



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Enfermedad respiratoria viral y  
mecanismos de reclutamiento de  
macrófagos en la mucosa nasal

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

JULIO RAUL SANTIAGO CRUZ

DIRECTOR DE TESIS: PH.D. LUIS MANUEL TERÁN JUÁREZ

MÉXICO, D.F.

ABRIL, 2009



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**

Mi agradecimiento expresado de manera especial para los integrantes de mi comité tutorial y para los miembros del honorable jurado.

A la Dra. Annie Pardo por los invaluableles señalamientos que realizó a lo largo de mis presentaciones tutorales, gracias a los cuales este proyecto alcanzó su definición final.

Al Dr. Edelmiro por sus interesantes observaciones al manuscrito y por sus palabras de estímulo.

A la Dra. Rosa María Del Ángel por la minuciosa revisión que hizo a mi trabajo y por su forma de alentar a los aspirantes a investigadores.

Al Dr. Fernando Esquivel por sus recomendaciones trascendentales y oportunas, y por señalarme mis deficiencias.

Al Dr. Terán por todo el apoyo y dirección que me brindó para la realización de este trabajo, en el aspecto académico y en el aspecto humano, muchas gracias.

Al Dr. Lascurain por sus comentarios sobre el manuscrito y por su asesoría en citometría de flujo y en inmunología.

Al Dr. Carlos Arias por sus observaciones acerca del trabajo experimental, y de la escritura del manuscrito desde su inicio, gracias por su ejemplo, inspiración para este aprendizaje de investigador.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar los estudios de doctorado, con número de registro 47073.

A la DGEP por la beca otorgada para realizar los estudios de doctorado.

Gracias a las personas que contribuyeron para que este trabajo se realizara, en primer lugar a los pacientes niños de la escuela “Rey Tizoc”, al Director, Elí Elier Mendoza, y a los profesores de la misma por las facilidades prestadas. Son dignas de mencionar las siguientes contribuciones: en la toma de muestras y registro de datos clínicos, Horacio Zepeda Peney, en la asesoría de las ELISAS, Elba Valencia Maqueda, en la HPLC, Rosalía Montes Vizuet, en la asesoría de las PCR, Anita Vega Miranda, en el aislamiento viral, María Eugenia Manjarrez Zavala, en las pruebas de lipoperoxidación, Patricia Sierra, y en la asesoría estadística, Aurora Tapia Díaz.

El trabajo realizado durante este estudio lo dedico con mucho cariño a mis hijos, a mi nieto y a mis sobrinos a quienes los quiero mucho: Liliana, Oscar Julio, Julio de Jesús, Suzel, Alejandro, Misael, Otoniel, Agustín, Jonathan, Alain, Cristina, Lizeth y Natalia. Al resto de mi familia: María Elena, Ofelia, José Luis, Alfredo, Azalea, Laura, Saúl, Alma. A mis tíos y sus respectivas familias: Manuel, Guillermo, Víctor, Guadalupe. A mis sobrinas Alison, Rebeca y Adlai.

En reconocimiento a la formación humana recibida en el seno de mi hogar: a mis padres: Ofelia Leonor y Wilfrido Felipe.

A mis amigos de siempre: Jaime Chávez, Fernando Ortiz, Luis Javier Méndez, Francisca Hernández, y Patricia Vergara.

A los compañeros de laboratorio José Luis, Felipe, César, y el Dr. Tinajero.

## INDICE

Portadilla	i
Oficio de la Coordinación al DGAE con el jurado aprobado	ii
Agradecimientos formales	iii
Agradecimientos personales	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
ABREVIATURAS	xi
INTRODUCCIÓN	
Impacto de las infecciones virales respiratorias	1
Patogénesis de las enfermedades respiratorias virales	4
Rinovirus	4
Coronavirus	5
Virus de influenza	6
Virus sincitial respiratorio	7
Virus de parainfluenza	10
Adenovirus	11
Respuesta antiviral del hospedero	12
Componentes de la respuesta inmunitaria	14
Receptores de reconocimiento de patógenos	14
Macrófagos	15
Células epiteliales	18
Neutrófilos	19
Eosinófilos	21
Células dendríticas	22
Otras células	23
Reclutamiento celular	23
Quimiocinas	23
Receptores de quimiocinas	26
Reclutamiento celular durante la infección respiratoria viral	27
Planteamiento	28
Problema	28
Hipótesis	28
Objetivo general	28
Objetivos particulares	28
Estrategia de investigación	28
MATERIAL Y MÉTODOS	
Voluntarios	29
Toma de muestra	29
Cuenta celular	30
Ensayo inmunoabsorbente enzimático	30
Detección e identificación de virus	31
Aislamiento viral	31
Inmunofluorescencia	31
RT-PCR	32
Cromatografía de afinidad	34

Cromatografía líquida de alta presión	34
Ensayo de quimiotaxis	34
Estudio de la lipoperoxidación en las muestras de secreción nasal	34
Análisis estadístico	34
<b>RESULTADOS</b>	
Número de episodios respiratorios	35
Detección e identificación de virus	35
Datos clínicos	37
Cuenta diferencial	39
Detección de factores quimiotácticos para macrófagos	39
Detección de MCP's	41
Correlaciones entre las quimocinas en la secreción nasal y los macrófagos reclutados	44
Purificación de MCP-3 y MCP-4 a partir de las muestras nasales	47
Lipoperoxidación en la mucosa respiratoria	48
<b>DISCUSIÓN</b>	49
<b>CONCLUSIONES</b>	55
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	56

## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Las 10 principales causas de mortalidad a escala mundial y en México en 2004....1
- Tabla 2. Trabajos realizados sobre incidencia y prevalencia de virus respiratorios en México....3
- Tabla 3. Quimiocinas humanas CC o beta...24
- Tabla 4. Quimiocinas humanas CXC o alfa...25
- Tabla 5. Quimiocinas humanas C o gama...25
- Tabla 6. Quimiocinas humanas CXXXC o delta...25
- Tabla 7. Quimiocinas reportadas en asociación con organismos infecciosos...26
- Tabla 8. Receptores de quimiocinas presentes en los monocitos...26
- Tabla 9. Casos con infección respiratoria asociada a 2 virus...37
- Tabla 10. Cuentas diferenciales y totales en los aspirados nasales de niños con infección viral respiratoria o durante un periodo asintomático...39
- Tabla 11. Porcentajes de macrófagos reclutados por las fracciones de la HPLC de secreciones nasales de niños con infección respiratoria aguda...41
- Tabla 12. Proporciones de virus aislados en cuatro estudios diferentes en comparación con nuestros resultados...51
- Tabla 13. Características de los estudios realizados en otros países en comparación con el nuestro...51

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Repertorio molecular del macrófago...16
- Figura 2. Moléculas producidas o expresadas por las células epiteliales respiratorias, infectadas por virus...18
- Figura 3. Trampa de vacío para aspirar moco nasal...29
- Figura 4. Detección de virus respiratorios en muestras de niños escolares...35
- Figura 5. Porcentajes de virus aislados de niños con infección respiratoria...36
- Figura 6. Gráfica del flujo de pico expiratorio (PEF), y de síntomas del tracto respiratorio superior (STRS) e inferior (STRI) para uno de los niños estudiados...37
- Figura 7. Cambios en los síntomas del tracto respiratorio superior e inferior, y descenso del pico de flujo expiratorio...38
- Figure 8. Actividades quimiotácticas para monocitos en aspirados nasales en fracciones de HPLC...40
- Figura 9. Niveles de MCP-1 en secreción nasal de niños con infección viral respiratoria...42
- Figura 10. Niveles de MCP-2 en secreción nasal de niños con infección viral respiratoria...42
- Figura 11. Niveles de MCP-3 en secreción nasal de niños con infección viral respiratoria...43
- Figura 12. Niveles de MCP-4 en secreción nasal de niños con infección viral respiratoria...43
- Figura 13. Niveles de MCP-4 en secreciones nasales de niños con infección respiratoria agrupados por virus respiratorio...44
- Figura 14. Correlación entre concentración de MCP-3 y número de macrófagos en muestras nasales de niños con infección viral respiratoria...45
- Figura 15. Correlación entre concentración de MCP-4 y número de macrófagos en muestras nasales de niños con infección viral respiratoria...45
- Figura 16. Correlación entre niveles de MCP-3 en secreciones nasales de niños con infección viral respiratoria, y síntomas de tracto respiratorio superior...46
- Figura 17. Correlación entre niveles de MCP-4 en secreciones nasales de niños con infección viral respiratoria, y síntomas de tracto respiratorio superior...46
- Figure 18. Actividades quimiotácticas para monocitos purificadas a partir de aspirados nasales mediante cromatografía de afinidad y HPLC...47
- Figura 19. Lipoperoxidación en muestras de secreción nasal de niños con infección viral respiratorias...48



## RESUMEN

**Antecedentes.** Los macrófagos desempeñan funciones cruciales durante una infección viral respiratoria. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales estas células son reclutadas en la mucosa respiratoria no han sido completamente estudiados. **Objetivo.** El principal objetivo de este trabajo fue estudiar qué quimiocinas atrayentes de macrófagos se producen en la mucosa durante la infección viral respiratoria. **Métodos.** Se midieron por ensayo inmunoabsorbente enzimático (ELISA) los niveles de las quimiocinas, proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1, -2, -3 y -4, en aspirados nasales de escolares de 6 a 12 años de edad que sufrieron infección viral respiratoria, los virus respiratorios se detectaron por inmunofluorescencia y una prueba de retrotranscripción seguida de reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR). **Resultados.** Se observó que una cohorte de 48 niños sufrió 294 cuadros respiratorios (en promedio 6.125 cuadros por niño), durante dos años de seguimiento; de dichos cuadros, 126 (43 %) demostraron infección viral. Los virus detectados se presentaron con las siguientes frecuencias: 38 rinovirus (30.16 %), 21 virus de influenza (16.66 %), 20 virus de parainfluenza (15.87 %), 17 adenovirus (13.49 %) y 15 virus sincitiales respiratorios (11.90 %); también se encontraron 15 casos con infección dual (11.90 %). Las células inflamatorias reclutadas en la mucosa nasal durante la infección viral fueron principalmente neutrófilos (83.9 %), seguidos por los macrófagos (8.8 %) y los linfocitos (6.7 %). MCP-3 presentó niveles significativamente mayores ( $194 \pm 107$  pg/ml) en las muestras nasales de los niños con infección viral respiratoria, en comparación con las muestras tomadas a los mismos niños durante un periodo asintomático ( $37 \pm 6$  pg/ml,  $p < 0.001$ ). MCP-4 también presentó concentraciones mayores ( $234 \pm 172$  pg/ml) en los niños con infección que en las muestras control ( $33 \pm 10$  pg/ml,  $p < 0.001$ ). Las concentraciones de ambas quimiocinas se correlacionaron en grado significativo con el número de macrófagos nasales reclutados (MCP-3 con una  $r = 0.654$  y una  $p = 0.003$ ; MCP-4 con una  $r = 0.648$  y una  $p = 0.003$ ), además mostraron una tendencia a correlacionarse con el grado de los síntomas de vías superiores ( $r = 0.231$ ,  $p = 0.069$ ;  $r = 0.204$ ,  $p = 0.058$  respectivamente). La MCP-3 y la MCP-4 se purificaron de los aspirados nasales y los ensayos de quimiotaxis demostraron su actividad biológica *in vitro*. Los niveles de MCP-1 y MCP-2 no presentaron diferencias significativas entre los dos grupos de muestras ( $p > 0.05$ ). **Conclusiones.** Este estudio demuestra por primera vez que niños con infección respiratoria viral liberan altas concentraciones de MCP-3 y MCP-4 en las secreciones nasales. Los niveles de las dos quimiocinas mostraron una correlación significativa con los macrófagos reclutados, lo que sugiere que contribuyen con el reclutamiento *in vivo* de estas células. Además, el desarrollo de medicamentos que neutralicen a estas quimiocinas pudiera ser una alternativa de tratamiento de la infección viral respiratoria.

Palabras clave: macrófagos, proteína quimiotáctica de monocitos-1, -2, -3 y -4, infección respiratoria de vías altas, infecciones virales, patogénesis.

## ABSTRACT

**Background.** Macrophages play a crucial role in respiratory viral infections. However, the mechanisms by which these cells are locally recruited are not fully understood. **Objective.** Main aim of this study was to study which chemokines that attract macrophages are locally produced during respiratory viral infections. **Methods.** Levels of chemokines, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, -2, -3 y -4, were investigated by ELISA in nasal aspirates from 6-12 years old children suffering respiratory viral infections; respiratory virus were detected by immunofluorescence, and retrotranscription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results.** A cohort group of 48 children suffered 294 respiratory episodes (6.125 episodes per child in average), during 2 years of following-up, from which 126 (43 %) proved viral infection. Viruses found had following frequencies: 38 rhinovirus (30.16 %), 21 influenza viruses (16.66 %), 20 parainfluenza viruses (15.87 %), 17 adenoviruses (13.49 %), and 15 respiratory syncytial viruses (11.90 %); 15 cases with dual infection (11.90 %) were also found. Inflammatory cells recruited to nasal mucosa were mainly neutrophils (83.9 %), followed by macrophages (8.8 %), and lymphocytes (6.7 %). MCP-3 showed significantly higher levels ( $194 \pm 107$  pg/ml) in nasal aspirates from children with proven respiratory viral infection compared to nasal aspirates from same children during a asymptomatic period ( $37 \pm 6$  pg/ml,  $p < 0.001$ ). MCP-4 also showed higher levels ( $234 \pm 172$  pg/ml) in samples from infected children than in control samples ( $33 \pm 10$  pg/ml,  $p < 0.001$ ). Concentrations of both chemokines were found to significantly correlate with numbers of recruited nasal macrophages (MCP-3,  $r = 0.654$ ,  $p = 0.003$ ; MCP-4,  $r = 0.648$ ,  $p = 0.003$ ), in addition they showed a trend to correlate with upper respiratory symptom scores ( $r = 0.231$ ,  $p = 0.069$ ;  $r = 0.204$ ,  $p = 0.058$  respectively). MCP-3 and -4 were purified from nasal aspirates and chemotaxis assays showed that these chemokines have biological activity *in vitro*. There were no significant differences between MCP-1 and MCP-2 levels in both groups ( $p > 0.05$ ). **Conclusions.** The present study is the first demonstration that children suffering from respiratory viral infection release high concentrations of MCP-3 and MCP-4 into nasal secretions. Levels of both chemokines showed a significant correlation with recruited macrophage numbers, suggesting that they may contribute to their recruitment *in vivo*. In addition, development of drugs that neutralize these chemokines could be a promissory alternative for treating respiratory viral infection.

Key words: macrophages, Monocyte Chemotactic Protein-1, -2, -3, and -4, upper respiratory infections, viral infections, pathogenesis.

## INTRODUCCIÓN

### Impacto de las infecciones virales respiratorias

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) entre las enfermedades transmisibles, son la principal causa de muerte a escala mundial, y representan la tercera causa global de muerte mundial (Tabla 1). Con 3.7 millones de muertes en el 2005, las IRA causaron más decesos que la epidemia del SIDA (2.2 millones) y que las diarreas (1.6 millones) (WHO, 2008). Las infecciones respiratorias afectan principalmente a niños pequeños, a adultos de la tercera edad, a pacientes con enfermedad pulmonar crónica y a pacientes inmunocomprometidos. En nuestro país las infecciones respiratorias causaron 15 mil muertes en 2005, y con esto se colocaron como la principal causa transmisible de muerte en la población general (SINAIS, 2008), y como la octava causa de muerte en la tabla general (Tabla 1).

**Tabla 1. Las diez principales causas de mortalidad a escala mundial y en México en 2004.**

Enfermedad	Lugar	Mundial	Lugar	México
Enfermedad isquémica del corazón	1	12.2	2	10.7
Enfermedad cerebrovascular	2	9.7	3	5.7
Infección respiratoria de vías bajas	3	7.0	8	3.0
EPOC	4	5.1	5	4.0
Diarreas	5	3.6	20	0.9
SIDA	6	3.5	16	1.0
Tuberculosis	7	2.5	NA	NA
Cáncer de tráquea, bronquio y pulmón	8	2.3	13	1.4
Accidentes de tráfico de vehículos	9	2.2	7	3.0
Perinatales	NA	5.4 <sup>#</sup>	6	3.5
Diabetes mellitus	12	1.9	1	13.2
Malaria	13	1.7	NA	NA
Hipertensión	14	1.7	9	2.6
Cirrosis	18	1.3	4	5.7
Nefritis y nefrosis	19	1.3	10	2.3

EPOC, Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; SIDA, síndrome de inmunodeficiencia adquirida; #, este valor incluye 2.0 % de niños prematuros (rango, 10), 1.9 % de infecciones neonatales (rango, 11), y 1.5 % de asfixia o trauma al nacimiento (rango, 15), sumadas como causas perinatales con fines de comparación, con lo cual la suma subiría al cuarto rango; NA, no se tiene el dato como tal. Fuentes: WHO, 2008 ; SINAIS, 2008.

Todas las clases de organismos infecciosos son capaces de infectar el tracto respiratorio, pero los virus y las bacterias son las causas más comunes de infección y en los

países donde se han estudiado se ha observado que los virus causan la mayoría de los cuadros respiratorios (Lambert et al., 2008). Las infecciones del tracto respiratorio superior, como el resfriado común, tienen las mayores tasas de morbilidad, en aquellos países donde se han estudiado, por ejemplo Estados Unidos y Gran Bretaña, y tienen un alto impacto en relación con las horas de trabajo perdidas, de hecho el resfriado común haciendo honor a su nombre representa la enfermedad infecciosa más frecuente del género humano. El resfriado se presenta con una frecuencia de cuatro a seis episodios por año en niños y de dos a cuatro por año en adultos, con esto se convierten en una causa importante de malestar, complicaciones eventuales y pérdidas económicas en todo el mundo (Fendrick et al., 2003). Actualmente se sabe que los rinovirus (RV) y los coronavirus (CoV) son los principales causantes del resfriado común (Winther et al., 2007).

