-672.
22. Korppi M, Piippo-Savolainen E, Korhonen K, Remes S. Respiratory morbidity 20 years after RSV infection in infancy. *Pediatr Pulmonol*. 2004;38:155-160.
23. Holt PG, Sly PD. Interactions between RSV infection, asthma, and atopy: Unraveling the complexities. *J Exp Med*. 2002;196(10):1271-1275.
24. Fjaerli HO, Farstad T, Rød G, *et al*. Acute bronchiolitis in infancy as risk factor for wheezing and reduced pulmonary function by seven years in Akershus Conty, Norway. *BMC Pediatr*. 2005;5:31.
25. Hyvärinen MK, Kotaniemi.Syrjänen A, Reijonen TM, Korhonen K, Korppi MO. Lung function and bronchial hyper-responsiveness 11 years after hospitalization for bronchiolitis. *Acta Paediatr*. 2007;96:1464-1469.
26. Holt PG, Sly PD. Viral infections and atopy in asthma pathogenesis: new rationales for asthma preventions and treatment. *Nat Med*. 2012;18(5):726-735.
27. Strannegard O, Cello J, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Sigurs N. Association between pronounced IgA responses in RSV bronchiolitis and development of allergic sensitization. *Pediatr Allergy Immunol*. 1997;8(1):1-6.
28. Wang SZ, Forysth KD. Asthma and respiratory syncytial virus infection in infancy: is there a link?. *Clin Exp Allergy*. 1998;28(8):927-935.
29. Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, *et al*. Monocyte IL-10 production during respiratory syncytial virus bronchiolitis is associated with recurrent wheezing in a one year follow-up study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(5):1518-1523.
30. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:379-390.
31. Sims DG, Gardner PS, Weightman D, Turner MW, Soothill JF. Atopy does not predispose to RSV bronchiolitis or postbronchiolitic wheezing. *Br Med J*. 1981;282:2086-2088.

32. Henderson J, Hilliard TN, Sherriff A, *et al.* Hospitalization for RSV bronchiolitis before 12 months of age and subsequent asthma, atopy and wheeze: A longitudinal birth cohort study. *Pediatr Allergy Immunol.* 2005;16:386-392.
33. Singleton RJ, Redding GJ, Lewis TC, *et al.* Sequelae of severe respiratory syncytial virus infection in infancy and early childhood among Alaska Native Children. *Pediatrics.* 2003;112:285-290.
34. Murray M, Webb MSC, O'Callaghan C, Swarbrick AS, Milner AD. Respiratory status and allergy after bronchiolitis. *Arc Dis Child.* 1992;67:482-487.
35. Peebles RS Jr, Sheller JR, Johnson JE, *et al.* Respiratory syncytial virus infection prolongs methacholine-induced airway hyperresponsiveness in ovalbumin-sensitized mice. *J Med Virol.* 1999;57:187-192.
36. Cowton VM, McGivern DR, Fearn R. Unravelling the complexities of respiratory Syncytial virus RNA synthesis. *J Gen Virol.* 2006;87:1805-21.
37. Becker Y. Respiratory syncytial virus (RSV) evades the human adaptive immune system by skewing the Th1/Th2 cytokine balance toward increased levels of Th2 cytokines and IgE, markers of allergy-a review. *Virus Genes* 2002;33:235-252.
38. Tran, T.L., *et al.*, The nine C-terminal amino acids of the respiratory syncytial virus protein P are necessary and sufficient for binding to ribonucleoprotein complexes in which six ribonucleotides are contacted per N protein protomer. *J Gen Virol*, 2007;88:196-206.
39. Tran, T.L., *et al.*, The respiratory syncytial virus M2-1 protein forms tetramers and interacts with RNA and P in a competitive manner. *J Virol.* 2009;83:6363-374.
40. Collins, P.L. and J.A. Melero. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Res.* 2012;162: 80-99.
41. Olson, M.R. and S.M. Varga. Pulmonary immunity and immunopathology: lessons from respiratory syncytial virus. *Expert Rev Vaccines.* 2008;7:1239-55.
42. Ramaswamy, M., *et al.*, Specific inhibition of type I interferon signal transduction by respiratory syncytial virus. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;30:893-900.
43. Guerrero-Plata, A., *et al.*, Differential response of dendritic cells to human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;34:320-9.
44. Munir S, Le Nouen C, Luongo C, Buchholz UJ, Collins PL, Bukreyev A. Nonstructural proteins 1 and 2 of respiratory Syncytial virus suppress maturation of human dendritic cells. *J Virol.* 2008;82:8780-96.
45. Asenjo A, Cuesta I, Vivo A, Villanueva N. Phosphorylation of the human respiratory Syncytial virus N protein provokes a decrease in viral RNA synthesis. *Virus Res.* 2012;163:396-400.
46. Céspedes PF, Bueno SM, Ramírez BA, Gomez RS, Riquelme SA, Palavecino CE, *et al.* Surface expression of the hRSV nucleoprotein impairs immunological synapse formation with T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:E3214-23.

47. Lifland AW, Jung J, Alonas E, Zulra C, Crowe Jr JE, *et al.* Human respiratory Syncytial virus nucleoprotein and inclusion bodies antagonize the innate immune response mediated by MDA5 and MAVS. *J Virol.* 2012;86:8245-58.
48. Wei T, Li D, Marcial D, Khan M, Lin MH, *et al.* The eukaryotic elongation factor 1A is critical for genome replication of the Paramyxovirus Respiratory Syncytial Virus. *PLoS One.* 2014;9(12): e114447.
49. Ghildyal R, Mills J, Murray M, Vardaxis N, Meanger J. Respiratory Syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. *J Gen Virol.* 2002;83:753-7.
50. Cheng X, Park HJ, Zhou H, Jin H. *J Virol.* Overexpression of the M2-2 protein of respiratory Syncytial virus inhibits viral replication. *J Virol.* 2005;79:13943-52.
51. Li D, Jans DA, Bardin P, Meanger J, Mills J, Ghildyal R. Association of Respiratory Syncytial Virus M Protein with Viral Nucleocapsids is mediated by the M2-1 protein. *J Virol.* 2008;82:8863-70.
52. Reimers K, Buchholz K, Werchau H. Respiratory Syncytial virus M2-1 protein the activation of nuclear factor kappa B. *Virology.* 2005;331:260-8.
53. Rixon HWM, Brown G, Aitken J, McDonald T, Graham S, *et al.* The small hydrophobic (SH) protein accumulates within lipid-raft structures of the Golgi complex during respiratory Syncytial virus infection. *J Gen Virol.* 2004;85:11153-65.
54. Tayyari F, Marchant D, Moraes TJ, Duan W, Mastrangelo P, *et al.* Identification of nucleolin as a cellular receptor of human respiratory Syncytial virus. *Nat Med.* 2011;17:1132-5.
55. Murawski MR, McGines LW, Finberg RW, Kurt-Jones EA, Massare MJ, *et al.* Newcastle disease virus-like particles containing respiratory Syncytial virus G protein induced protection in Balb/c mice, with no evidence of immunopathology. *J Virol.* 2010;84:1110-23.
56. Fleming EH, Kolokoltsov AA, Davey RA, Nichols JE, Roberts Jr NJ. Respiratory Syncytial virus F envelope protein associates with lipid rafts without a requirement for other virus proteins. *J Virol.* 2006;80:12160-70.
57. Schlender J, Zimmer G, Herrler G, Conzelmann KK. Respiratory Syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. *J Virol.* 2003;77:4509-16.
58. Bukreyev A, Yang L, Fricke J, Cheng L, Ward JM, *et al.* The secreted form of respiratory Syncytial virus G glycoprotein helps the virus evade antibody-mediated restriction of replication by acting as an antigen decoy and thorough effects of Fc Receptor-Bearing leukocytes. *J Virol.* 2008;82:12191-12204.
59. Chirkova T, Boyoglu-Barnum S, Gaston KA, Malik FM, Trau SP, *et al.* Respiratory Syncytial virus G protein CX3C motif impairs human airway epithelial and immune cell responses. *J Virol.* 2013;87:13466-79.
60. Ghildyal R, Li D, Peroulis I, Shields B, Bardin PG, *et al.* Interaction between the respiratory Syncytial virus G glycoprotein cytoplasmic domain and the matrix protein. *J Gen Virol.* 2005;86:1879-84.