Por su parte, los agentes causales más comunes de las infecciones del tracto respiratorio inferior son los adenovirus (AdV), el virus de influenza, los de parainfluenza, el virus sincitial respiratorio (RSV), el de sarampión (sobre todo en los países en desarrollo) y el metapneumovirus humano (MPV); también participan de manera importante las bacterias *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*; de estos agentes se cree que los virus causan hasta el 90 % de las infecciones de tracto inferior en los niños pequeños (Hammond et al., 2007; Samransamruajkit, 2008; Vervloet et al., 2002; CDC, 2009; Liam et al., 2007). Menos comunes son los CoV, los enterovirus, los virus de herpes, los RV, hantavirus, bocavirus, y *Legionella pneumophila* (Hammond et al., 2007; Liam et al., 2007).

En nuestro país se han hecho pocos estudios para determinar la importancia de los virus como causantes de infección respiratoria en niños; en particular, no hay estudios acerca de los RV, y de los CoV; y en la mayoría de los estudios sólo se han analizado uno o dos agentes virales; además, el tamaño de la muestra ha sido demasiado pequeño para tener una idea más completa de la epidemiología de los virus respiratorios en nuestro país. La tabla 2 presenta los datos de los seis estudios más completos. En el primero se encontró que los virus se presentaron en el 87 % de las muestras procedentes de 300 niños menores de 5 años con infección respiratoria aguda (IRA), y los virus más frecuentes fueron el RSV y el de influenza (Cabello et al., 2006); en el segundo se estudiaron las infecciones del tracto respiratorio inferior que se presentaron durante un año en niños menores de 3 años hospitalizados. En este estudio se observó que los virus más frecuentes fueron el RSV y el metapneumovirus humano (hMPV) (Noyola et al., 2005). Por otro lado, en un estudio de un grupo de 531 niños menores de cinco años, con infección respiratoria aguda, los virus detectados con mayor frecuencia fueron los AdV y los virus de parainfluenza pero, el RSV, los virus de influenza y los picornavirus (familia que incluye RV y enterovirus) se encontraron en una proporción baja (García-Ramos et al, 1991). En otro estudio de 39 niños con infección de tracto respiratorio inferior se diagnosticó infección por virus de influenza, RSV y virus de parainfluenza 2 (Heller et al., 1978). Como se puede ver los datos son escasos o fragmentarios y no hay una concordancia general en los hallazgos obtenidos por distintos grupos; no obstante, éstos sugieren que en nuestro país, como en otros países, los virus también tienen un papel importante en la generación de infección respiratoria.

**Tabla 2.** Trabajos realizados sobre incidencia y prevalencia de virus respiratorios en México.

Población	Virus estudiados (método)	Tasa (%)	Referencia
300 niños menores de 5 años con infección respiratoria aguda	RSV IVA IVB PIV AdV Total (aislamiento + inmunofluorescencia)	28.7* 20.9 8.7 17.4 11.3 87	Cabello et al., 2006
558 niños menores de 3 años con IRA hospitalizados	RSV influenza parainfluenza hPMV total	34.6 2.3 2.7 6.1 45.7	Noyola et al., 2005
82 menores de un año con infección respiratoria aguda de vías bajas	RSV A RSV B (aislamiento)	20 2	Tirado et al., 1995
45 niños asmáticos	RSV IV B PIV		López et al., 1993
531 niños pequeños con IRA	AdV PIV RSV IV Picornavirus	18 4 < 1 < 1 < 1	García-Ramos et al., 1991
39 niños con laringotraqueobronquitis	IV A IV B RSV PIV 2	20 10 6.7 3.3	Heller et al., 1978

Abreviaturas: AdV, adenovirus; CoV, coronavirus; HSV, virus de herpes simple; IV, virus de influenza; PIV, virus de para influenza; RSV, virus sincitial respiratorio; RV, rinovirus; \*, los datos se calcularon de manera aproximada de la gráfica que proporcionan los autores.

Los síndromes respiratorios comunes son el resfriado común, la faringitis, la influenza, la laringotraqueobronquitis, la bronquitis, la bronquiolitis y la neumonía. Todos los virus respiratorios pueden asociarse con cualquiera de estos síndromes, aunque, algunos síndromes clínicos se han asociado con mayor frecuencia con ciertos agentes específicos. Por ejemplo, el virus de la influenza causa de manera predominante el síndrome de la influenza, que se caracteriza por congestión nasal, dolor de garganta, tos seca, fiebre y malestar general, aunque, igual que los demás virus puede causar cualquiera de los demás síndromes. El RSV es un importante agente causante de cuadros respiratorios de vías bajas en niños pequeños, en particular, de bronquiolitis y neumonías. Los virus de parainfluenza causan una importante proporción de cuadros de laringotraqueobronquitis, bronquiolitis y neumonías. Los RV y los CoV son los principales causantes del resfriado común. Además, mediante técnicas de biología molecular se confirmó en la última década la importancia de los RV como causa de exacerbación de asma, y de enfermedad de vías bajas (Johnston et al., 1995; Gern y Busse, 1999; Teran et al., 1994; Papadopoulos et al., 2000; Falsey et al., 2002; Lu et al., 2008; Varkey y Varkey, 2008). Finalmente los AdV tienden a causar infecciones más generalizadas y, además de la faringoconjuntivitis febril, causan infecciones gastrointestinales y urinarias. Existen otros virus, como el virus de sarampión, los enterovirus, los virus de herpes, etc., que se transmiten mediante secreciones respiratorias y que pueden causar cuadros de faringitis, pero que se asocian más con otros síndromes.

## Patogénesis de las enfermedades respiratorias virales

### *Rinovirus*

Los rinovirus (RV) causan más del 50 % de las infecciones virales respiratorias y se transmiten a los individuos susceptibles por contacto directo o por partículas en aerosol. Una vez en el interior, el virus infecta las áreas ciliadas de la nariz y las no ciliadas de la nasofaringe. Los síntomas se desarrollan en 1 a 2 días después de la infección viral, con un pico entre los días 2 y 4. Los síntomas característicos son rinitis, rinorrea, obstrucción nasal y faringitis. En primer lugar el virus se multiplica en la nasofaringe, aunque infecta un limitado número de células epiteliales, el daño que produce en la mucosa no es extenso, y la cantidad de células epiteliales desprendidas durante la infección es poca (Turner et al., 1982; Arruda et al., 1995; Rotbart y Hayden, 2000; Greenberg, 2003; Jang et al., 2005; Patick, 2006). De manera entonces que el daño producido de manera directa por el virus no explica por sí solo el desarrollo de los síntomas.

Más bien se ha tratado de explicar la patogénesis del resfriado común mediante diferentes mecanismos que implican a la respuesta del hospedero ante la infección. Con estas estrategias se han hecho observaciones interesantes al respecto. Lo primero que ocurre durante la infección por rinovirus es un incremento de las secreciones nasales, con salida de componentes del flujo sanguíneo, como proteínas del plasma, IgG y albúmina. También se han observado incrementos en los niveles de cininas y esteroides en dichas secreciones y, por el contrario, los niveles de histamina no cambian (Igarashi et al., 1993; Proud et al., 1994; Sperber y Hayden, 1988; Naclerio et al., 1988; Proud et al., 1990).

Al parecer la infección viral dispara la generación de mediadores de la inflamación, y la sintomatología del resfriado común es en parte el resultado de la actividad de estos mediadores. La infección de las células epiteliales respiratorias da como resultado un aumento en la secreción de mediadores inflamatorios como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-4, IL-6, IL-8, IL-11, factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y G-CSF (Proud et al., 1994; Subauste et al., 1995; Gern et al., 2000; Jang et al., 2005; Jarjour et al., 2000; Papadopoulos et al., 2000; Message y Johnston, 2004; Wark et al., 2007). En particular, se cree que el TNF- $\alpha$ , la IL-1 y la IL-6 tienen una función clave en la inducción de la inflamación.

En cuanto a las células inflamatorias reclutadas durante la infección por RV, se ha observado que éstas están formadas principalmente por neutrófilos, tanto en las capas subepiteliales como en el epitelio y en las secreciones nasales y bronquiales, y se ha detectado aumento en la producción de interleucina 8 (IL-8), la cual es una citocina quimioatrayente (quimiocina) de neutrófilos. Por otro lado, también se ha visto que la producción de IL-8 y la cantidad de neutrófilos reclutados en la secreción correlacionan con los síntomas y la severidad del resfriado producido por el rinovirus (Gern et al., 2000; Jarjour et al., 2000; Turner, 1990; Johnston, 1995; Teran et al., 1994; Teran et al., 1997; Gern et al., 2002; Barrett et al., 2006). De cualquier modo, no se conoce que funciones tienen los neutrófilos en la patogénesis del resfriado común y en la resolución de la infección por los RV.

Como otra hipótesis alternativa, se ha considerado la actividad de los demás leucocitos durante la infección por RV; por ejemplo, las células mononucleares disminuyen en la circulación, aumentan en la secreción nasal y se activan durante el proceso, estas células incluyen a los macrófagos y los linfocitos T (Levandowsky et al., 1986; Hsia et al., 1990; Gern et al., 1996; Sanders et al., 2004; van Bentem et al., 2005). Es posible, entonces, que la

activación de las células mononucleares, y posiblemente su reclutamiento en la mucosa nasal, colaboren con la generación de los síntomas.

Otro factor que se ha considerado para explicar el desarrollo de síntomas durante un resfriado común, así como en otras infecciones virales respiratorias, es el balance de citocinas Th1/Th2, ya que con una relación mayor de IFN $\gamma$ :IL-5 se ha observado un mayor número de síntomas o gravedad de los mismos (Gern et al., 2000). Mientras que en el caso de voluntarios asmáticos, en los cuales hay una condición preexistente de inflamación asmática, caracterizada por una infiltración eosinofílica y de células T de tipo Th2, durante la infección experimental con rinovirus se ha visto que el virus es eliminado con lentitud y se desarrolla una inflamación persistente y amplificada (Message y Johnston, 2001).

En resumen, parece ser que los mediadores liberados durante la infección por los rinovirus determinan una parte significativa de la sintomatología observada en la infección respiratoria de vías altas, sobre todo porque la infección por el virus no causa daño extenso en el epitelio, y porque la severidad de los síntomas correlaciona con el influjo de células inflamatorias y con la liberación de citocinas en la secreción nasal.

## **Coronavirus**

Los coronavirus (CoV) causan un amplio rango de infecciones en humanos y otros animales, incluyendo infección respiratoria de vías altas, de vías bajas, gastroenteritis, hepatitis, y meningitis-encefalitis; aunque la asociación más consistente en el humano ha sido con infección respiratoria de vías superiores. Los estudios indican que de 10 a 30 % de las infecciones respiratorias de vías superiores y de 18 a 35 % de todas las infecciones respiratorias, pueden estar causadas por estos virus. Además, en un estudio en el que se determinó la relación entre infecciones virales respiratorias y episodios de asma, se concluyó que las infecciones de tracto superior se asociaban con 80 a 85 % de las exacerbaciones en niños escolares. Los coronavirus se identificaron en 16 % de todas las infecciones virales, comparado con 35 % causadas por rinovirus. (Holmes y Lai, 1996; McIntosh, 1996; Denison, 1999; Greenberg, 2007; Varkey y Varkey, 2008).

Hasta hace poco se conocían sólo dos coronavirus humanos, el 229E y el OC43. Estos dos virus causan infecciones autolimitadas del tracto superior del aparato respiratorio. A la fecha la lista de CoV que infectan al hombre ha aumentado a 6 e incluye a los virus NL63, NH, HKU1 y al virus que causa el síndrome respiratorio agudo severo (SARS). Los CoV representan la segunda causa principal del resfriado común, y la transmisión posiblemente es parecida a la de los rinovirus. No se sabe cuales son las principales células infectadas, pero una amplia variedad de células presentan el receptor para los CoV, así que es posible que muchas células en el tracto respiratorio superior sean infectadas. Se ha postulado que el daño directo causado por el virus podría estar contribuyendo con los síntomas. Los RV y los CoV demuestran patrones similares de replicación sin efecto citopático severo, en contraste con un claro efecto citopático producido por los virus de influenza y los adenovirus (Perlman y Dandekar, 2005; Denison, 1999).

El síndrome clínico asociado de manera típica con la infección por coronavirus es infección respiratoria de vías altas. Durante ésta son comunes faringitis, rinorrea, dolor de cabeza, malestar general, y tos. Las personas con resfriado por CoV experimentan un aumento en la secreción nasal con contenido de albúmina, y demuestran una sensibilidad aumentada a la inducción de exudación de plasma por histamina (Greiff et al., 1994). En este caso, como en el de los rinovirus, se cree que la producción de citocinas tiene una función

relevante en la generación de los síntomas. Se ha visto que individuos no alérgicos inoculados experimentalmente con coronavirus desarrollan resfriados, y tienen incrementos en los contenidos de IL-1 $\beta$  y de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), pero no del GM-CSF, de las secreciones respiratorias. Además los niveles de IFN correlacionan con el grado de los síntomas y con la secreción nasal. (Linden et al., 1995). No obstante, se desconoce la fuente de estas citocinas, de manera que son necesarios más estudios para conocer el origen y la función de las citocinas durante la infección respiratoria por los coronavirus humanos comunes.

Los coronavirus también causan infección de vías bajas aunque es menos común. Además, como ya se mencionó, los coronavirus contribuyen con porcentajes importantes como causa de exacerbaciones de enfermedad pulmonar crónica, asma y EPOC. Se ha postulado que las citocinas también tienen una función relevante en el origen de los síntomas de estas enfermedades (Greenberg, 2003).

Mención especial merece el coronavirus, recién descrito, que origina el síndrome respiratorio severo y agudo (SARS, por sus siglas en inglés), y que al parecer es un virus que proviene de una especie animal. Este virus, cuando infecta al ser humano, induce la migración de numerosas células en la mucosa respiratoria, y la expresión elevada de numerosas citocinas, entre ellas el IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  y la IL-6. Así entonces, la teoría prevaleciente es que la gravedad de la enfermedad está dada, entre otros factores, por una “tormenta de citocinas”, es decir, la producción elevada de mediadores proinflamatorios, que dan como resultado un influjo excesivo de células inflamatorias. Las células inflamatorias tienen un gran potencial microbicida que puede dañar tanto células infectadas como células normales y en el caso del SARS estarían causando un daño de tipo inmunopatológico. Las citocinas como tales también pueden producir daño en el tejido respiratorio, por ejemplo, como resultado de la inducción de la apoptosis (Perlman y Dandekar, 2005; Chen y Subbarao, 2007).

### ***Virus de influenza***

La influenza epidémica o estacional cobra sus cuotas de morbilidad y mortalidad todos los años; la pandémica, de manera impredecible, es muy esporádica, pero cuando ataca alcanza cifras muy elevadas de mortalidad. Quizá el virus más mortal en la historia de la humanidad ha sido el virus de la influenza. Cálculos conservadores indican que en 1918 y 1919 murieron entre 20 y 40 millones de seres humanos a causa de una cepa de virus de influenza A. Es fácil ver porque el finado Sir Peter Brian Medawar, premio Nobel en fisiología y medicina, dijo “Un virus es un paquete de malas noticias envuelto en proteínas (Johnson, 2000).

Existen tres tipos de virus de influenza, el A, el B, y el C. De los tres el más importante es el A. Este virus tiene la capacidad de producir nuevas cepas virales, alguna de las cuales podría resultar de alta patogenicidad, gracias a dos mecanismos genéticos de variación antigénica, mecanismos mediante los cuales evade la respuesta inmunitaria. Uno de los dos mecanismos, la reasociación de segmentos genómicos de diferente origen (v.g. de cepa aviar con cepa porcina) es la base de la aparición de cepas pandémicas, los virus B y C cuentan sólo con uno de estos mecanismos, la deriva antigénica. Además el virus de la influenza A tienen numerosos reservorios animales, desde los gatos hasta las ballenas, pasando por el ser humano, lo cual hace de su erradicación un objetivo inalcanzable. Así entonces en lo sucesivo nos referiremos sobre todo al virus de la influenza tipo A.



El virus se transmite por las gotitas de aerosol expelidas durante los estornudos y la tos. Una vez en el interior del organismo, el virus se puede multiplicar en cualquier nivel del aparato respiratorio. Un periodo de incubación corto (de dos a tres días), altos títulos de virus en las secreciones nasofaríngeas, periodos más bien largos de excreción viral, y una cantidad relativamente pequeña de inóculo para la transmisión a una persona susceptible, hacen que los brotes de influenza sean de naturaleza explosiva (Nicholson, 1992).