61. Harcourt J, Alvarez R, Jones LP, Henderson C, Anderson KJ, *et al.* Respiratory Syncytial virus G protein and G protein CX3C motif adversely affects CX3CR1+ T cell responses. *J Immunol.* 2006;176:1600-1608.
62. Shingai M, Azuma M, Ebihari T, Sasai M, Funami K, *et al.* Soluble G protein of respiratory Syncytial virus inhibits Toll-like receptors 3/4 –mediated INF-beta induction. *Int Immunol.* 2008;20:1169-80.
63. Cowton V, Fearn R. Evidence that the respiratory Syncytial virus polymerase is recruited to nucleotides 1 to 11 at the 3' end of the nucleocapsid and can scan to access internal signals. *J Virol.* 2005;79:11311-22.
64. Espinoza JA, Bohmwald K, Céspedes PF, Riedel C, Bueno SM, *et al.* Modulation of host adaptive immunity by hRSV proteins. *Virulence.* 2014;4:740-51.
65. González PA, Prado CE, Leiva ED, Carreño LJ, Bueno SM, Riedel CA, *et al.* Respiratory syncytial virus impairs T cell activation by preventing synapse assembly with dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:14999-5004.
66. Openshaw PJM, Tregoning JS. Immune responses and disease enhancement during respiratory Syncytial virus infection. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:541-55.
67. Aberle JH, Aberle SW, Dworzak MN, Mandl CW, Rebhandl W, *et al.* Reduced Interferon-g expression in peripheral blood mononuclear cells of infants with severe respiratory Syncytial virus disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:1263-68.
68. Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, van Aalderen WMC, Brus F. *et al.* Peripheral blood cytokine responses and disease severity in respiratory Syncytial virus bronchiolitis. *Eur Respir J.* 1999;14:144-9.
69. Legg JO, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory Syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168:633-639.
70. Brand HK, Ferwerda G, Preijers F, de Groot R, Neelman C, *et al.* CD4+ T-cell counts and interleukin-8 and CCL-5 plasma concentration discriminate disease severity in children with RSV infection. *Pediatr Res.* 2013;73:187-93.
71. Mella C, Suarez-Arrabal MC, Lopez S, Stephens J, Fernandez S, *et al.* Innate immune dysfunction is associated with enhanced disease severity in infants with severe respiratory Syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2013;207:564-73.
72. Chávez-Bueno S, Mejías A, Gómez A, Olsen KD, Ríos AM, *et al.* Respiratory syncytial virus-induced acute and chronic airway disease is independent of genetic background: An experimental murine model. *Virol J.* 2005;2:26.
73. Dakhama A, Park JW, Taube C, El Gazzar M, Taku K, *et al.* Alteration of airway neuropeptide expression and development of airway hyperresponsiveness following respiratory syncytial virus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;288:761-770.
74. Estriepaut, D., *et al.*, Respiratory syncytial virus persistence in the lungs correlates with airway hyperreactivity in the mouse model. *J Infect Dis.* 2008;198:1435-43.

75. Rowe J, Macaubas C, Monger T, Holt BJ, Harvey J, Poolman JT, *et al.* Heterogeneity in diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine-specific cellular immunity during infancy: relationship to variations in the kinetics of postnatal maturation of systemic th1 function. *J Infect Dis.* 2001;184:80-8.
76. Culley FJ, Pollot J, Openshaw PJ. Age at first viral infection determines the pattern of T cell-mediated disease during reinfection in adulthood. *J Exp Med.* 2002;196(10):1381-6.
77. Barends M, Van Ooster M, De Rond CG, Domans JA, Osterhaus AD, Neijens HJ, *et al.* Timing of infection and prior immunization with respiratory syncytial virus (RSV) inflammation. *J Infect Dis.* 2004;189:1866-72.
78. Dakhama A, Park JW, Tabue C, Joetham A, Balhorn A, Miyahara N, *et al.* The enhancement or prevention of airway hyperresponsiveness during reinfection with respiratory syncytial virus is critically dependent on the age at first infection and IL-13 production. *J Immunol.* 2005;175(3):1876-83.
79. Becnel D, You D, Erskin J, Dimina DM, Cormier SA, *et al.* A role for airway remodeling during respiratory syncytial virus infection. *Respir Res.* 2005;6:122.
80. Dakhama A, Lee YM, Ohnishi H, Jing X, Balhorn A, Yakeda K, *et al.* Virus-specific IgE enhances airway responsiveness on reinfection with respiratory syncytial virus in newborn mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:138-45.
81. Ruckwardt TJ, Malloy AMW, Gostick E, Price DA, Dash P, *et al.* Neonatal CD8 T-cell hierarchy is distinct from adults and is influenced by intrinsic T cell properties in respiratory syncytial virus infected mice. *PLoS Pathog.* 2011;7(12): e 1002377.
82. Jiang XB, Huang M, Cui XF, Zhu Y, Yin KS, Yao K. Respiratory syncytial virus infection differentiates airway dysfunction in the central and peripheral airways in OVA-sensitized mice. *Exp Lung Res.* 2012;38(9-19):453-62.
83. You D, Marr N, Saravia J, Shrestha B, Lee GI, Turvey SE, *et al.* IL-4R $\alpha$  on CD4<sup>+</sup> T cells plays a pathogenic role in respiratory syncytial reinfection in mice infected initially as neonates. *J Leukoc Biol.* 2013;93(6):933-42.
84. Empey KM, Orend JG, Peebles RS Jr, Egaña L, Norris KA, Oury TD, *et al.* Stimulation of immature lung macrophages with intranasal interferon gamma in a novel neonatal mouse model of respiratory syncytial virus infection. *PLoS ONE.* 2012;7(7): e40499.
85. Cormier SA, Shrestha B, Saravia J, Lee GI, Shen L, DeVincenzo JP, *et al.* Limited type I interferons and plasmacytoid dendritic cells during neonatal respiratory syncytial virus infection permit immunopathogenesis upon reinfection *et al.*. *J Virol.* 2014;88(16):9350-60.
86. Schwarze J, Hamelman E, Bradley KL, Takaeda K Gelfand EW. Respiratory syncytial virus infection results in airway hyperresponsiveness and enhanced airway sensitization to allergen. *J Clin Invest.* 1997;100(1):226-33.

87. Schwarze J, Cieslewicz G, Joetham A, Ikemura T, Hamelmann E, *et al.* CD8 T cells are essential in the development of respiratory Syncytial virus-induced lung eosinophilia and airway hyperresponsiveness. *J Immunol.* 1999;162:4207-211.
88. Matsuse H, Behera AK, Kumar M, *et al* Recurrent respiratory syncytial virus infection in allergen-sensitized mice lead to persistent airway inflammation and hyperresponsiveness. *J Immunol.* 2000;164(1):6583-92.
89. Mäkelä MJ, Tripp R, Dakhama A, Park JW, Ikemura T, Joetham A *et al.* Prior airway exposure to allergen increases virus-induced airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112(5):861-9.
90. Jafri HS, Chávez-Bueno S, Mejías A, Gómez AM, Ríos AM, Nassi SS, *et al.* Respiratory syncytial virus induced pneumonia, cytokine responses, airway obstruction, and chronic inflammatory infiltrates associated with long-term airway hyperresponsiveness in Mice. *J Infect Dis.* 2004;189:1856-65.
91. Schwarze J, Cieslewicz G, Hamelmann E, Joetham A, Sultz LD, Lamers MC, *et al.* IL-5 and eosinophils are essential for the development of airway hyperresponsiveness following acute respiratory syncytial virus infection. *J Immunol.* 1999;162:2997-3004.
92. Lukacs NW, Tekkanat KK, Berlin A, Hogaboam CM, Miller A, Evanoff H, *et al.* Respiratory syncytial virus predisposes mice to augmented allergic airway responses via IL-13-mediated mechanisms. *J Immunol.* 2001;167:1060-65.
93. Park JW, Taube C, Yang ES, Joetham A, Balhorn A, YAkeda K, *et al.* Respiratory syncytial virus-induced airway hyperresponsiveness is independent of IL-13 compared with that induced by allergen. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112:1078-87.
94. Lukacs NW, Moore ML, Rudd BD, Berlin AA, Collins RD, *et al.* Differential immune responses and pulmonary pathophysiology are induced by two different strains of respiratory Syncytial virus. *Am J Pathol.* 2006;169:977-986.
95. Peebles RS Jr, Hashimoto K, Collins RD, Jarzecka K, Furlong J, Mitchell DB, *et al.* Immune interaction between respiratory syncytial virus infection and allergen sensitization critically depends on timing of challenges. *J Infect Dis.* 2001;184:1374-9.
96. Vissers M, Habets MN, About IM, Jans J, de Jonge MI, *et al.*, An in vitro model to study immune responses of human peripheral blood mononuclear cells to human respiratory Syncytial virus infection. *J Vis Exp.* 2013;82:e50766.
97. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protocol.* 2008;3:1101-8.
98. Mendez-Enriquez E, Melendez Y, Martinez F, Baay G, Huerta-Yopez S, *et al.* CDIP-2, a synthetic peptide derived from chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13), ameliorates allergic airway inflammation. *Clin Exp Immunol.* 2008;152:354-63.
99. Méndez-Enriquez E, Medina-Tamayo J, Soldevila G, Fortoul TI, Anton B, *et al.* A CCL chemokine-derived peptide (CDIP-2) exerts anti-inflammatory activity via CCR1, CCR2 and CCR3 chemokine