El principal daño observable, mediante broncoscopía, de individuos con influenza aguda típica y sin complicaciones es la inflamación. Ésta es difusa y se presenta en la laringe, la tráquea y los bronquios. Además, las biopsias de humanos y ratones infectados con el virus, revelan desde pérdida leve de células hasta descamación extensa, así que el daño producido de manera directa por el virus es considerable; y este daño a su vez puede ser por la replicación del virus o por apoptosis inducida por el mismo (Renegar, et al., 2004). No obstante, se han realizado observaciones que indican que una buena parte de los síntomas se deben también a la respuesta del huésped. El daño epitelial va acompañado de un infiltrado celular compuesto principalmente de linfocitos y macrófagos, y de la producción de citocinas, como TNF-alfa, IL-1, IL-6, IL-8 e IFN- $\gamma$ . In vitro se ha confirmado la capacidad de las células epiteliales respiratorias para producir citocinas proinflamatorias ante la infección por el virus de influenza A (Skoner et al., 1999; Chan et al., 2005; Xu et al., 2006); sin embargo, nuestros conocimientos sobre los factores quimiotácticos responsables del reclutamiento celular son incompletos. In vivo, se ha observado que pacientes con infección por influenza aviar producen una mayor cantidad de citocinas y quimiocinas en comparación con pacientes con cepas menos virulentas de influenza (Korteweg y Gu, 2008). A su vez, los macrófagos, bajo efecto del virus, pueden secretar una cantidad adicional de factores solubles, como IL-1 $\beta$ , TNF-alfa, IFN alfa y beta, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , y MCP-1 (Cheung et al., 2002; Gill et al., 2008); y la capacidad de los macrófagos para producir citocinas se ha relacionado con la severidad de la enfermedad (Cannell et al., 2006). La idea general es que la severidad del cuadro se correlaciona con el extenso daño en la mucosa, la cantidad de virus excretado y la producción de factores solubles proinflamatorios, o una deficiente regulación de esta producción durante la infección (Roberts et al., 1986; Nicholson, 1992; Skoner et al., 1999; Julkunen et al., 2000; Welliver et al., 2007).

Entre las principales complicaciones de la infección por el virus de influenza se encuentran la neumonía y las exacerbaciones de asma y EPOC. Durante la neumonía se observan entre otros signos, hemorragias, edema alveolar e inflamación intersticial, de aquí que los factores proinflamatorios deben de tener un papel relevante durante la generación del daño pulmonar, como indican los trabajos con otros modelos de neumonía (Van Reeth et al., 2002). Aunque los RV y los CoV contribuyen con la mayoría de las exacerbaciones de enfermedad pulmonar crónica el virus de la influenza también contribuye con hasta 25 % de los casos. Los mecanismos mediante los cuales el virus de influenza y los demás virus respiratorios inducen las exacerbaciones de las enfermedades crónicas respiratorias no están muy bien entendidos, pero probablemente se relacionan con los mediadores inflamatorios y con las células inflamatorias reclutadas (Rothberg et al., 2008; Proud y Chow, 2006).

### ***Virus sincitial respiratorio***

El virus sincitial respiratorio (RSV) se descubrió en 1955 y adquirió su nombre debido a la capacidad de formar células gigantes multinucleadas o sincitios, durante la infección de células en cultivo. Pronto se conoció la importancia de este virus como agente causal de enfermedad respiratoria. El virus es el patógeno más común en niños pequeños y es la causa

más importante de infección respiratoria grave del tracto inferior, de los mismos niños, en el ámbito mundial; se calcula de manera aproximada que causa 4.19 millones de consultas médicas, 100 000 hospitalizaciones y más de 200 muertes anuales en Estados Unidos; con un impacto económico anual de 300 a 500 millones de dólares en hospitalizaciones, así que su impacto en nuestro país es posible que sea similar, pero no se han hecho estudios para evaluarlo. Además, se ha observado una clara asociación entre la bronquiolitis por RSV en niños pequeños y el desarrollo de asma, aunque la naturaleza de esta asociación no está completamente entendida. La reinfección sintomática con este virus es frecuente en todos los grupos de edad, lo cual refleja una inmunidad incompleta hacia el virus; y el virus se ha reconocido como un importante causante de neumonías entre los adultos, principalmente inmunocomprometidos y ancianos (Hashem y Hall, 2003; Lee et al, 2005; Mohapatra y Boyapalle, 2008; Bueno et al., 2008).

El epitelio respiratorio es el principal objetivo del RSV. Después de la entrada del virus, éste se multiplica en la mucosa respiratoria, lo cual produce daño epitelial e infiltración perivascular mononuclear. Las células epiteliales infectadas por el virus responden produciendo potentes mediadores inmunomoduladores e inflamatorios, que incluyen citocinas y quimiocinas. Las quimiocinas inducen la migración de numerosas células inflamatorias que están compuestas principalmente por células mononucleares y polimorfonucleares. Y las células reclutadas contribuyen con la producción adicional de citocinas y quimiocinas, todo como parte de la respuesta del hospedero contra la infección. Sin embargo la bronquiolitis se asocia con una intensa respuesta inflamatoria, y las autopsias de niños que han muerto por bronquiolitis causada por este virus, revelan un alto grado de inflamación y la subsiguiente obstrucción respiratoria. La infección produce pérdida de cilios, desprendimiento y acumulación de células epiteliales en la vía respiratoria, y acumulación de leucocitos polimorfonucleares, fibrina, linfocitos y moco dentro de la vía respiratoria, con edema alrededor de la misma. El grado de daño epitelial se ha correlacionado con la magnitud de la inflamación y la hiperreactividad respiratoria. Las citocinas que se producen durante la infección natural o experimental por el virus son citocinas proinflamatorias, entre las que se encuentran IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, GM-CSF, G-CSF e IFN (alfa y beta). También se producen citocinas que se relacionan con procesos alérgicos como la IL-10, IL-13; y quimiocinas, IL-8 (citocina proinflamatoria y quimiotáctica), GRO, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , y RANTES. Las citocinas proinflamatorias tienen efecto local en la mucosa y algunas observaciones sugieren que pueden tener un efecto antiviral directo (Noah et al., 1995; Okamoto et al., 1993; Neuzil et al., 1996; Smyth, 2007; Mohapatra y Boyapalle, 2008).

Al parecer las células epiteliales y los macrófagos son componentes claves de la respuesta innata del hospedero en la mucosa respiratoria y sus funciones comienzan con la producción de citocinas y quimiocinas al ocurrir la infección viral. Con la producción de factores solubles se induce la migración de las células inflamatorias y las células predominantes son los neutrófilos. Hasta hace poco había escasa información sobre las quimiocinas producidas en la mucosa respiratoria, ahora se sabe que la IL-8, que recluta neutrófilos, se incrementa en las vías respiratorias superiores de niños con bronquiolitis por RSV y que la cantidad de mRNA de IL-8 se asocia con la severidad de la enfermedad. También se han detectado MCP-1, MIP-1 $\alpha$  y RANTES (Smyth, 2007). Se especula, por otra parte, que los monocitos deben también ser reclutados al sitio de daño, ya que cumplen con funciones claves para el desarrollo de la respuesta adquirida, pero se desconocen los mecanismos de reclutamiento.

La patogénesis del RSV tiene características peculiares. La enfermedad severa por el RSV parece estar dada por un componente inmunológico, ya que se asocia con eosinofilia. Los productos de la degranulación de los eosinófilos se presentan en lavados nasales y suero de niños con infección primaria severa (Ingram et al., 1995), y los niños con enfermedad agravada por vacuna presentan eosinofilia en sangre periférica (Chin et al., 1969). En ratón, como modelo, se ha visto que la inmunización con la proteína G del virus produce eosinofilia (Simard et al., 1997), y que cuando se estimulan los linfocitos T CD8+ se reduce la expresión de citocinas Th2 y de manera concurrente la eosinofilia (Srikiatkhachorn y Braciale, 1997).

El IFN, el factor antiviral prototipo, es inducido de manera escasa por el RSV en comparación con el virus de influenza (Hall et al., 1978). No obstante, los niveles de IFN correlacionan con la actividad de las células asesinas naturales, en ratones retados con el RSV, y la actividad de las células asesinas naturales se presenta pronto, con un pico en el día 3 postinfección (Anderson et al., 1990). Lo cierto es que no se han determinado los papeles que tienen el IFN y las células asesinas naturales en la patogénesis y la defensa contra el RSV, además parece ser que el virus tiene estrategias para inhibir la producción del IFN y para resistir los efectos del mismo (Becker et al., 2006; Bueno et al., 2008).

En realidad, se desconocen los detalles de la patogénesis de la infección por el RSV. No se sabe, por ejemplo, porque el RSV produce diferentes cuadros, desde un cuadro catarral hasta enfermedad severa como la bronquiolitis; no obstante, se cree que bronquiolitis es el resultado no sólo de los efectos citopáticos directos del virus, sino también de la respuesta inflamatoria del huésped. Ambos factores se combinan para inducir la patología del tracto respiratorio que se manifiesta como signos y síntomas de la enfermedad por el RSV. La respuesta inflamatoria es compleja e incluye diferentes elementos celulares y solubles que incluyen a las citocinas de las células T cooperadoras, rutas neurológicas, leucotrienos y quimiocinas (Jafri, 2002).

En general prevalece la idea de que para el control y la eliminación de la infección por el RSV es necesaria una respuesta óptima de tipo Th1, y que un desbalance en las citocinas Th1/Th2 facilita el desarrollo de un cuadro grave por la infección. Las principales observaciones se han hecho durante el desarrollo de los cuadros graves durante la infección natural, y durante los estudios de la vacuna inactivada con formol (FI), que no indujo protección sino agravamiento de la enfermedad durante la infección natural en niños (Kapikian et al., 1969). Por ejemplo, en los niños con enfermedad grave por este virus se produce poco IFN y se presentan cuentas bajas de linfocitos T en sangre periférica, o bien se produce una proporción significativamente mayor de IL-4, lo cual corresponde a una respuesta de tipo Th2 (Aberle, 1999; Roman et al., 1997; Bont et al., 2001). También se han observado incrementos significativos en la producción de IL-8, durante la bronquiolitis en niños infectados con el RSV, y de IL-10, otra citocina de tipo Th2, además esta última citocina se asocia con el desarrollo de sibilancias recurrentes (Abu-Harb et al., 1999; Bont et al., 2000; Kimpen, 2001). Con el modelo de la vacuna FI se ha visto un agravamiento de la enfermedad pulmonar y un cambio hacia una respuesta Th2 más pronunciada (Boelen et al., 2001). Otras observaciones interesantes son que las células mononucleares de recién nacidos producen menos IL-6 y TNF-alfa ante la infección por RSV que las células mononucleares de adultos (Matsuda et al., 1996). Además las CM infectadas por el RSV tienen una reducida apoptosis, reducción que es mayor con CM de recién nacidos (Krilov et al., 2000). Estas observaciones explicarían por qué la enfermedad es más grave en los niños pequeños.

El tratamiento de las infecciones por RSV está dirigido a invertir los efectos inflamatorios y fisiológicos de la infección y a reducir la excreción de virus. En estos dos

sentidos no se ha demostrado que la administración de corticoesteroides mejore el curso de la enfermedad grave, y sólo se cuenta con un antiviral, la ribavirina, cuya eficacia se ha puesto en duda (DeBoeck et al., 1996). Está claro, por tanto, que el estudio de la respuesta inmunitaria local y el entendimiento de la cascada inflamatoria en las vías respiratorias son claves para entender la patogénesis de la bronquiolitis por RSV y para tratar de administrar un tratamiento efectivo (Smyth, 2007).

### ***Virus de parainfluenza***

El virus de parainfluenza (PIV) tiene cuatro serotipos, 1, 2, 3 y 4, son patógenos respiratorios importantes, y se han asociado con todos los tipos de enfermedad del tracto respiratorio superior e inferior, en adultos y niños. Los virus de parainfluenza son la segunda causa, después del RSV, de enfermedad respiratoria grave del tracto inferior en lactantes y niños preescolares. Además, tienen la marcada tendencia a causar laringotraqueobronquitis o croup en niños pequeños. Hay una fuerte relación entre los serotipos y síndromes clínicos específicos, edad de los niños, y época del año. Los puntos más interesantes son que el serotipo 4 se asocia principalmente a infecciones del tracto superior; y el serotipo 3, el cual tiene un tropismo más amplio, causa bronquiolitis y neumonía en lactantes, de hecho es el segundo agente causal de tales cuadros después del RSV. En este respecto y en otros, el virus de parainfluenza 3 se parece más al RSV. La infección experimental de adultos sanos con el virus de parainfluenza produce una infección leve o moderada del tracto superior, con síntomas de descarga nasal, obstrucción y estornudos y evidencias clínicas de eritema de las vías nasales y la garganta; es decir, un resfriado, pero pueden poner en riesgo la vida de los pacientes inmunocomprometidos y los trasplantados, en estos pacientes los virus causan neumonitis. Muchas infecciones en los niños también quedan confinadas al tracto respiratorio superior, no obstante la infección por virus de parainfluenza a menudo va acompañada por otitis media (Denny et al., 1983; Schmidt, 2007).

En experimentos de muestreo de aire los virus de parainfluenza se pudieron recuperar sólo de un 5 % de los niños infectados (2 de 40), a una distancia de 60 cm. Por tanto, la transmisión es improbable que se lleve a cabo a través de aerosol de partículas pequeñas. Se cree que los virus de parainfluenza se transmiten de manera similar al RSV; por contacto cercano a través de aerosoles de gotitas mayores, o por superficies contaminadas que causan autoinoculación directa. La transmisión persona a persona por contacto directo de manos parece ser un modo improbable de transmisión, ya que el serotipo 3 colocado experimentalmente en los dedos de voluntarios perdió más del 90 % de su infectividad en los primeros 10 minutos (Henrickson, 2003).

Los virus de parainfluenza comparten numerosas propiedades estructurales, replicativas, patogénicas y clínicas con los virus de influenza y el RSV. El receptor para el virus de parainfluenza, el ácido siálico, está ampliamente diseminado en el cuerpo. Sin embargo, la multiplicación viral está confinada a las células epiteliales respiratorias, a las células dendríticas y a los macrófagos que recubren el tracto respiratorio. Así que la disponibilidad del receptor no explica la distribución limitada de la infección, y no se sabe de qué manera el virus de parainfluenza causa los síntomas localizados en la laringe-tráquea en el humano.

La destrucción focal del tejido causada por los PIV es usualmente leve y se repara rápidamente y, en muchas infecciones, incluso no es detectable. La infección de los inmunocomprometidos es la excepción, donde la neumonía de células gigantes puede causar la muerte (Henrickson, 2003). La primera línea de defensa contra el virus de parainfluenza

comprende los mecanismos de defensa no específicos del aparato respiratorio, que pueden bloquear la infección inicial; estos mecanismos son la barrera mucociliar y los inhibidores de proteasas que pueden detener la activación de las proteínas de superficie del virus. Otros mecanismos de defensa pueden ser la producción de citocinas y las células asesinas naturales. Es casi seguro que las células dendríticas y los macrófagos tengan una función clave en la presentación de antígeno al sistema inmune y en la iniciación de la respuesta adaptativa. Se desconocen los mecanismos inmunitarios y las rutas involucradas en daño celular local. La IgE específica de virus y la histamina tal vez contribuyan con la enfermedad severa en niños lactantes. Por otro lado, ratas con anticuerpos contra el PIV-3 inactivado con formol, mostraron inflamación pulmonar aumentada durante el reto con virus vivo (Henrickson, 2003). se desconoce si se trata de un fenómeno de inmunopatogénesis como el postulado para el caso del RSV.

La infección de las células epiteliales, el sitio de la infección productiva primaria, es muy posible que tenga una función en la inducción de inmunidad mediante la expresión de citocinas que amplifiquen y dirijan la respuesta de los linfocitos hacia al respuesta Th1 que caracteriza la infección natural. Se cree que la respuesta de los linfocitos T citotóxicos, la producción de IgG y la de IgA, detienen de manera definitiva la infección; y que la IgE debe estar implicada con la bronquiolitis producida por el virus de la virus de parainfluenza.

## **Adenovirus**

Las infecciones por los adenovirus (AdV) ocurren durante toda la vida, y contribuyen con aproximadamente de 5 a 10 % de los casos de enfermedad respiratoria aguda febril; 5 % de las enfermedades respiratorias agudas de niños menores de 5 años de edad; 10 % de las neumonías en el mismo grupo de edad. Los adenovirus también se asocian a exacerbaciones de EPOC. Los reclutas, por las condiciones de fatiga y hacinamiento en que viven, también son un grupo susceptible a la infección, y por razones evidentes, los sujetos inmunocomprometidos como trasplantadas, pacientes con cáncer y pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (Hayashi y Hogg, 2007). A la fecha se han identificado 64 diferentes tipos y subtipos de AdV que infectan al ser humano (más numerosos aislamientos no identificados), los cuales se agrupan en seis subgéneros, *Human adenovirus A-F*. (Büchen-Osmond, 2006). Los AdV humanos son principalmente patógenos respiratorios; sin embargo, también infectan el tracto gastrointestinal, la vejiga urinaria y ocasionalmente el hígado, el páncreas y el sistema nervioso central. Estos virus han cobrado importancia reciente, por los mecanismos que emplean para contrarrestar la defensa del huésped. Además, gracias a su uso frecuente como vectores genéticos se han logrado descubrimientos adicionales sobre su biología y su patogénesis.

Los mecanismos de patogénesis de la infección respiratoria por los adenovirus son más complejos que los de los virus anteriores; sin contar con su potencial oncogénico (animales de laboratorio) y con su capacidad de establecer infección persistente en el humano. No se tiene un modelo animal adecuado para experimentar la patogénesis de la infección respiratoria por AdV. La capacidad de los AdV para infectar diferentes tejidos, radica en una proteína de la cápside, la fibra del pentón, la cual es la proteína de adsorción del virus y tiene capacidad de hemaglutinina. Esta proteína reconoce una inmunoglobulina de superficie la cual por esta razón se denomina receptor para adenovirus y coxsackievirus (CAR) (ya que estos virus también la reconocen), aunque se dice que reconoce múltiples receptores entre ellos los grupos siálicos. Dos integrinas ( $\alpha V\beta 3$  y  $\alpha V\beta 5$ ) colaboran con la entrada de los AdV, así que algunos autores las han denominado correceptores de los

adenovirus (Fuller y Perez, 2002; Zhang y Bergelson, 2005; Bangari et al., 2005; Summerford et al., 1999), de aquí la versátil capacidad de los AdV para infectar diversos tejidos.