- receptors: Implications as a potential therapeutic treatment of asthma. *Int Immunopharmacol.* 2014;20:1-11
100. Tregoning JS, Yamaguchi Y, Harker J, Wand B, Openshaw PJM. The role of T cells in the enhancement of Respiratory Syncytial virus infection severity during adult reinfection of neonatally sensitized mice. *J Virol.* 2008;82:4115-24.
  101. Schwarze J, Cieslewicz G, Joetham A, Ikeruma T, Mäkelä MJ, *et al.* Critical roles for interleukin-4 and interleukin-5 during respiratory syncytial virus infection in the development of airway hyperresponsiveness after airway sensitization. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:380-386.
  102. Tasker L, Lindsay RWB, Clarke BT, Cochrane DWR, Hou S. Infection of mice with respiratory syncytial virus during neonatal life primes for enhanced antibody and T cell responses on secondary challenge. *J Clin Exp Immun.* 2008;153:277-288.
  103. Harker JA, Yamaguchi Y, Culley FJ, Tregoning JS, Openshaw PJM. Delayed sequelae of neonatal respiratory syncytial virus infection are dependent on cells of the innate immune system. *J Virol.* 2014;88:604-611.
  104. Weiss KA, Christiaansen AF, Fulto RB, Meyerholz DK, Varga SM. Multiple CD4<sup>+</sup> T cell subsets produce immunomodulatory IL-10 during respiratory syncytial virus infection. *J Immunol.* 187:3145-3154.
  105. You D, Becnel D, Wand K, Ripples M, Daly M, Cormier SA. Exposure of neonates to respiratory syncytial virus is critical in determining subsequent airway response in adults. *Respir Res.* 2006;7:107.
  106. Siegle JS, Hansbro N, Herbert C, Rosenberg HF, Domachowske JB, *et al.* Early-life viral infection and allergen exposure interact to induce an asthmatic phenotype in mice. *Respir Res.* 2010;11:14
  107. Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lind DC, Kedl RM, *et al.* Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol.* 1999;162:3256-62.
  108. Valenzuela J, Schmidt C, Mescher M. The roles of IL-12 in providing a third signal for clonal expansion of naïve CD8 T cells. *J Immunol.* 2002;169:6842-9.
  109. Yanagida T, Kato T, Igarashi P, Inoue T, Nariuchi H. Second signal activity of IL-12 on the proliferation and IL-2R expression of T helper cell-1 clone. *J Immunol.* 1994;152:4919-29.
  110. Kato T, Morakata T, Igarashi P, Yee ST, Inobe M, *et al.* Costimulatory effect of IL-12 on the activation of naïve, memory CD4<sup>+</sup> T cells and Th1. Clones. *Cell Immunol.* 1997;176:50-80.
  111. Sun JS, Cardani A, Sharma A, Laubach VE, Jack RS, *et al.* Autocrine regulation of pulmonary inflammation by effector T-cell derived IL-10 during infection with respiratory syncytial virus. *PLoS Pathog.* 2011;7(8): e1002173.
  112. Sun L, Cornell TT, LeVine A, Berlin AA, Hinkovska-Galcheva V, *et al.* Dual role of interleukin-10 in the regulation of respiratory syncytial virus (RSV)-induced lung inflammation. *J Clin Exp Immunol.* 2012;12:263-279.
  113. Loebbermann J, Schnoeller C, Thornton H, Durant L, Sweeny NP, *et al.* IL-10 regulates viral lung immunopathology during acute respiratory syncytial virus infection in mice. *PLoS ONE.* 2012;7(2): e322371.