Los estudios de patogénesis están limitados debido a la carencia de modelos animales que reproduzcan las enfermedades que se ven en los humanos. Se han hecho estudios en ratas del algodón (*Sigmodon hispidus*), en la medida en que son susceptibles a infección intranasal con el serotipo 5 de adenovirus. Estos animales desarrollan una histopatología pulmonar similar a la de los humanos. No está claro si el efecto dañino en las células o las respuestas inmunitarias del hospedero son las principales responsables de la patología en los tejidos y las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Por el otro lado, las manifestaciones clínicas graves en los humanos se observan en pacientes inmunosuprimidos, y la reconstitución inmunitaria siempre es benéfica (Echavarría, 2008).

Las células humanas que son infectadas por los AdV pueden resultar dañadas y morir, éste es el mecanismo primario de daño y de producción de enfermedad. La infección aguda por AdV lleva rápidamente a la inhibición de la síntesis de proteínas de la célula hospedera y a la muerte celular. En humanos se ha visto destrucción extensa del epitelio bronquial y de las glándulas bronquiales en casos de infección fatal. Después de la infección aguda los AdV pueden producir infección persistente con excreción viral durante años. Dos de los sitios donde parecen establecer infección persistente son las amígdalas, lugar donde se aislaron por primera vez, y el pulmón. Se ha visto que en estos lugares puede permanecer el DNA viral en ausencia de virus recuperable (Hu et al., 1992; Macek et al., 1994). También se ha asociado a los AdV con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), pero se desconocen los mecanismos subyacentes, aunque una de las ideas estudiadas es la capacidad de la proteína E1A de aumentar la expresión de mediadores de la inflamación (Hayashi y Hogg, 2007).

Después de la infección por AdV, la mayoría de los pacientes desarrollan anticuerpos específicos de subgrupo y de tipo contra la cepa infectante. La neutralización es específica de serotipo y está dirigida contra las proteínas de cápside, el hexón y la fibra del pentón entre ellas. La eliminación final del virus probablemente necesita de la participación de diferentes células entre las que se encuentran macrófagos, linfocitos, y células asesinas naturales, así como de factores humorales que incluyen anticuerpos, complemento, IFN y citocinas. Aunque hay evidencias de que la respuesta humoral modifica el curso de la infección por AdV, los mecanismos mediados por células son los responsables de acorralar y resolver la infección. Esta conclusión está corroborada por estudios recientes en terapia génica que usan vectores AdV defectuosos en la replicación. En hígado de ratón normal, cuando se inoculan vectores AdV deletados en E1, se estimula una fuerte reacción inflamatoria y declina la expresión transgénica durante las semanas iniciales (Yang et al., 1994). Es decir, se genera una respuesta inflamatoria dirigida por células en ausencia de progenie viral. Este estudio sugiere que la respuesta inmune mediada por células T dirigida contra las proteínas del AdV elimina al vector, aunque también causa daño local en los tejidos.

## **Respuesta antiviral del hospedero**

De manera resumida, los eventos celulares que ocurren en la mucosa se pueden dividir en los que preceden y lo que siguen al reclutamiento de células T. En la primera fase los efectores no específicos de la respuesta inmunitaria son claves para contener la infección viral. En primer lugar el virus se multiplica en el tracto respiratorio, y alcanza un pico alrededor de los dos días. En este momento se desencadena el proceso inflamatorio por la producción de factores solubles. Hay un reclutamiento de células, principalmente neutrófilos

y macrófagos, pero también pueden estar presentes linfocitos, eosinófilos, basófilos, células cebadas y células dendríticas (DC). Las células inflamatorias colaboran con la producción de más factores solubles y organizan los siguientes pasos de la defensa. Entre los factores solubles se detectan los interferones, con un pico de producción alrededor del día 3 y caen a un nivel no detectable por el día 8. Los IFNs activan a las células NK, las cuales son detectables por el día 3 y tienen un pico en el día 4. También se reclutan macrófagos y neutrófilos. Además de la destrucción de las células infectadas, las NK liberan citocinas, que incluyen al IFN- $\gamma$ , que activa a más células inflamatorias en las vías aéreas. Los macrófagos también contribuyen con la producción de citocinas, tienen actividad fagocítica y pueden presentar los antígenos virales. Las células dendríticas reclutadas, una vez que engloban a los virus y procesan sus antígenos, pueden regresar a los ganglios regionales, para presentar los antígenos a las células T. Los mecanismos inmunitarios no específicos son esenciales para una rápida defensa contra el virus durante los primeros días de la infección. Se desconoce la participación de los neutrófilos, pero algunos datos indican que tal vez tengan un papel importante en la defensa inicial.

En esta etapa de la respuesta inmunitaria antiviral, los antígenos virales son procesados localmente en los ganglios linfáticos regionales por las células dendríticas y son luego presentados a las células T. Usualmente los virus respiratorios no se multiplican en los ganglios, con excepción de los adenovirus, cuya patogénesis es más compleja que la de otros virus respiratorios. En esta fase los ganglios se agrandan debido a un incremento en la celularidad en un factor de tres o mayor, donde la mayoría de las células reclutadas son inespecíficas para los antígenos virales. Durante la interacción de las células presentadoras de antígeno con las células T es importante la producción de citocinas. Las citocinas expresadas por las células presentadoras de antígeno son la IL-1 y la IL-6, y por las células T son la IL-2 y el IFN- $\gamma$ , debido a lo cual reciben el nombre de células T cooperadoras de tipo 1 (Th1) (a diferencia de la respuesta de tipo Th2 caracterizada por la producción de IL-4, y que se considera eficiente para la defensa contra los parásitos helmintos). Después de la activación de linfocitos, el número de linfocitos específicos en los ganglios aumenta en un factor de 2 mil veces aproximadamente. Del cuarto al sexto día se pueden detectar los primeros linfocitos T CD4 y CD8 específicos. El pico de células CD8 citotóxicas se da en el día 7, y luego declina, para volverse no detectable alrededor del día 14. Sin embargo, las células de memoria CD4 y CD8 pueden durar toda la vida. El reclutamiento de células inflamatorias y de células T depende tanto de la producción de quimiocinas como de la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio del tejido inflamado. Con el tiempo también se genera una respuesta de células B. En el día 3 de la infección ya se puede detectar IgA en la mucosa, del día 5 al 6 IgM en el suero, y en el día 7 u ocho IgG, principalmente IgG1 e IgG3. Las inmunoglobulinas aumentan en concentración y en avidéz durante un periodo de 2 a 3 semanas. Luego la IgA cae a niveles fuera de detección después de 3 a 6 semanas, mientras que la IgG del suero puede durar toda la vida. Los mecanismos inmunitarios específicos como las células CD8 citotóxicas y las inmunoglobulinas son responsables de la erradicación final del virus usualmente a los 7 días de la infección. Así durante el proceso clave de la generación de los efectores adquiridos de la respuesta inmunitaria, tres células son cruciales, las células dendríticas, las células B y las células T; no obstante, también debe de haber cooperación de otros tipos celulares como los macrófagos y las células epiteliales.

Una infección secundaria con el mismo virus da como resultado una rápida movilización de células T y B específicas, con un pico de células T más rápido que durante la primoinfección, que coincide con el pico de células NK en el día 3 o 4. Si la reinfección es con el mismo serotipo de virus, un rápido incremento en los niveles de anticuerpos

neutralizantes preexistentes puede limitar la multiplicación viral en tal grado que la infección pasa asintomática. Como menos células resultan infectadas en este escenario, hay una menor activación de la inmunidad no específica y del proceso inflamatorio. Esta es la clásica respuesta inmunitaria contra la infección viral respiratoria. Los datos se han obtenido gracias a numerosos estudios de pacientes, con voluntarios, estudios en modelos animales, principalmente en ratón, y estudios in vitro (Message y Johnston, 2001).

## **Componentes de la respuesta inmunitaria**

### ***Receptores de reconocimiento de patógenos***

Un requisito para el inicio de las respuestas del hospedero es el reconocimiento de los patógenos por el sistema inmunitario. Un gran avance en este campo fue el descubrimiento de los receptores de tipo Toll (TLRs). Los TLRs constituyen en el ser humano, una familia de 10 receptores codificados por la línea germinal. Estos receptores actúan como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y detectan una gran variedad de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (se supone que también pueden reconocer moléculas propias). Además, también se han descubierto moléculas citosólicas que sirven como un segundo sistema de vigilancia para detectar patógenos invasivos, éstas incluyen a miembros de la familia NLR (de receptores con repeticiones ricas en leucina con dominios de tipo NAIP), así como a RIG-I (gen I inducible del ácido retinoico) y MDA5 (gen 5 asociado a la diferenciación de melanoma). Tanto los TLRs como los NLR poseen dominios LRR (repeticiones ricas en leucina), los cuales parecen ser cruciales para el reconocimiento de patógenos. Los PRRs están ampliamente distribuidos en las células del sistema inmunitario, las cuales incluyen monocitos-macrófagos, fagocitos polimorfonucleares (PMN), células dendríticas, células asesinas naturales (NK), lo mismo que en células epiteliales de las mucosas y células endoteliales. Los diferentes PRRs reaccionan con PAMP específicos, muestran patrones de expresión distintivos, activan rutas de señales específicas y llevan a respuestas anti-patógenos distintivas también. La activación de los PRRs induce las respuestas necesarias para el desarrollo de las ramas innata y adaptativa de la respuesta inmune (Hippenstiel et al., 2006; Akira et al., 2006; Krishnan et al., 2007).

A la fecha se conocen 10 TLRs, de los cuales TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 se encuentran de manera predominante en la superficie de la célula, mientras que, un segundo grupo, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se localizan en compartimientos endosómicos. Los heterodímeros de TLR1/TLR2 son indispensables para la detección de lipopéptidos bacterianos triacilados y peptidoglicanos; Algunos lipopéptidos diacilados, beta-glucanas como el zymosán, lipoarabinomananas de *M. tuberculosis* y ácidos lipoteicoicos son reconocidos por los heterodímeros TLR2/TLR6, por homodímeros de TLR2 o por heterodímeros de TLR2 con otro u otros receptores todavía no identificados; TLR2 también tiene la capacidad de identificar la hemaglutinina del virus de sarampión (un virus que también entra por vía respiratoria); TLR4 en complejo con MD-2 es esencial para reconocer al LPS y transducir señales, además TLR4, también reconoce a la proteína de fusión del RSV. TLR5 identifica la flagelina, una proteína de bacterias tanto grampositivas como gramnegativas, y se encuentra en la superficie basolateral, pero no apical, de las células epiteliales intestinales. El segundo grupo de TLRs detectan ácidos nucleicos microbianos dentro de endosomas, compartimientos de los cuales están excluidos los ácidos nucleicos del hospedero y en los cuales pueden quedar expuestos los ácidos nucleicos de los patógenos. TLR3 reconoce ácidos ribonucleicos (RNA) de doble cadena (dsRNA) virales, mientras que TLR7 y TLR8 reconocen moléculas virales de RNA de cadena sencilla (ssRNA), lo cual se ha confirmado para el virus de influenza. TLR7 en ratón y en humanos, y TLR8 en humanos



reconocen análogos de nucleósidos como el imiquimod, una droga con actividad antiviral y antitumoral, que se cree que imita a los ligandos naturales de ssRNA. Los motivos de DNA ricos en CpG no metilados, bacterianos y virales, son reconocidos por el TLR9. Los humanos (pero no el ratón) expresan TLR10 cuya especificidad se desconoce (Akira, 2003; Beutler et al., 2006; Bowie, 2007). En relación con RIG-I se ha visto que identifica RNA pequeños de cadena sencilla o doble, de diferentes virus, entre ellos el virus de la influenza A (Pichlmair et al., 2006). La presencia de DNA en el citoplasma indica infección o daño celular, y de un modo u otro su detección es clave para inducir los mecanismos de defensa, esta función de sensor de ADN citoplásmico se descubrió hace poco que la pueden realizar AIM2 (Bürckstümmer et al., 2009) y el factor p202 (Roberts et al., 2009).

Como resultado de la detección de los agentes infecciosos, se activan variadas rutas de señales, incluyendo las que activan a los factores de transcripción el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y el factor 3 regulador de interferón (IRF3). NF- $\kappa$ B media la producción de varias citocinas proinflamatorias y varias proteínas apoptóticas (Santoro et al., 2003); por ejemplo, se ha demostrado que la infección de células epiteliales respiratorias con el RSV estimula la producción de IL-8 a través de la ruta del TLR3 (Groskreutz et al., 2006), y la producción de IL-6 a través del TLR4 (Kurt-Jones et al., 2000). De esta manera se cree que inicia la respuesta inmunitaria innata, no obstante, se desconocen todavía los detalles, y no está claro el papel de los TLRs in vivo durante la infección viral respiratoria, ya que por ejemplo, los eosinófilos también expresan TLR3, TLR7 y TLR9, y pueden ser activados in vitro por los ligandos de estos receptores, como moléculas de dsRNA y secuencias CpG (Mansson y Cardell, 2008). Debido a que el asma se caracteriza por una acumulación masiva de eosinófilos que liberan una variedad de mediadores dañinos para el tejido respiratorio, entonces los TLRs podrían también jugar un papel en el desarrollo de esta enfermedad. En otro ejemplo, la función exacta del TLR3 causa controversias, ya que varios estudios muestran que contribuye con la eliminación de virus específicos, mientras que otros demuestran que ciertos virus se pueden beneficiar de la estimulación del TLR3 (Vercammen et al., 2008). Por otra parte, a los TLRs se les ha asignado una función crucial en el desarrollo de la respuesta de tipo Th1, esencial para eliminar una infección viral del organismo. El modelo propuesto es uno complejo y robusto en el cual las células dendríticas estimuladas a través de los TLRs tienen una función relevante, estimular a su vez a las células T para que sinteticen IFN $\gamma$ , cuando éstas no han recibido otros estímulos necesarios (Nembrini et al., 2006; Parker et al., 2007). La participación de los TLRs en una respuesta eficiente contra los virus respiratorios se ha confirmado al menos en parte para el desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra el RSV (Delgado et al., 2009).

## **Macrófagos**

Los macrófagos son los leucocitos que se encuentran en mayor porcentaje (95 %) en el lavado bronquioalveolar, el resto son en su mayoría linfocitos, esto indica que los macrófagos cumplen con funciones claves de vigilancia en el pulmón y seguramente también en la cavidad nasal, aunque los macrófagos nasales no han sido tan estudiados como los alveolares. Los macrófagos se forman cuando los monocitos circulantes migran a los tejidos. Los monocitos son producidos en la médula ósea y liberados a la sangre, después se establecen en un sitio de residencia en un tejido. Una vez allí, las células se denominan macrófagos tisulares. Los macrófagos desempeñan funciones claves durante la infección viral respiratoria. Fagocitar a los patógenos y destruirlos. Presentar los antígenos virales a las células T cooperadoras para la inducción de la inmunidad adaptativa. Producir citocinas que amplifican la inflamación y/o modulan la respuesta inmunitaria, controlan la respuesta de las

células T hacia los antígenos y modulan la expresión de otras células (v.g. músculo liso, epiteliales, endoteliales) ante diversos estímulos. Los macrófagos también pueden contribuir con el daño al tejido al liberar enzimas o especies reactivas de oxígeno (Gordon y Read, 2002; Sabroe y Whyte, 2007).

Para cumplir con sus funciones, los macrófagos cuentan con una amplia variedad de moléculas de superficie y citoplasmáticas que facilitan su labor (Figura 1), por ejemplo,  $\gamma$ FcRI,  $\gamma$ FcRII,  $\gamma$ FcRIII, receptores de complemento, receptor de LPS, etc. Los macrófagos tienen un abastecimiento sustancial de lisosomas citoplasmáticos que contienen la mayor parte de los mismos constituyentes enzimáticos que se encuentran en los gránulos azurófilos de los neutrófilos; no obstante la lisozima en los monocitos es menos abundante que en los gránulos de los neutrófilos y los gránulos no se observan fácilmente en el microscopio de luz.

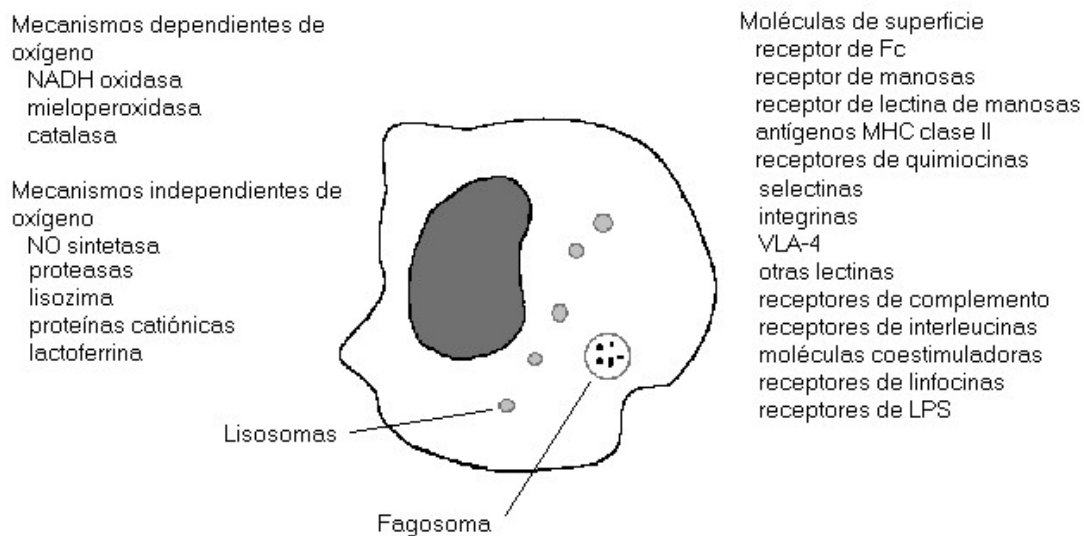


Figura 1. Repertorio molecular del macrófago. Se pueden observar numerosas moléculas de superficie con las cuales el macrófago reconoce distintos ligandos. Se representan los principales mecanismos microbicidas.