114. O'Garra A, Murphy KM. From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce Th1 development. *Nat Immunol.* 2009;10:929-32.
115. Adkins B. T cell function in newborn mice and humans. *Immunol Today.* 199;20:330-5.
116. Adkins B, Bu Y, Guevara P. The generation of Th memory in neonates versus adults: prolonged primary Th2 effector function and impaired development of Th1 memory effector function in murine neonates. *J Immunol.* 2001;166:918-25.
117. Graham BS, Perkins MD, Wright PF, Karzon DG. Primary respiratory syncytial virus infection in mice. *J Med Virol.* 1998;26:153-62.
118. Trinchieri G, Gerosa F. Immunoregulation by interleukin-12. *J Leuko Biol.* 1996;59:505-511.
119. de Graaff PM, de Jong EC, van Capel TM, van Dijk ME, Roholl PJ, Boes J, *et al.* Respiratory syncytial virus infection of monocytes-derived dendritic cells decreases their capacity to activate CD4 T cells. *J Immunol.* 2005;175:5904-11.
120. Wang S, Fan Y, Hang X, Yang J, Bilenki L, Yang X. IL-12-dependent vascular cell adhesion molecule-1 expression contributes to airway eosinophilic inflammation in a mouse model of asthma-like reaction. *J Immunol.* 2001;166:2741-49.
121. Meyts I, Hellings PW, Gens G, Vanaudenaerde BM, Verbinnen B, Heremans H, *et al.* IL-12 contributes to allergen-induced airway inflammation in experimental asthma. *J Immunol.* 2006;177:6460-70.

## 14. Anexos

### 14.1 Anexo I. Propagación y amplificación del stock viral.

1. Sembrar células Hep2 en frascos de 75 cm<sup>2</sup> con medio DMEM-alto en glucosa (10% FBS, 1% P/S) e incubar a 37°C con 5% de CO<sup>2</sup>.
2. Cuando la monocapa celular alcance una confluencia aproximada del 70%, retirar el medio y lavar 2 veces con PBS estéril frío.
3. Agregar 1 ml de DMEM-alto en glucosa (sin FBS ni P/S) + 0.5 ml del stock viral.
4. Incubar dos horas a temperatura ambiente y en movimiento.
5. Añadir 13.5 ml de medio DMEM-alto en glucosa (10% FBS, 1% P/S).
6. Incubar a 37°C con 5% de CO<sup>2</sup> durante 5 a 7 días.
7. Cuando el sobrenadante se observe turbio, la monocapa celular se este empezando a desprender, y las células muestren efecto citopático (formación de sincicios) se puede cosechar el cultivo viral.
8. Raspar la monocapa celular con un “*cell scrape*” hasta desprenderla por completo, recolectar el sobrenadante en tubos tipo Falcon de 15 ml.
9. Realizar un “*vortex*” breve.
10. Sonicar @ amplitud 10%, 1 min on/ 1 min off, 1 min por miliitro.
11. Centrifugar 10 minutos a 2000 rpm, 4°C.
12. Colocar el sobrenadante en hielo.
13. Hacer alícuota de 1 ml por tubo.
14. Congelar rápidamente en nitrógeno líquido y almacenar.

## 15.2 Anexo II. Protocolo de plaqueo para el RSV.

### *-Requerimientos iniciales*

#### A. Inactivación del suero fetal bovino:

Colocar en un baño de agua a 56°C por 60 minutos el suero fetal bovino (FBS). Posteriormente hacer alícuotas y guardar a temperatura apropiada (4-8 °C, si el tiempo de almacenamiento es corto; si por largo tiempo, guardarlos a -20° C).

#### B. Preparación del medio de cultivo para la células Hep2:

A un frasco de 500 ml de DMEM-alto en glucosa, agregar 25 ml de FBS inactivado y 5 ml de Pen/Strep (P/S). Concentración final: 5% FBS, 1% P/S.

#### C. Preparación del medio para plaqueo:

A un frasco de 500 ml de DMEM-alto en glucosa, agregarle 10 ml de FBS inactivado. Concentración final: 2% FBS.