Los macrófagos residentes junto con las células epiteliales son las primeras células que se encuentran con los virus en la mucosa respiratoria. Los virus respiratorios se pueden unir a los macrófagos (v.g., rinovirus, coronavirus, RSV e influenza), pero no los infectan de manera productiva o bien tienen una multiplicación limitada en estas células. Sin embargo, las cepas de virus altamente patogénicas de influenza aviar sí tienen la capacidad de multiplicarse en los macrófagos (Panuska et al., 1992; Writing Committee of the Second World Health Organization Consultation on Clinical Aspects of Human Infection with Avian Influenza A (H5N1) Virus, et al, 2008). Otros virus virulentos, como el virus del SARS, pueden infectar a los macrófagos de manera no productiva y reducir o modificar significativamente la capacidad que tienen para producir citocinas (Panuska et al., 1990; Chung et al., 2005; Thiel y Weber, 2008).

Lo importante es que la interacción entre los virus respiratorios y los macrófagos los estimula para que secreten citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  (McNamara y Smyth, 2002; Panuska et al., 1995). La IL-1 y el TNF-alfa estimulan a las células T y son proinflamatorias. El TNF-alfa induce la expresión de ICAM-1 en las células epiteliales, esto facilita el tráfico de leucocitos al área de la infección (aunque ICAM-1 puede ser usada por los rinovirus para entrar en las células epiteliales). La IL-8 es una potente quimiocina para neutrófilos. La IL-12 activa a las células asesinas naturales (NK) y orienta la respuesta hacia el tipo Th1. El IFN-gamma también induce ICAM-1, además tiene una importante actividad antiviral directa, ya que limita la diseminación del virus induciendo un estado antiviral en las células epiteliales, aumenta la producción de citocinas y quimiocinas por las células epiteliales infectadas (Konno et al., 2002), y estimula a los linfocitos T para el desarrollo de la respuesta Th1. Los macrófagos infectados también producen IFN de tipo I (alfa y beta), un proceso que contribuye con el estado antiviral de las células epiteliales. Así entonces, las citocinas producidas por los macrófagos tienen efectos importantes para el desarrollo de la defensa del hospedero, entre ellos el reclutamiento de células inflamatorias.

La principal característica de la enfermedad respiratoria viral es una fuerte reacción inflamatoria, la cual se debe a la producción de los numerosos factores inflamatorios secretados por las células epiteliales y los macrófagos residentes. En este proceso hay un intenso reclutamiento de células y extravasación de numerosos componentes solubles. Entre las células, como se ha mencionado, destacan los neutrófilos, los monocitos y los linfocitos; aunque también se pueden encontrar eosinófilos en cantidades variables, y células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés). El proceso inflamatorio es en esencia protector, pero cuando es excesivo puede ser el responsable de daño en el tejido respiratorio. La producción excesiva de citocinas proinflamatorias puede tener resultados indeseados; y las células reclutadas en exceso pueden causar daño en el tejido mediante diferentes mecanismos; por ejemplo, producción de especies reactivas de oxígeno, liberación de enzimas, etc.

Al parecer la producción inicial de citocinas por los macrófagos y las células epiteliales es clave para el desarrollo de los siguientes pasos de la respuesta del hospedero. Por ejemplo, como ya se mencionó, se ha visto que los niveles de IL-8 e IFN-gama correlacionan con los síntomas del resfriado común. En la enfermedad grave producida por el coronavirus del SARS y por el virus de la influenza aviar se induce la producción elevada o excesiva de mediadores proinflamatorios y esto se correlaciona con un intenso reclutamiento celular en la mucosa y con daño en la misma. En la infección por RSV, influenza y parainfluenza antes de los 3 meses de edad se induce la producción de niveles altos de IL-4 (citocina de tipo Th2) (Kristjansson et al., 2005); mientras que en la infección por RSV en niños se estimula la producción de IL-10 y ésta se asocia con sibilancias recurrentes y desarrollo de asma (Kimpfen, 2001).

A pesar de la importancia evidente de los macrófagos durante la respuesta inicial del hospedero ante la infección, no se ha aclarado su participación en la patogénesis de la infección viral respiratoria. Tampoco se sabe mucho sobre los mecanismos de su reclutamiento; es decir, los mecanismos mediante los cuales los macrófagos se establecen de manera normal en los tejidos respiratorios y aquellos que determinan su migración durante la infección de la mucosa respiratoria.

## Células epiteliales

El epitelio respiratorio comprende una gran superficie entre el huésped y el ambiente y representa el blanco primario del ataque de los virus que entran al organismo por esta puerta. Además de actuar como una barrera mecánica, el epitelio funciona como un importante sistema de vigilancia contra los patógenos. Está equipado con receptores de reconocimiento de patrones moleculares que le permiten detectar a los patógenos invasores, ya que células epiteliales de pulmón humano en cultivo demuestran la capacidad de expresar mRNA de los 10 TLRs (Muir et al., 2004). También se ha demostrado que el TLR9 se expresa en células epiteliales bronquiales y de tráquea (Greene et al., 2005); y al menos TLR3 se ha visto que participa en el reconocimiento de los virus de influenza y rinovirus (Guillot et al., 2005; Hewson et al., 2005). A su vez los patógenos pueden modular la expresión de los TLRs. Por ejemplo, la infección de células epiteliales por el RSV o por el virus de influenza incrementa la expresión de TLR3 (Rudd et al., 2005; Groskreutz et al., 2006; Le Goffic et al., 2006). No obstante se desconoce el efecto de infecciones mixtas con diferentes patógenos en la expresión de los TLRs. Además, se ha visto que las células epiteliales respiratorias tienen la maquinaria completa para presentar antígeno, tanto moléculas del MHC clase I como moléculas coestimuladoras B7-1 y 2 (Papi et al., 2000).

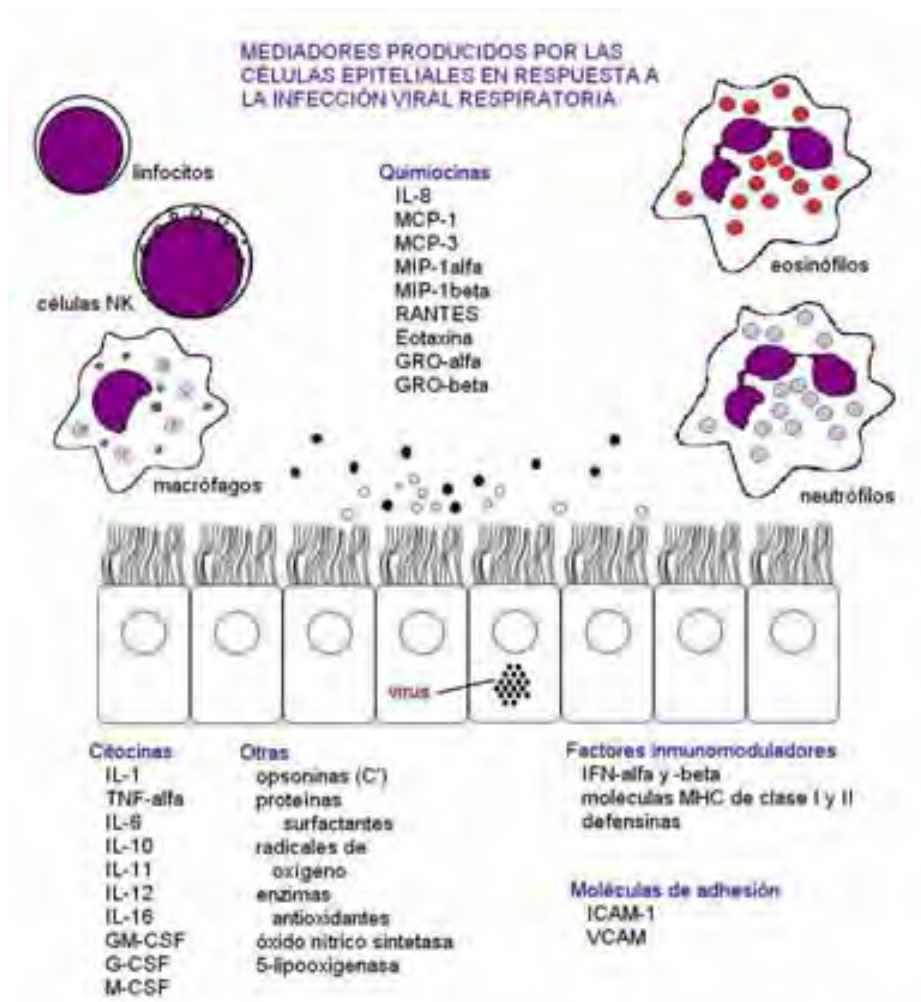


Figura 2. Moléculas producidas o expresadas por las células epiteliales respiratorias, infectadas por virus. Estas observaciones demuestran que las células epiteliales tienen una función clave en la inducción y el desarrollo de la respuesta inmunitaria antiviral.

La respuesta del epitelio respiratorio a los patógenos es compleja y refleja una gran variedad de estímulos y una compleja red de rutas de señales activadas. La respuesta del epitelio incluye la producción y secreción de mediadores inflamatorios tales como citocinas y quimiocinas, la inducción de moléculas de adhesión de superficie, y la liberación aumentada de péptidos antimicrobianos. La activación de las células epiteliales inicia entonces la expresión de citocinas y quimiocinas, y éstas inducen el reclutamiento de células inflamatorias al mismo tiempo que forman parte de la respuesta antiviral del hospedero. La infección viral induce la secreción de una amplia variedad de citocinas y quimiocinas inflamatorias que incluyen, como ya se ha mencionado, TNF- $\alpha$ , IFN $\lambda$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, GM-CSF, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , LTC $_4$ , MCP-1, MIP1 $\alpha$ , las eotaxinas, y RANTES (Garofalo, 2000; Message y Johnston, 2001; Kelly y Busse, 2008). Las células epiteliales también pueden secretar quimiocinas en respuesta a citocinas proinflamatorias y citocinas Th1 o Th2 (Matsukura et al., 1999). Además es posible que la mayor o menor expresión de receptores en las células epiteliales pueda volver a estas células más o menos susceptibles a la infección viral (Gern y Busse, 1999). Las citocinas producidas por las células epiteliales inducen la respuesta del hospedero al aumentar la permeabilidad vascular y causar la activación y reclutamiento de neutrófilos, macrófagos, linfocitos, células asesinas naturales (NK) y en algunos casos eosinófilos, al sitio de la infección (Figura 2).

Las células epiteliales pueden también secretar opsoninas como las proteínas del complemento y la proteína surfactante A, las cuales facilitan la fagocitosis de los microorganismos por los macrófagos y los neutrófilos (Zach et al., 1992; Garofalo y Haerberle, 2000). Así el epitelio no sólo sirve como blanco de la infección sino también es el sitio y fuente de la respuesta inflamatoria inicial.

## **Neutrófilos**

Los neutrófilos son las células más numerosas de los leucocitos circulantes, forman entre el 50 y el 60 % de éstos. También son las principales células de la respuesta innata del sistema inmunitario. Para cumplir con sus funciones de detección los neutrófilos cuentan con numerosos tipos de moléculas de superficie, como los TLRs, lectinas, receptores de lectinas, receptores de limpieza (*scavenger receptors*), receptores de complemento, receptor de IgG (Fc), con estos receptores pueden detectar directa o indirectamente moléculas no propias. Los neutrófilos son células fagocíticas que se reclutan rápidamente, durante una infección o daño a los tejidos. Son numerosos los factores que pueden reclutar a los neutrófilos, entre ellos se encuentran los componentes microbianos (v.g. formil-methionyl-leucyl-phenylalanina, fMLP), los quimioatrayentes clásicos como el factor activador de plaquetas (PAF) y proteínas del complemento (C5a), y las quimiocinas, como la IL-8. Para que los neutrófilos puedan detectar estos factores deben estar provistos con los respectivos receptores, fMLPR, PAFR, C5aR, y receptores de CXC quimiocinas (véase más adelante) (Luster, 2001). Además los neutrófilos cuentan con un eficiente arsenal de destrucción, poseen gránulos con mecanismos de elevada toxicidad contra los microorganismos; por ejemplo, enzimas proteolíticas; especies reactivas de oxígeno, (anión superóxido, singulete de oxígeno, ozono, peróxido de hidrógeno, ácido hipohalogenoso, cloraminas y radicales de hidroxilo), y proteínas antibacterianas (lactoferrina, lisozima). Cuando los neutrófilos fagocitan un microorganismo, los gránulos se fusionan con los fagosomas formados y mediante su poderoso arsenal finalmente matan al organismo invasor. Por último, estas células muestran una natural progresión hacia la apoptosis, así que después de cumplir su función mueren de manera programada y son fagocitadas y eliminadas por los macrófagos. El precio de esta

impresionante maquinaria de destrucción es el daño en el tejido, durante el proceso inflamatorio y este daño puede volverse crónico en enfermedades pulmonares como la EPOC.

Desde hace tiempo se ha sabido que muchas células responden a estímulos microbianos como el LPS, mediante la generación de quimiocinas que reclutan neutrófilos como la IL-8. En las vías respiratorias, muchos tipos celulares se ha demostrado que expresan TLRs pero la principal contribución con la producción de IL-8 está dada por las células epiteliales, y esto posiblemente a través de la activación de TLR3, RIG-I o MDA5 (Hippenstiel et al., 2006). En este caso de nuevo la interacción de los macrófagos con las células epiteliales de vías respiratorias puede tener un efecto sinérgico en la producción de mediadores para activar patrones específicos de inmunidad. La infección viral respiratoria es muy común y los neutrófilos son los leucocitos predominantes en vías aéreas durante algunas infecciones por virus, por ejemplo la bronquiolitis por RSV (Wang y Forsyth, 2000) y el resfriado común por rinovirus (Gern et al., 2000), lo cual está asociado a la producción de quimiocinas, como la IL-8 y el G-CSF en la mucosa, lo que sugiere que estos factores participan en el reclutamiento de neutrófilos al área de infección.

Los neutrófilos reclutados y sus productos pueden tener importantes funciones durante las infecciones virales. Los neutrófilos se pueden acumular en los sitios de inflamación, donde pueden representar importantes fuentes de mediadores proinflamatorios, especies reactivas de oxígeno, y proteasas. Las proteasas también tienen la capacidad de modificar las respuestas locales, ya que pueden digerir CD14 y disminuir la reactividad al LPS, pero también pueden inducir la producción de IL-8 por las células epiteliales (Nakamura et al., 1992) o pueden activar al TLR4 (Greene et al., 2005). Los sobrenadantes de neutrófilos cultivados pueden suprimir la liberación de TNF $\alpha$  de los macrófagos (Daley et al., 2005). Los neutrófilos se infiltran en el músculo liso durante la EPOC (Varadlo et al., 2004) y allí sus productos pueden causar la activación celular y pueden también inducir la apoptosis del músculo liso (Oltmanns et al., 2005). Los productos de los neutrófilos regulan la expresión del TLR2 en otros tipos celulares como las células endoteliales (Fan et al., 2003). Los neutrófilos también pueden representar una fuente importante de citocinas Th1 involucradas en la formación inicial de los granulomas (Molesworth-Kenyon, 2005). Conforme los neutrófilos mueren, el modo de muerte, por apoptosis o por necrosis, tiene un efecto profundo en el microambiente inflamatorio, y puede ser crucial en la transición exitosa de un sitio antimicrobiano de inflamación activa a uno de inmunidad adaptativa en el cual ocurra la reparación del tejido y la restauración de la arquitectura normal (Bianchi et al., 2006).

La activación de neutrófilos y su degranulación probablemente contribuyen con la sintomatología de las vías respiratorias durante la infección, al dañar a las células epiteliales. Esto podría ser por la liberación de citocinas, de especies reactivas de oxígeno, de enzimas (v.g. mieloperoxidasa y proteasas) y por el aumento de la secreción de moco por las células secretoras respiratorias, inducida por la elastasa de los neutrófilos (Gern et al., 2002; McNamara y Smyth, 2002; Taubenberger y Morens, 2008; Wark et al., 2000; Raja, 2004). Además, la infiltración por neutrófilos es característica también de enfermedades crónicas del pulmón, que incluyen el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Moritz et al., 2008).

Así el neutrófilo es una defensa inicial crucial durante la infección microbiana, pero también contribuye con la patogénesis de la infección viral, al aumentar el daño y desprendimiento epitelial. Además, la inflamación neutrofílica puede dar como resultado enfermedades devastadoras agudas o inflamatorias crónicas. En los pulmones el neutrófilo es una parte principal de la patología del síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS), y su

activación puede también ser de substancial importancia en la EPOC y algunas formas de asma. De esta manera, los inhibidores de quimiocinas, de moléculas de adhesión o de proteasas de neutrófilos pueden ser útiles en la prevención del daño epitelial inducido por éstas células. En conclusión, los neutrófilos tienen un función importante en la infección viral, y el tratamiento para prevenir el daño epitelial por neutrófilos tiene un gran potencial en la clínica (Wang y Forsyth, 2000).

## **Eosinófilos**

Los eosinófilos son células polimorfonucleares con típicos gránulos eosinofílicos, de aquí el nombre. Estas células tienen un papel fundamental en la defensa contra los helmintos, y están involucrados en las respuestas de tipo alérgico, en particular en el fenómeno del asma. Para la defensa, los eosinófilos pueden sintetizar diferentes metabolitos tóxicos; entre éstos están los intermediarios de oxígeno, como la peroxidasa de los eosinófilos (diferente de la mieloperoxidasa de los neutrófilos), una lisofosfatasa citotóxica llamada proteína de cristal de Charcot-Leyden, y cuando menos otras tres proteínas básicas abundantes, como la proteína básica mayor (MBP, por sus siglas en inglés) y la proteína catiónica de eosinófilos (ECP, *ídem*). Estas proteínas tienen afinidad por la eosina, colorante tomado de manera típica por los gránulos eosinofílicos. Los eosinófilos también secretan proteínas antivirales, como ribonucleasas que han demostrado actividad contra paramixovirus.