#### D. Preparación de metil-celulosa al 0.8%:

- 1) En un matraz de 500 ml colocar 4 gramos de metil-celulosa, tapar y enviar al autoclave (121°C por 15 minutos). Posteriormente enfriar a temperatura ambiente.
- 2) Agregar 500 ml de OPTIMEM, 15 ml de FBS inactivado, 5 ml P/S y 5ml de L-glutamina. Concentración final: Metil- celulosa 0.8%, FBS 3%, P/S 1% y L-glutamina 1%. Colocar la tapa y mezclar.
- 3) La metil-celulosa estará disuelta en al menos una semana, por lo que durante ese tiempo permanecerá en el refrigerador a 4°C y todos los días se tendrá que agitar manualmente

#### E. Preparación de metanol:acetona (1:1):

- 1) En un frasco de 500 ml, marcarlo apropiadamente y agregar 250 ml de metanol y 250 ml de acetona.
- 2) Mezclar y guardar a temperatura ambiente.

F. Preparación de los platos de cultivo de células Hep2:

- 1) Desinfectar la campana de flujo laminar.
- 2) Aspirar completamente el medio de las cajas de cultivo de células Hep2.
- 3) Agregar 15 ml de PBS, de manera que cubra la monocapa por 5 segundos.
- 4) Aspirar completamente el PBS y agregar 2.5 ml de tripsina al 0.25% y cubrir la monocapa con la tripsina.
- 5) Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
- 6) Golpear gentilmente con la palma de la mano la caja de cultivo, con la finalidad de despegar la monocapa e inmediatamente después agregar 7.5 ml del medio para las células Hep2 (Volumen final 10 ml).

NOTA: No dejar las células por más de un minuto con tripsina.

- 7) De una caja T-150 con una confluencia de células VERO al 100% se pueden hacer 14 placas de 24 pozos (se requieren 346 ml, sin embargo empleamos 340 ml) (para otros tamaños de caja extrapolar).
- 8) Mezclar el concentrado celular a manera que quede una concentración final de  $1.25 \times 10^5$  /ml.
- 9) En cada pozo de la placa (24 pozos) deberá de quedar una concentración final de  $1.25 \times 10^5$  /ml para luego incubar a 37°C toda la noche.
- 10) Las células estarán en confluencia a las 20 h.

NOTA: Se recomienda que las células que se van emplear en el plaqueo tengan una confluencia del 100% a las 24 h de realizar el pase, por lo anterior se hace una dilución 1:2.

*-Titulación del virus.*

1. Hacer diluciones del stock viral en DMEM 2% para titular el virus.
  - Agregar en el primer pozo 25 µl del stock viral y 225µl de DMEM 2% en los siguientes 6 pozos.
2. Mezclar y tomar 25 µl para dispensarlo en el segundo pozo.
3. Repetir el paso 7 hasta completar las 6 diluciones.
4. Infectar con 100 µl de cada dilución las células Hep2 e incubar por 1 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

5. Al término de la incubación colocar sobre los pozos 1 ml de metil-celulosa 0.8%.
6. Incubar por 6 días, dependiendo del fenotipo viral, puede ser hasta 9 días (sí las placas son pequeñas). NO MOVER y transportar con gentileza.

*-Inactivación y revelación.*

1. Las placas que se habían colocado en la incubadora (Títulos, controles y muestras), llevarlas a la campana de flujo laminar. Descartar la metil-celulosa.
2. Lavar cada pozo con 2ml de PBS en dos ocasiones y asegurarse que toda la metil-celulosa fue removida.
3. Agregar 1 ml de metanol:acetona (1:1) por pozo e incubar por 30 min a temperatura ambiente.  
NOTA: El metanol:acetona (1:1) inactiva por completo al virus, por lo tanto los siguientes pasos pueden realizarse fuera de la campana de flujo laminar.
4. Descartar (volteando la caja de 24 pozos) el metanol:acetona de cada pozo en el recipiente de deshechos y dejar secar al aire libre. Este proceso dura aproximadamente 2 horas.
5. Lavar con PBS por 15 min para eliminar residuos. Las placas deberán estar colocadas en un agitador de placas. Este procedimiento se repita dos veces.
6. Aspirar el PBS y aplicar en cada pozo 200  $\mu$ l de solución de bloqueo (PBS –FBS 3%). Mantener la solución por 15 min en un cuarto a temperatura ambiente y mezclar gentilmente.
7. Aspirar la solución de bloqueo y agregar a cada pozo 200  $\mu$ l del anticuerpo  $\alpha$ -F RSV (Diluir 1:25 con solución de bloqueo el anticuerpo de Millipore #5022).
8. Incubar por 18 h máximo (toda la noche) a temperatura ambiente y mezclando gentilmente.
9. Repetir el paso 5.
10. Preparar el segundo anticuerpo. Diluir 1:2000 el anticuerpo HRP ganso anti-ratón en la solución de bloqueo.
11. Aspirar PBS y aplicar a cada pozo 200  $\mu$ l del segundo anticuerpo preparado en el paso 10.
12. Incubar por 1 h el anticuerpo secundario a temperatura ambiente y agitar gentilmente.