Los eosinófilos cuentan además con receptores, de baja afinidad, para inmunoglobulinas (Fc) en su superficie. Pueden unir de este modo antígenos que hayan sido reconocidos por la IgG o la IgE. La unión a estos complejos activan al eosinófilo e incrementan la expresión de receptores, el metabolismo oxidativo, la producción de derivados del araquidonato y leucotrienos, y la actividad citotóxica. Los eosinófilos también pueden ser activados por la producción de citocinas como el TNF- $\alpha$ , el GM-CSF, la IL-1, la IL-3 y la IL-5.

Los eosinófilos acuden a los sitios de daño atraídos por quimiocinas y otros mediadores. En dicho sitio pueden descargar su contenido granular, estimulados, por ejemplo, por la unión de complejos inmunes IgE-antígeno con el receptor de membrana. El contenido granular vaciado al ambiente extracelular puede ir asociado con destrucción de un parásito, o con daño en el tejido.

Aunque los eosinófilos han sido reconocidos desde hace mucho como células que participan en la respuesta inmune innata contra los helmintos, este punto de vista se ha ampliado gracias a reciente estudios sobre la patogénesis del RSV y de los rinovirus. Los parásitos intracelulares y los protozoarios no estimulan la respuesta de los eosinófilos; los virus de manera general, tampoco. Sin embargo, varios grupos han demostrado el reclutamiento y la degranulación de los eosinófilos en la mucosa respiratoria durante la infección por el RSV (Olszewska-Pazdrak et al., 1998; Pazdrak et al., 2002; Sigurs et al., 1994). Se han encontrado concentraciones superiores de proteína catiónica de eosinófilos en muestras nasofaríngeas de sujetos con bronquiolitis comparados con sujetos con infección de vías altas (Garofalo 1992); además, se ha visto que el aumento de la ECP correlaciona con la hiperreactividad de vías aéreas durante la infección grave (Ingram et al., 1995); así, esta proteína se usa actualmente como marcador biológico de severidad de la enfermedad por el RSV. Las células epiteliales infectadas por el RSV parece ser que son las que regulan la migración y la degranulación de los eosinófilos (Olszewska-Pazdrak et al., 1998; Pazdrak et al., 2002).

La infección experimental con rinovirus también incrementa la infiltración bronquial eosinofílica en biopsias bronquiales tomadas durante el pico de los síntomas, tanto en sujetos normales como asmáticos (Fraenkel et al., 1995). Además, se ha visto que el aumento de la ECP correlaciona con la hiperreactividad de vías aéreas en adultos asmáticos después de inoculación experimental con RV (Grünberg et al., 1997). Estas observaciones indican entonces que la infección viral puede disparar el reclutamiento y la activación de eosinófilos durante episodios de hiperreactividad aérea, y que estas células contribuyen con los síntomas durante la infección viral.

La activación y la degranulación de los eosinófilos pueden, por tanto, tener dos resultados diferentes, la muerte y erradicación de las células infectadas por los productos citotóxicos liberados y la citotoxicidad de las células epiteliales no infectadas, lo cual puede contribuir con el aumento de la patología observado en ciertas infecciones por RSV o rinovirus.

### **Células dendríticas**

Las células dendríticas (DCs) tienen una importante función en la respuesta inmunitaria. Están situadas en los sitios de entrada de los patógenos y se encuentran entre las primeras células que los reconocen, gracias a los PRRs. La activación de estos receptores inicia la transducción de señales que inducen la expresión de genes necesarios para la eliminación de los patógenos y para iniciar las respuestas de la inmunidad adaptativa. Además, las DCs son las únicas células capaces de iniciar las respuestas de la inmunidad adaptativa mediante la activación de linfocitos T (Grayson y Holtzman, 2007).

Las DCs respiratorias se pueden dividir grosso modo en aquellas que residen en el epitelio y aquellas que se encuentran por debajo de aquél. En el epitelio de la tráquea las DCs intraepiteliales se encuentran intercaladas entre las células epiteliales, justo arriba de la membrana basal y extienden sus dendritas hacia el lumen del pulmón, para sensar macromoléculas que de manera ordinaria no atraviesan las uniones estrechas de las células epiteliales. Estas células expresan CD11b, CD11c y MHC-II, y su migración pueden ser seguida mediante instilación de carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE). Las DCs respiratorias tienen la capacidad de migrar rápidamente, a las 18 h, la mayoría de las células marcadas con CFSE han migrado a los ganglios linfáticos bronquiales (BLN). En este sitio entran en contacto con células T vírgenes. La consecuencia de esta interacción en ausencia de infección da como resultado anergia de las células T, una respuesta de tipo Th2, o la generación de células T reguladoras (Tregs) capaces de suprimir las respuestas de tipo Th1. En el epitelio de la tráquea las DCs son reclutadas rápidamente con la exposición de ratas a albúmina de huevo, bacterias o virus en aerosoles (Iwasaki, 2007).

El pulmón está bien provisto de DCs. En los pulmones, las DCs que habitan las vías respiratorias superiores (tráquea y bronquios) y las que habitan las inferiores (bronquiolos y alveolos) reaccionan de modo diferente a la exposición de antígenos o patógenos en los aerosoles. En las vías respiratorias superiores las DCs se encuentran dentro de la capa epitelial (DCs intraepiteliales) y bajo la misma (LP DCs, de lamina propia). En las vías inferiores se encuentran en el espacio intersticial o la lámina propia, lo mismo que en el lumen de los alveolos (DCs alveolares). Cada una de estas células parece tener una función distintiva en el inicio y mantenimiento de la respuesta inmunitaria en los pulmones. Con la infección por influenza se ha visto que células  $CD11b^- CD8\alpha^- CD205^{hi} F4/80^+ CD24^{hi}$  migran del pulmón a los BLN. Estas células lo mismo que células CD8a residentes en el



ganglio linfático tienen la capacidad de presentar antígenos de influenza dentro de los BLN a las células T CD8 (Iwasaki, 2007; Belz et al., 2004).

En cuanto a los factores de reclutamiento de las células dendríticas, así como con los macrófagos, se desconocen cuáles son los mecanismos que reclutan a las células residentes, y cuáles son los que reclutan a las células durante la inflamación. Aunque se sabe que el receptor CCR7 es esencial para que las DCs migren a los ganglios linfáticos durante una infección.

### **Otras células**

Otras células que pueden ser importantes en el proceso inflamatorio del aparato respiratorio son las células de músculo liso. Estas células tienen la capacidad de producir quimiocinas ante estímulos proinflamatorios como las citocinas TNF- $\alpha$  y la IL-1. Ante estos estímulos *in vitro* los miocitos producen quimiocinas como eotaxina y RANTES (Ghaffar et al., 1999). Posiblemente, *in vivo* el músculo liso produce moléculas importantes en el reclutamiento de células inflamatorias.

## **Reclutamiento celular**

### **Quimiocinas**

Recientemente se han empezado a develar los mecanismos del reclutamiento de leucocitos durante la inflamación. De manera general, las células son reclutadas por agentes quimiotácticos que atraen a los leucocitos al sitio de infección o daño tisular. Numerosos tipos de moléculas son capaces de atraer a los leucocitos, desde proteínas del complemento hasta componentes de microorganismos; sin embargo, destacan en esta función un grupo numeroso de proteínas que presentan características homogéneas, y son relativamente estables. Éstas son las quimiocinas, citocinas con actividad predominantemente quimiotáctica, esto significa que dirigen el movimiento celular a lo largo de gradientes de concentración durante la respuesta inflamatoria. Además, en años recientes se ha descubierto que también desempeñan funciones en el desarrollo de órganos, la angiogénesis, el reciclamiento de leucocitos, la regulación inmunitaria para la defensa y en la generación de enfermedad (v.g. artritis reumatoide). El campo de las quimiocinas es uno de los que más han reflejado los avances de la biología molecular. La primera de estas moléculas se clonó hace poco más de una década. A partir de aquél año se han descrito más de 40 quimiocinas humanas (Sozzani et al., 1995; Chensue, 2001; Luster 2001; Matsushima, et al., 1988; Tanaka et al., 1988; Oppenheim et al., 1987).

Las quimiocinas son una superfamilia compleja de proteínas homólogas, que están involucradas principalmente en los procesos inflamatorios e inmunitarios, que tienen bajo peso molecular que varía de 8 a 10 kDa y que probablemente surgieron por duplicación a partir de un gen ancestral, el cual se dividió hace millones de años para formar las dos principales familias de las quimiocinas (Oppenheim et al., 1991). La superfamilia de las quimiocinas está subclasificada con base en el arreglo de los residuos de cisteínas localizados en la región amino terminal de la molécula (tablas 3-6). Las quimiocinas se designan entonces C, CC, CXC, y CXXC, donde C representa la cisteína y X aminoácidos intercalados. El grupo de las CC quimiocinas incluye proteínas que son atrayentes de monocitos, linfocitos, eosinófilos y basófilos. El grupo de las CXC quimiocinas atraen de manera principal neutrófilos.

**Tabla 3. Quimiocinas humanas CC o beta.**

<b>Humana</b>	<b>Nombre sistemático</b>
I-309	CCL1
MCP-1	CCL2
MIP-1 $\alpha$	CCL3
MIP-1 $\beta$	CCL4
RANTES	CCL5
MIP-1 $\delta$	CCL6
MCP-3	CCL7
MCP-2	CCL8
(MIP-1 $\gamma$ en ratón)	CCL9/10
Eotaxina	CCL11
(MCP-5 en ratón)	CCL12
MCP-4	CCL13
Quimiocinas de hepatocitos (HCC)-1 y -2	CCL14/15
HCC-4	CCL16
De timo y relacionada con activación (TARC)	CCL17
De pulmón y relacionada con activación (PARC)	CCL18
MIP-3 $\beta$ / ELC/éxodo-3	CCL19
MIP-3 $\alpha$ /LARC	CCL20
6Qcina/SLC/éxodo-2	CCL21
MDC	CCL22
Factor inhibidor de progenitor mieloide(MPIF)-1	CCL23
MPIF-2 o eotaxina 2	CCL24
Expresada en timo	CCL25
Eotaxina 3	CCL26
Cutánea atrayente de células T	CCL27

**Tabla 4. Quimiocinas humanas CXC o alfa.**

<b>Humana</b>	<b>Nombre sistemático</b>
GRO $\alpha$ , $\beta$ (MIP-2 $\alpha$ ), y $\gamma$ (MIP-2 $\beta$ )	CXCL1, 2 y 3
PF-4	CXCL4
ENA-78	CXCL5
GCP-2	CXCL 6
NAP-2	CXCL7
IL-8	CXCL8
MIG	CXCL9
IP-10	CXCL10
Quimiocina Tc $\alpha$ inducida por IFN (I-TAC)	CXCL11
SDF-1	CXCL12
BLC o BCA-1	CXCL13
Derivada de riñón y pecho (Pulmoncina en ratón)	CXCL14
	CXCL15

**Tabla 5. Quimiocinas humanas C o gama.**

<b>Humana</b>	<b>Nombre sistemático</b>
Linfotactina	XCL1
SCM-1 $\beta$	XCL2

**Tabla 6. Quimiocinas humanas CXXXC o delta.**

<b>Humana</b>	<b>Nombre sistemático</b>
Fractalquina	CX3CL1

Virtualmente todos los tejidos y tipos celulares probados a la fecha pueden ser inducidos para que secreten quimiocinas. Mientras que algunos tipos celulares, como los fagocitos mononucleares pueden producir una variedad de quimiocinas, también hay expresión restringida a tejidos de ciertas quimiocinas, lo cual sugiere que algunas quimiocinas tienen funciones específicas de órganos.

El tema más importante del estudio de las quimiocinas es su relación con la infección y la inflamación, sin duda por el papel central de los leucocitos en la respuesta contra la infección. En este respecto se ha detectado expresión de quimiocinas en virtualmente todas las infecciones estudiadas (Tabla 7). No obstante, son pocos los detalles que se conocen acerca de la función que tienen las quimiocinas durante el montaje de una respuesta óptima contra cada infección y durante la patogénesis de la misma; aunque de manera general se cree que el reclutamiento de neutrófilos debe ser importante para el control de una infección bacteriana, el de macrófagos para el desarrollo de la inmunidad específica, el de eosinófilos para el control de una infección por helmintos; y el de linfocitos T citotóxicos para el control de una infección viral.

**Tabla 7.** Quimiocinas reportadas en asociación con organismos infecciosos.

Quimiocina	Agente infeccioso				
	Bacterias	Hongos	Protozoarios	Helmintos	Virus
IL-8/GRO	x		x	x	x
MIP-2	x				
IP-10		x			x
MIG					x
MIP-1 $\alpha$	x	x	x		x
MIP-1 $\beta$	x	x			x
RANTES	x	x		x	x
MCP-1	x	x	x	x	x
MCP-3				x	
Eotaxina				x	x
TARC	x				
MDC	x				
TCA-3		x			

( Tomada de Chensue, 2001.)

### **Receptores de quimiocinas**

Las quimiocinas actúan mediante transducción de señales, a través de receptores acoplados a proteínas G, los cuales también pertenecen a una superfamilia de receptores con alrededor de 1000 miembros, cuyos genes se calcula que ocupan aproximadamente el 1 % del genoma humano. Con una longitud de 320 a 380 aminoácidos. Estas proteínas tienen 7 dominios transmembranales, y las quimiocinas interactúan con ellos a través de las tres asas que sobresalen en la región extracitoplasmática (Chensue, 2001; Luster, 2001; Mahalingam et al., 2001).

De esta manera las diferentes subpoblaciones de células del sistema inmune reaccionan a las quimiocinas de acuerdo con los receptores que presentan en su superficie. La tabla 8 presenta, como ejemplo, los receptores que se encuentran en la superficie de los monocitos y que pueden ser activados por sus respectivas quimiocinas. Estos receptores pueden ser regulados de manera fina y selectiva por las citocinas.

**Tabla 8.** Receptores de quimiocinas presentes en los monocitos.

Receptor	Quimiocina
CCR1	MCP-3 y -4, MIP-1 $\alpha$ , RANTES
CCR2	MCP-1, -2, -3, -4, -5
CCR4	MDC, TARC
CCR5	MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, MCP-2, MCP-4
CCR8	I-309
CX3CR1	Fractalquina
CXCR4	SDF-1

## Reclutamiento celular durante la infección respiratoria viral

Desde hace algunos años se han empezado a estudiar las quimiocinas que se producen durante la infección viral respiratoria. Entre las primeras quimiocinas detectadas se encuentra la IL-8, que está asociada al reclutamiento de neutrófilos, como ya se mencionó. Por ejemplo, la infección (*in vitro*) por virus de influenza A de células bronquiales y la infección por RV de cultivos primarios de células epiteliales respiratorias, estimulan la producción de IL-8 (Matsukura et al., 1996; Terajima et al. 1997).

También se han reportado numerosas quimiocinas que tienen que ver con el reclutamiento de eosinófilos y células T de tipo Th2, estas células parecen tener funciones claves durante las exacerbaciones de asma causadas por infecciones virales. Las quimiocinas que se han detectado en diferentes modelos son RANTES, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , y eotaxina inducidas durante la infección por RSV, PIV-3, RV, y virus de influenza (Saito et al., 1997; Domachowske et al. 2000; Bonville et al., 1999; Greiff et al., 1999; Scheerens et al., 1999).

En relación con el reclutamiento de los monocitos no existen estudios que hayan

tratado de diseccionar los detalles acerca de este proceso *in vivo*. Las proteínas quimiotácticas de monocitos (MCP) son quimiocinas de la subfamilia C-C, y tienen actividad sobre el linaje monocitos macrófagos (Sozzani et al., 1996). En el humano son cuatro, MCP-1, MCP-2, MCP-3 y MCP-4, y están estrechamente relacionadas. Se piensa que estas quimiocinas están reguladas de manera independiente (Opdenakker et al., 1993). MCP-2 y MCP-3 fueron identificadas como quimioatrayentes de monocitos en sobrenadantes de células de osteosarcoma (VanDamme et al., 1992).

MCP-1, -2, -3 y -4 se unen a los receptores presentes en los monocitos: CCR1, CCR2, CCR3 y CCR5 (Sozzani et al., 1994). MCP-1 y -3 activan monocitos, células T, células NK y basófilos; MCP-3 también activa eosinófilos y células dendríticas, las cuales no son afectadas por MCP-1 (Loetscher et al., 1994; Taub et al., 1995; Allavena et al., 1994; Dahinden et al., 1994; Sozzani et al., 1995).

Las observaciones sobre la producción de quimiocinas que reclutan macrófagos durante la infección viral respiratoria son escasas y fragmentarias. Ya sea porque no se cuenta con técnicas sensibles para la detección de estas moléculas o porque no se ha optimizado la toma y estudio de la muestra clínica adecuada. Se han hecho algunas mediciones en modelos *in vitro* y en sistemas animales, pero con nulos resultados. También son pocas las observaciones sobre los macrófagos reclutados *in vivo*, en la mucosa nasal durante la inflamación respiratoria.