13. Repetir el paso 5.
14. Preparar la solución reveladora AEC de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
  - En un tubo de fondo cónico agregar 7 ml de agua bidestilada, 1ml de buffer 8X y 4 gotas de AEC.  
NOTA: El tubo deberá estar cubierto con papel aluminio, dado que la solución reveladora se oxida rápidamente en contacto con la luz.
7. Aspirar el PBS y aplicar a cada pozo 200  $\mu$ l de la solución reveladora AEC. Cubrir cada placa con aluminio e incubar en la oscuridad a temperatura ambiente y en agitación por 15 min.
8. Quitar el aluminio y detener la reacción con agua corriente.
9. Aspirar el agua hasta que las placas queden completamente secas.
10. Contar las placas de cada dilución (la dilución a evaluar es aquella que contenga > 15 placas pero < 45 placas). El cálculo es el promedio de placas en la dilución con el rango anterior mencionado multiplicado 10 y luego multiplicado por la dilución evaluada, por ejemplo 40 placas X 10 X  $10^5 = 4 \times 10^7$ .

## 15. Productividad científica durante el doctorado

-Artículos publicados, aceptados o enviados a revistas arbitradas e indexadas durante el doctorado (6).

1. Alvarado-Hernández DL, Benítez-Sánchez A, Rodríguez-Cuevas JS, Rosales-Saavedra T, Guerra-Palomares SE, **Comas-García A**, Noyola DE, García-Sepúlveda CA. Killer-cell immunoglobulin-like receptors and cytomegalovirus reactivation during late pregnancy. *International Journal of Immunogenetics*. 2016;43(4):189-99. Doi: 10.11111/ijii.12271.
2. **Comas-García A**, López-Pacheco CP, García-Zepeda CA, Soldevila G, Ramos-Martínez P, Ramos-Castañeda J. Neonatal RSV infection has an effect on lung inflammation and the CD+CD25+ T-cell subpopulation during OVA-sensitization in adult mice. *Clinical and Experimental Immunology*. 2016;185(2):190-201. Doi:10.1111/cei.12793.
3. Velasco-Hernández JX, Nuñez-López M, **Comas-García A**, Noyola DE, Capistrán M. Superinfection between influenza and RSV alternating patterns in San Luis Potosí State, México. *PLoS One*. 2015;10(3): e0115674. Doi:10.1371/journal.pone.0115674.
4. Amaya-Larios IY, Martínez-Vega RA, Mayer, SV, Galeana-Hernández, **Comas-García A**, Sepúlveda-Salinas K, Falcón-Lezama J, Vasilakis N, Ramos-Castañeda J. Seroprevalence of neutralizing antibodies against Dengue Virus in two locations in the State of Morelos, Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2014;91(5):1057-65. Doi:10.4269/asthm.14-0145.
5. Gómez-Gómez A, Magaña-Aquino M, Bernal-Silva S, Araujo-Meléndez J, **Comas-García A**, Alonso-Zúñiga E, Torres-Torres E, Noyola DE. Risk factors for severe influenza A virus pneumonia in adult cohort, Mexico, 2013-2014. *Emerging Infectious Disease*, 2014;20(9):1554-1558. Doi: 10.320/eid2009.140115.
6. Aranda-Romo S, García-Sepúlveda CA, **Comas-García A**, Lovato-Salas F, Salgado-Bustamante M, Gómez-Gómez A, Noyola DE. Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) in severe A (H1N1) 2009 Influenza infections. *Immunogenetics*. 2012;64(9):653-62. Doi: 10.1007/s00251-012-0623-3.

## 16. Artículo original

**Comas-Garcia A**, López-Pacheco CP, García-Zepeda CA, Soldevila G, Ramos-Martínez P, Ramos-Castañeda J. Neonatal RSV infection has an effect on lung inflammation and the CD+CD25+ T-cell subpopulation during OVA-sensitization in adult mice. *Clinical and Experimental Immunology*. 2016;185(2):190-201. Doi:10.1111/cei.12793.