La infección viral es causa importante de desarrollo de enfermedad respiratoria y puede asociarse a cuadros asmáticos. Si las quimiocinas MCP-1, -2, -3, y -4 causan el reclutamiento de macrófagos y se encuentran involucradas en la patogénesis de la inflamación asociada con la infección viral, su identificación permitirá el desarrollo de enfoques terapéuticos que contrarrestarán el reclutamiento de las células que causan daño tisular. En el presente trabajo se estudiaron las MCPs, cuya función principal es el reclutamiento de monocitos-macrófagos, y se estudió la correlación con los macrófagos reclutados durante la infección viral respiratoria de niños. Para esto se aprovechó un tipo de muestra biológica que es fácil de tomar y es rica en células inflamatorias reclutadas durante la infección viral respiratoria: el moco nasal. Así entonces se estudió la producción de MCPs durante la infección respiratoria por los agentes virales más comunes: AdV, virus de

influenza, virus de parainfluenza, RSV, y RV. El objetivo principal fue determinar la función durante la infección viral respiratoria, de las MCP's, y con el objetivo adicional de abrir nuevas posibilidades a la manipulación de la respuesta inmune como tratamiento de la enfermedad respiratoria.

## **Planteamiento**

Durante el proceso infeccioso viral ocurre reclutamiento de macrófagos en las vías respiratorias, los cuales son activados en el sitio de la infección y pueden tener participación en el daño tisular agudo durante la infección.

## **Problema**

¿Cuáles son los factores quimioatrayentes de monocitos en las secreciones nasales de niños con enfermedad respiratoria viral?

## **Hipótesis**

Los virus que afectan el aparato respiratorio inducen la producción diferencial de quimiocinas MCP-1, -2, -3 y -4 y cada cual se asocia a un patrón de reclutamiento celular específico.

## **Objetivo general**

- Estudiar la producción de factores quimioatrayentes de macrófagos durante la enfermedad viral respiratoria aguda y estudiar la posible función de los macrófagos en la patogénesis de la misma.

## **Objetivos particulares**

- Establecer los tipos de virus que causan enfermedad respiratoria en un grupo de niños de edad escolar (de 6 a 12 años de edad) de la ciudad de México.
- Determinar la proporción de macrófagos reclutados en las secreciones nasales de niños escolares con enfermedad respiratoria viral.
- Estudiar la actividad quimiotáctica para macrófagos en las secreciones nasales de los mismos niños.
- Estudiar el patrón de producción de las quimiocinas (MCP-1, -2, -3, -4) en las secreciones nasales de niños escolares con enfermedad respiratoria viral y determinar su asociación con la infiltración de monocitos.
- Estudiar el grado de daño en la mucosa respiratoria que podría estar asociado a las células inflamatorias.

## **Estrategia de investigación**

El estudio es de tipo observacional y es analítico, porque el investigador no manipula las variables y porque se desea generar hipótesis etiológica y sugerir los mecanismos que causan el reclutamiento celular.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### Voluntarios

Se reclutaron 48 niños voluntarios de la escuela “Tizoc”, ubicada en la delegación Xochimilco, México, D.F. Los niños tuvieron entre 6 y 12 años de edad. Se les realizó un seguimiento de octubre 1999 a septiembre de 2001. Cada vez que un niño presentó un cuadro respiratorio se le tomo una muestra de aspirado nasal, para el estudio y seguimiento de los virus, las células reclutadas y las quimiocinas producidas. Se registraron los datos clínicos de cada episodio.

Los participantes registraron diariamente su pico de flujo expiratorio (PEF), para esto usaron flujómetros proporcionados por nuestro laboratorio. También se registraron evaluaciones subjetivas de los síntomas respiratorios: 0, ausente; 1, leve; 2, moderado; 3, severo. Los síntomas del tracto respiratorio superior fueron escurrimiento nasal, estornudos, congestión o constipación nasal, lagrimeo, dolor de garganta, ronquera, dolor de cabeza o cara, otros dolores (v.g., musculares), calosfríos, fiebre, titiritar. Los síntomas inferiores fueron dolor en el pecho, tos matutina, sibilancias matutinas, tos durante el día, sibilancias durante el día, dificultad para respirar durante el día, tos nocturna, y sibilancias o falta de aire durante la noche. Los registros se sumaron para dar los registros diarios superiores e inferiores, respectivamente (Chauhan et al., 2003).

Así mismo, para cada niño se solicitó el consentimiento por escrito del padre, madre o tutor para la participación en el estudio.

### Toma de muestra

Cada vez que un niño presentó un cuadro respiratorio, se tomó una muestra nasal, para esto, mediante bomba de vacío se succionó 1 ml de secreción nasal en un tubo de centrífuga de 15 ml, adaptado con un tubo de entrada de polipropileno, de 3 mm de diámetro, y otro de salida (figura 3). Se adicionaron a la muestra 9 ml de medio de transporte, L-15, complementado con albúmina sérica bovina (ASB) 0.5 % y antibióticos (penicilina 100 UI/ml, estreptomycin 100 µg/ml). Los tubos en baño de hielo se transportaron de inmediato al laboratorio.



Figura 3. Trampa de vacío para aspirar moco nasal.

Procesamiento de la muestra. La muestra se maneja todo el tiempo dentro de una campana de flujo laminar vertical. Se homogeneiza lo mejor posible con ayuda de una pipeta Pasteur, si no se ve muy homogénea, sobre todo cuando el moco es espeso, se homogeneiza con agitación manual vigorosa durante 15 segundos. Se apartan 500 µl para purificar RNA y hacer pruebas de retrotranscripción acoplada a reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El resto se centrifuga 10 min. a 5000 rpm a 10 ° C. El sobrenadante. se conserva en 10 alícuotas, aprox. de 800 µl cada una a -70 ° C; estas son las alícuotas que se van a usar para los ensayos de quimiocinas por ELISA.

El paquete se resuspende con agitación manual vigorosa en 10 ml de PBS. Se centrifuga la suspensión durante 2 min. a 500 rpm. Se recupera el sobrenadante, donde se encuentran las células. El moco, en el fondo del tubo de centrifuga se separa y se guarda a -70 ° C.

Se centrifuga la suspensión de células a 1500 rpm 10 min. Se elimina el PBS. Se resuspende el paquete celular en 1 ml de medio de transporte. Las células. se cuentan en una cámara de Neubauer. Las células se colocan en laminilas tratadas con silano, 50 µl en cada una, mediante un citospin, como se indica en cuenta celular, o bien en laminillas de 8 pocillas especiales para inmunofluorescencia. Las laminillas se etiquetan y se dejan secar, para su posterior tratamiento con colorante de Giemsa o con el *kit* de inmunofluorescencia (Chemicon, Co) según las instrucciones del proveedor.

Al resto de la suspensión celular se le adiciona 100 µl de glicerol. Se separan 160 µl para citometría de flujo, y se revisa que no lleve filamentos de moco. El resto se guarda en cinco alícuotas de aprox. 160 µl.

### **Cuenta celular**

La proporción celular se determinó de dos maneras diferentes, mediante tinción con Giemsa, y mediante citometría de flujo. Para el primer método, una alícuota de 50 µl de la suspensión de células se centrifuga, en un citospín a 2000 rpm 5 min., sobre una laminilla y se deja secar. La laminilla se fija en metanol frío durante 5 min. Se tiñe con colorante de Giemsa, y se cuentan y fotografían las células en el microscopio (Olympus, BX60).

Para la citometría de flujo se ajustó la suspensión celular a 10<sup>6</sup> células/ml. Alícuotas de 0.5 ml se transfirieron a tubos de citometría. Se centrifugan a 1,500 RPM, 5 min a 4° C, se resuspenden los paquetes en PBA (PBS con albúmina sérica bovina 0.2 %, y azida de sodio 0.2%), se adicionan 5 µl de cada anticuerpo y se incuban 30 min a 4° C. Los anticuerpos usados fueron antiCD3-PE, antiCD4-PE, anti-CD8-FITC, antiCD16-PerCP, antiCD56-PerCP, antiCD19-APC, y antiCD13-APC (CALTAG). Se lavan las células con PBA se centrifugan de nuevo y el paquete se resuspende en 1 ml de PBA con paraformaldehído al 1 %, en esta solución se tienen 24 h para leerlas en el citómetro de flujo (Becton & Dickinson, FACSCalibur, 342973).

### **Ensayo inmunoabsorbente enzimático**

Las quimiocinas de monocitos MCP-1, -2, -3 y -4 se identificaron mediante ensayo inmunoabsorbente enzimático. El ensayo inmunoabsorbente enzimático (ELISA, por sus siglas en inglés) se puede dividir en tres pasos. El primero es la sensibilización de placas múltiples de 96 pozos con el anticuerpo de captura. En el segundo paso se bloquean los sitios

libres que pudieran haber quedado en cada pozo, con una solución de ASB en PBS. En la tercera etapa se realiza la detección de la quimiocina, propiamente dicha.

A una placa de ELISA de 96 pozos (NUNC) se adicionan 100 µl por pozo de una solución de anticuerpo de captura (anticuerpos específicos contra MCP-1, MCP-2, MCP-3 y MCP-4 humanas, de R&D) 1 µg/ml en buffer de carbonatos. Se incuba toda la noche a 4 °C.

La placa sensibilizada con el anticuerpo de captura se lava 4 veces con Tween 20 0.05 % en PBS. Se bloquea con ASB 1 % en PBS 2 h a temperatura ambiente (TA) con 250 µl por pozo. Se lava 4 veces con PBS tween 20. Se adicionan las muestras y/o los estándares, 100 µl por pozo, se incuba 1.5 h a TA. Los estándares fueron las MCPs humanas de R&D. Se lava 4 veces con PBS Tween 20. Se agrega el segundo anticuerpo marcado con biotina (R&D) (50 a 100 ng/ml) 100 µl por pozo, se incuba 1.5 h a TA. Se lava 4 veces con PBS tween 20. Se adiciona la estreptoavidín-peroxidasa (1:5000) 100 µl por pozo, se incuba 30 min a TA. Se lava 4 veces con PBS tween 20. Se adicionan el sustrato (TMB), 100 µl por pozo, se incuba 30 min a TA. Se para la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, 30 µl por pozo. Se lee a 450 nm en un lector de ELISA.

### **Detección e identificación de virus**

Los AdV, virus de parainfluenza, influenza y sincitial respiratorio se identificaron mediante inmunofluorescencia. En caso de resultar negativos se repite la detección haciendo antes aislamiento viral y luego la inmunofluorescencia. Los RV y los CoV se identificaron por RT-PCR

### ***Aislamiento viral***

El aislamiento viral se realizó de acuerdo con Manjarrez et al. (2003). De una manera breve, se prepararon portaobjetos de 8 cámaras (Nunc) con células HEp-2, Hela, y MDCK, sembrando 10<sup>3</sup> células por cámara en 150 µl de medio esencial mínimo suplementado con antibióticos y antimicótico. Se incubaron las cámaras hasta que las células alcanzaron confluencia, en atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>. Se inocularon 50 µl de muestra por cámara, después de 10 días de observación, con cambios de medio cada 3 días, o antes si se presenta efecto citopático (ECP) en más de 50 % de las células, se retira el medio, que se puede conservar a -70° C para propagar los virus y realizar las pruebas adicionales necesarias.

Se lavan las cámaras suavemente con PBS, y se realiza la inmunofluorescencia de acuerdo con las indicaciones del proveedor (Chemicon, 3105, Temecula, CA, EU).

### ***Inmunofluorescencia***

La inmunofluorescencia se realiza con anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra los AdV, y un segundo anticuerpo marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). De una manera breve, las laminillas preparada durante el procesamiento de muestra se cubre con una gota del primer reactivo (anticuerpo de monitoreo o anticuerpo específico), se incuban las laminillas 30 min a 37° C en cámara húmeda. Se lava suave y extensivamente con PBS/tween por 10 a 15 segundos. Se escurre el exceso de solución sobre una toalla de papel limpia. Se agrega una gota del conjugado anti-IgG de ratón-FITC a cada pocilla. se incuba a 37° C y se lava de nuevo, se elimina el exceso de líquido. Se examina la preparación con un microscopio de inmunofluorescencia a 10 o 200 x en busca de células que brillen con el

color verde manzana fluorescente del FITC. Con cada corrida se preparan controles positivos y negativos adecuados.

### **RT-PCR**

El procedimiento de retrotranscripción (RT) y reacción de polimerasa en cadena (PCR) se realizó como se describió antes (Teran et al., 1994). Para esto se realizan los siguientes pasos.

Para el manejo de muestras, reactivos, buffers y enzimas se utilizan guantes de látex. A 400  $\mu$ l de muestra se adicionan 200  $\mu$ l de agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) 0.1 % y 250  $\mu$ l de trizol. Precaución: El dietilpirocarbonato (DEPC) es posible que sea carcinogénico, así que debe manejarse con cuidado.

La mezcla se homogeneiza suavemente 15 seg. Se incuba en hielo 5 min. Se adiciona 50  $\mu$ l de cloroformo frío. Se homogeneiza 15 seg. Se incuba en hielo 3 min. Se centrifuga a 12,000 rpm 15 min. a 4 ° C. Se recupera la fase superior y se le adiciona 800  $\mu$ l de isopropanol frío y 2  $\mu$ l de glicógeno. Se invierte 4 veces suavemente para mezclar. Se incuba a -20 ° C toda la noche (no más porque se precipitan sales). Se centrifuga a 13,000 rpm 20 min. a 4 ° C. Se elimina el sobrenadante. Se lava el botón con 700  $\mu$ l de etanol 75 %. Se centrifuga durante cinco min y se descarta el etanol. Se deja secar bajo el flujo de campana de flujo laminar, 1 h más o menos. Se disuelve en 20  $\mu$ l de agua DEPC. Se hace una dilución 1:500 en agua destilada y se lee en el espectrofotómetro a 260, 270 y 280 nm de longitud de onda (una OD de 1 en una dilución de 10 en 400 es igual a 40  $\mu$ g/ml). El resultado a 260 se multiplica por 40 y tenemos la concentración en  $\mu$ g/ $\mu$ l.

Si se desea se puede hacer una electroforesis en gel de agarosa para revisar el RNA purificado.

Para la retrotranscripción se realiza el siguiente procedimiento. Se limpia con alcohol el lugar de trabajo. Se usan pipetas exclusivas para PCR. Se usa una pipeta de 10  $\mu$ l que no sea del juego de PCR, para colocar la muestra. Se trabaja con guantes de látex. Se adiciona a cada tubo Eppendorf:

#### Mezcla I

oligo dT <sub>12/18</sub> (.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
agua bidestilada tratada con DEPC	9 $\mu$ l
muestra con aprox. 2 $\mu$ g de RNA	2 $\mu$ l
volumen total	12 $\mu$ l

El tubo se calienta a 70 °C 10 min (programa 18 del Genius). Se enfría en hielo rápidamente (¡atención!), se centrifuga un pulso (opcional) y se adicionan, por tubo:

#### Mezcla II

buffer first strand 5x	4 $\mu$ l
DTT 0.1 M	2 $\mu$ l

mezcla de dNTP's 10 mM	1 $\mu$ l
volumen total	7 $\mu$ l

Se mezcla y se incuba a 42 ° C, 2 min. (programa 19), y se agrega:

enzima Superscript (Gibco)	1 $\mu$ l
volumen final total	20 $\mu$ l

Se mezcla bien. Se incuba a 42 ° C, 50 min y 70 ° C, 15 min (programa 20); luego 4 ° C hasta que se saque la muestra (programa 21). Se calienta a 85 ° C para inactivar la enzima (opcional). Se adiciona 1  $\mu$ l de RNAsa H de *E. Coli* (opcional, para secuencias de más de 1 kD). Se incuba a 37 ° C, 20 min. Se guarda a -20 ° C.

La PCR para rinovirus se realiza de la siguiente manera. Se adiciona por tubo Eppendorf:

Mezcla I + II

agua destilada	17 $\mu$ l
mezcla de dNTP's 10 mM	1 $\mu$ l
Buffer con MgCl <sub>2</sub> 10X	2.5 $\mu$ l
primer OL26 5 $\mu$ M véase la tabla 4	1 $\mu$ l
primer OL27 5 $\mu$ M véase la tabla 4	1 $\mu$ l
de enzima Expand (Roche)	0.5 $\mu$ l

Encima de esta muestra se coloca una lenteja de cera y sobre ésta:

cDNA obtenido en la RT	2 $\mu$ l
volumen total	25 $\mu$ l

En el termociclador se incuba 94 ° C, 2:30 min (programa 21). Se aplica 40 veces el siguiente ciclo (programa 22) 94 ° C durante 30 segundos; 60 ° C, 30 segundos; y 72 ° C, 40 segundos. Se incuba de manera adicional a 72 ° C, 4 min y luego a 4 ° C 99 h (programa 23). Se guarda el amplímero a -20 ° C, hasta correr la electroforesis.

Para la electroforesis en gel de agarosa, se arma el molde para gel de la cámara de electroforesis y se coloca en un sitio nivelado. Se coloca el peine de 12 dientes. Se disuelven calentando 25 seg. en horno de microondas 0.6 g de agarosa (temperatura de gelificación de 36 ° C) en 30 ml de TBE 0.5 X (TBE 5 X, pH 7.65, por litro: 54 g, tris base; 27.5, ácido bórico; 20 ml, EDTA 0.5 M, 3.7226 g/pH 8.0). Se deja enfriar a 50 ° C. Se adiciona 8  $\mu$ l de bromuro de etidio y se homogeneiza la solución. Se vierte en la cámara de electroforesis. El gel queda listo en aprox. 15 min. Se retira con cuidado el peine y las gomas. Se llenan los orificios de muestras con el mismo buffer hasta cubrir ligeramente el gel. Para aplicar las muestras, se mezclan en la siguiente proporción sobre un recorte de parafilm 1.5  $\mu$ l de buffer de muestra 5.0  $\mu$ l de muestra. Se coloca cada muestra en una ranura del gel y se corre la prueba a 100 V constantes.

## **Cromatografía de afinidad**

Para la purificación de las MCPs se utilizó una columna HiTrap® (Amersham) y se siguió el procedimiento indicado por el proveedor. De una manera resumida, se reunieron en una muestra combinada los aspirados nasales de 20 niños (1.5 ml c/u) con infección viral, y se aplicaron a la columna HiTrap® preparada con anticuerpos monoclonales anti-MCP-1, -2, -3 y -4 (AB1445P, AB1479P, AB1480P, y AB1481P respectivamente, de Chemicon). La columna se eluyó con amortiguador de clorhidrato de glicina y cloruro de sodio a pH de 2.7, y a una velocidad de 1 ml/min. Las fracciones se leyeron a 280 nm y se recuperaron las que dieron un pico final de proteínas, aproximadamente en la fracción 50. Las fracciones de proteína se liofilizaron, se resuspendieron en 1 ml de PBS, y se sometieron a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

## **Cromatografía líquida de alta presión**

Se utilizó una columna RP-8 de fase reversa. Se cargó la muestra y se eluyó con un gradiente lineal de acetonitrilo y ácido tricloroacético. Las fracciones obtenidas se liofilizaron, y se resuspendieron en BSA 0.1 % para su ensayo de quimiotaxis.

## **Ensayo de quimiotaxis**

Los ensayos de quimiotaxis se realizaron en cámaras múltiples de 48 pozos (Neuro Probe, AC48) siguiendo las indicaciones del fabricante. De una manera breve, se purificaron monocitos de sangre periférica, de voluntarios aparentemente sanos, mediante centrifugación sobre Histopaque® 1070 (Sigma) de acuerdo con el instructivo del proveedor y adherencia en cajas de Petri de plástico. La viabilidad y la pureza se evaluaron mediante azul de Tripano y coloración de giemsa, y siempre fueron mayores de 95 %. Los monocitos se llevaron a una concentración de  $10^6$  células en medio RPMI-1640 con seroalbúmina humana 1 %. Se colocaron 25  $\mu$ l de estándares, controles negativos y muestras en las cavidades inferiores de la cámara múltiple de quimiotaxis. Se cubrió la cámara con una membrana de policarbonato con poros de 5  $\mu$ m diámetro (Osmonics Inc., K50SH58050). Después de armar la cámara, se colocan en los pozos superiores 25  $\mu$ l de la suspensión de monocitos. Se incubó la cámara 1 h a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>. Se detuvo la incubación, se retiró la membrana se despegaron las células adheridas en la superficie superior con una arista lisa de plástico. Se dejó secar la membrana. Se fijó con metanol frío y se tiñó con Giemsa durante 30 minutos. Se contaron las células que pasaron a la superficie inferior de la membrana bajo observación con objetivo de 20X.

## **Estudio de la lipoperoxidación en las muestras de secreción nasal**

Los aldehídos característicos de la lipoperoxidación, causada por radicales libres, se cuantificaron en las muestras de secreción nasal, mediante el consumo de ácido 2-tiobarbitúrico según el protocolo del proveedor (Sigma, T5500).

## **Análisis estadístico**

Se analizaron los resultados mediante la prueba *t* de student para buscar diferencias significativas entre grupos dependientes, y se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis cuando se trató de muestras cuya distribución no se podía asegurar que fuera normal. Se utilizó regresión lineal simple y la prueba de suma de rangos de Spearman para encontrar correlaciones, entre niveles de quimiocinas y reclutamiento de macrófagos, y su grado de significancia.

## RESULTADOS

### Número de episodios respiratorios

Para investigar el reclutamiento celular durante la infección respiratoria viral se siguió una cohorte de 48 niños, con un promedio de edad de 10.15 años (de 6.2 a 12.4), de la escuela Tizoc, Xochimilco, durante 2 años, sin contar vacaciones de verano entre julio y agosto. Durante el seguimiento se acudió diariamente a la escuela para observar si se presentaban síntomas respiratorios. En ese periodo los niños, 18 niños y 30 niñas, tuvieron 294 episodios respiratorios, y en cada ocasión se procedió a recolectar 1 ml de secreción nasal por aspiración; las muestras se transportaron en hielo al laboratorio para su procesamiento. Además se monitorearon los síntomas respiratorios para determinar la severidad de la enfermedad. Como controles se analizaron 48 muestras de los mismos niños cuando se encontraban asintomáticos, al menos 1 a 2 meses posteriores al cuadro respiratorio. La media basal (y el rango) del pico de flujo expiratorio (PEF) fue de 342 (170-572) L/min, el cual se midió diariamente.

### Detección e identificación de virus

La técnica de inmunofluorescencia se utilizó para la detección de AdV, virus de influenza, de virus de parainfluenza y RSV (Fig. 4A y B); mientras que la RT-PCR fue la técnica de elección para la detección de RV. La figura 4C presenta un gel típico de muestras positivas a RV.

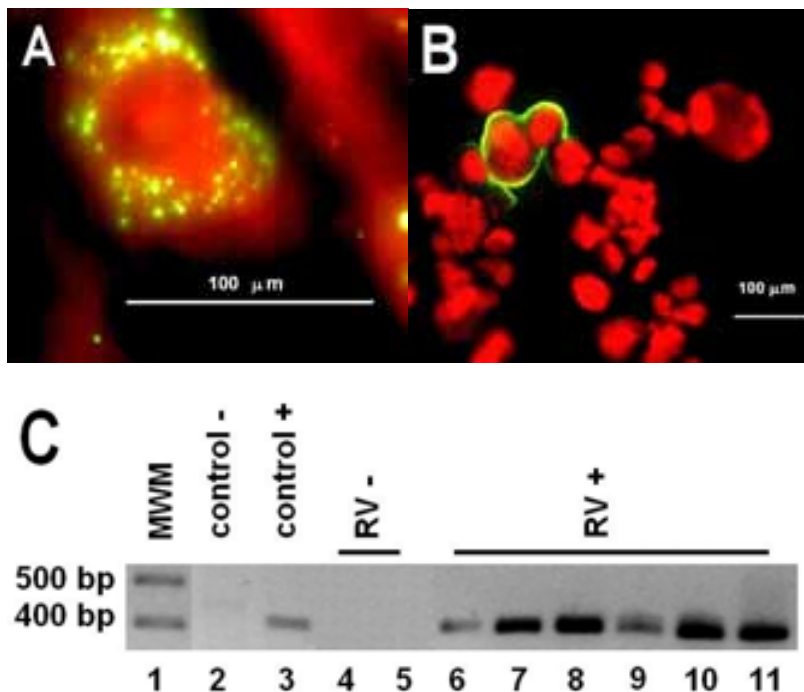


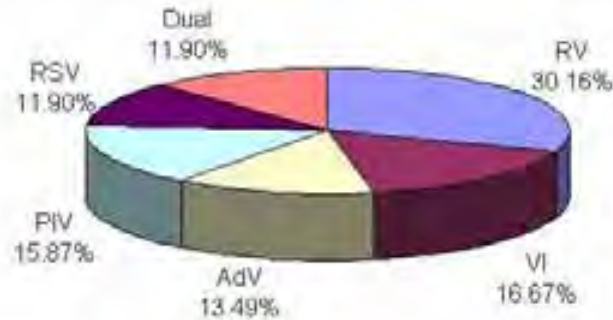
Figura 4. **Detección de virus respiratorios en muestras de niños escolares.** A) Inmunofluorescencia de una muestra positiva a virus de parainfluenza. B) Muestra positiva a adenovirus. C) Electroforesis en gel de agarosa para visualizar los productos de reacción de la RT-PCR para detección de RV. La banda producida por las muestras de rinovirus es de 380 pares de bases. MWM, marcadores de pesos moleculares; RV-, muestras negativas; RV+, muestras positivas.

Durante el seguimiento, se encontró que la cohorte de 48 niños sufrió 294 cuadros respiratorios (en promedio 6.12 cuadros por niño en los dos años), de dichos cuadros, 111 fueron causados por un virus, y 15 por dos virus, en total 126 de las infecciones fueron de naturaleza viral. Los virus detectados se presentaron con las siguientes frecuencias: 38 rinovirus (30.16%), 21 virus de influenza (16.66%), 20 virus de parainfluenza (15.87%), 17 adenovirus (13.49%) y 15 virus sincitiales respiratorios (11.90%), también se encontraron 15 casos con infección dual (11.90%) (Figura 5 y tabla 9).

A)



B)



**Figura 5. Porcentajes de virus aislados de niños con infección respiratoria.** A) Porcentajes de muestras con virus y sin virus. B) Porcentajes de virus aislados del total de muestras positivas a la virología.



**Tabla 9. Casos con infección respiratoria asociada a 2 virus.**

Combinación de virus	Casos (n)
Influenza, RV	6
Influenza, PIV	2
AdV, RSV	3
Influenza, AdV	1
Influenza A y B	1
AdV, RV	1
RSV, PIV	1
Total	15

En las 48 muestras controles se detectaron un RV y un RSV, en ausencia de síntomas.

### Datos clínicos

Cada vez que se presentó una infección viral el PEF mostró un abrupto descenso, seguido de una recuperación gradual en dos a tres semanas. Las medias (rango) de los PEF antes y después de la aparición de síntomas fueron de 310 (108-458) L/min y 259 (48-420) L/min respectivamente (Figura 6).

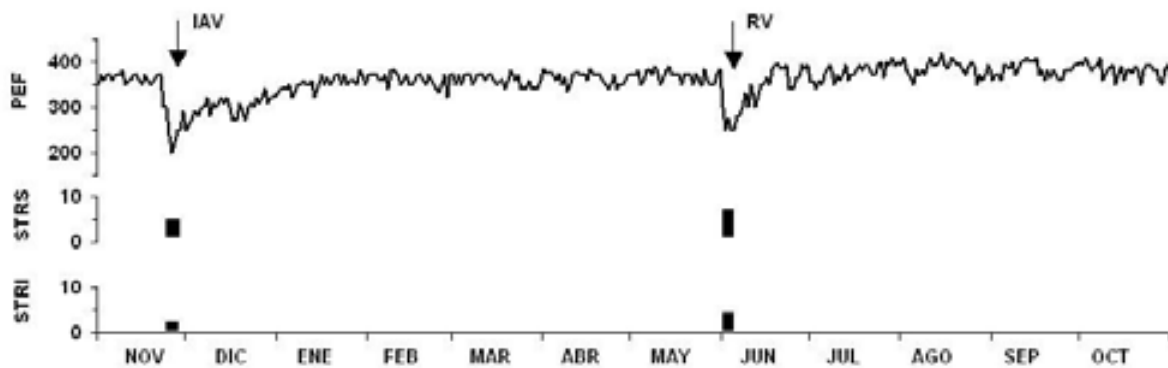
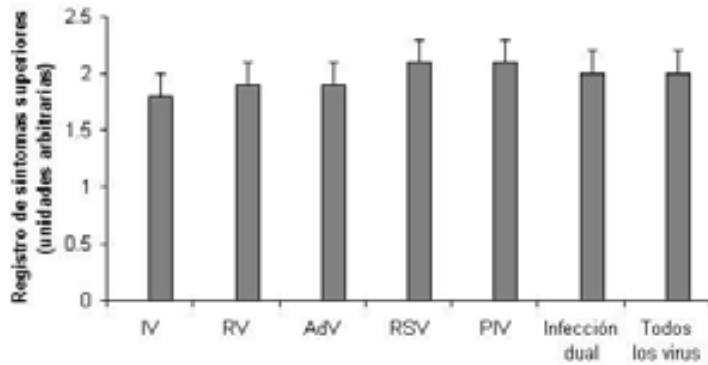


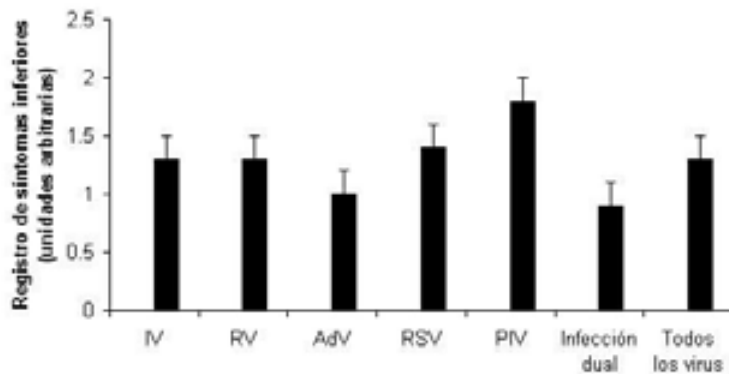
Figura 6. Gráfica del flujo de pico expiratorio (PEF), y de síntomas del tracto respiratorio superior (STRS) e inferior (STRI) para uno de los niños estudiados. La gráfica muestra los virus identificados; IAV, virus de influenza A; RV, rinovirus.

La severidad de los síntomas se incrementó y las medidas de PEF descendieron con todos los tipos de virus respiratorios. No se observó diferencias entre los diferentes virus, en relación con la mayor o menor gravedad de los síntomas observados (Figura 7A y B). Las mediciones de flujometría descendieron en promedio en  $16.22\% \pm 1.80$  (en un valor de  $55.56 \pm 5.7$  L/min) durante los episodios virales (Figura 7C).

a)



b)



c)

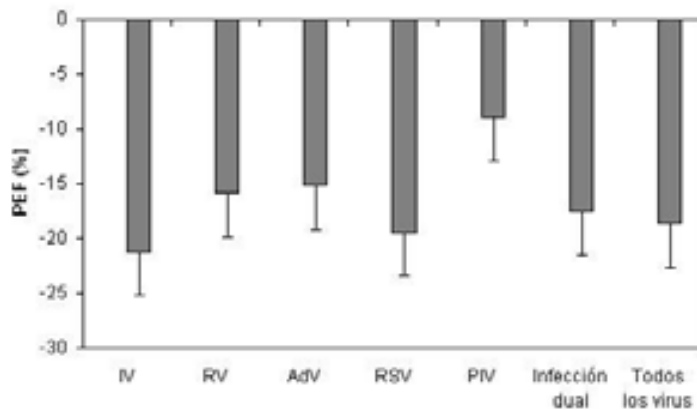


Figura 7. Cambios en los síntomas del tracto respiratorio superior e inferior, y descenso del pico de flujo expiratorio. a) síntomas del tracto respiratorio superior y b) inferior, y c) Porcentajes de descenso de la tasa del pico de flujo expiratorio (media + error estándar de la media) en niños con infección viral comparados con los mismos niños durante un periodo asintomático. IV, virus de influenza; RV, rinovirus; AdV, adenovirus; RSV, virus sincitial respiratorio; PIV, virus de parainfluenza.

## Cuenta diferencial

El análisis de las cuentas diferenciales mostró que las cuentas totales de células reclutadas durante el periodo sintomático fueron aproximadamente 100 veces más altas en comparación con el periodo sin enfermedad. Las células totales tuvieron un promedio de  $2.8 \times 10^6 \pm 3.5 \times 10^6$  células por ml de moco (con una variación de 40 a  $13,800 \times 10^3$  células por ml) en las muestras con cuadro respiratorio. En las muestras durante el periodo sin enfermedad tuvieron un promedio de  $24 \times 10^3 \pm 12 \times 10^3$  (de 6 a  $29 \times 10^3$  células por ml) (Tabla 10). Las células obtenidas por centrifugación tuvieron una viabilidad mayor al 95 %, mediante el procedimiento de tinción con azul de tripano. En las muestras de moco obtenidas durante la infección viral, los neutrófilos fueron las células que se encontraron en mayor porcentaje (promedio de 83.9 %) seguidos por macrófagos (8.8 %), linfocitos (6.7 %), eosinófilos (0.42 %) y células epiteliales (0.85 %).

**Tabla 10. Cuentas diferenciales y totales en los aspirados nasales de niños con infección viral respiratoria o durante un periodo asintomático.**

Células	Asintomático (rango) (x 10 <sup>3</sup> )	Sintomático (rango) (x 10 <sup>3</sup> )
Neutrófilos	11 (4-25)	2,350* (35-12,600)
Macrófagos	1.5 (0.8-6)	248* (0-2,280)
Linfocitos	1.2 (0.6-8.0)	188* (0-1,860)
Eosinófilos	0.08 (0-1.20)	12 (0-108)
Epiteliales	10.5 (5-17)	24* (0-476)
Total	24 (6-29)	2,800* (40-13,800)

Los datos se presentan como medias (rango) x 10<sup>3</sup>. \*p < 0.001 comparadas con las asintomáticas (Prueba de Kruskal-Wallis); asintomáticas, n = 48; sintomáticas, n = 89.

## Detección de factores quimiotácticos para macrófagos

En estudios previos se han investigado los factores activadores de los neutrófilos y los eosinófilos durante la infección respiratoria. Sin embargo, no se conocen los detalles del reclutamiento de macrófagos en la mucosa respiratoria, durante la infección viral. Así entonces se procedió a la detección y separación de cualesquiera factores quimiotácticos para macrófagos, que hubieran en las muestras de los niños con infección viral respiratoria. Para esto se liofilizaron 30 ml de muestra combinada de 20 niños (1.5 ml por niño), se resuspendieron en 1 ml de PBS y se corrieron en HPLC. La HPLC es una herramienta que de acuerdo con la columna que se use puede, por ejemplo, separar las proteínas de acuerdo con su afinidad por el eluyente, en picos muy bien definidos y señalados por el tiempo de retención en el cromatograma. A las fracciones, una por minuto, obtenidas en la HPLC se les realizó pruebas de quimiotaxis para macrófagos, se observaron 4 picos distintivos de actividad quimiotáctica separados por la cromatografía a partir de las muestras de aspirado nasal tomados durante la infección viral. En seguida se procedió a realizar pruebas de ELISA para MCP-1, -2, -3, y -4, y dos de los picos resultaron ser MCP-3 y MCP-4 (Figura 8). Con las fracciones de HPLC obtenidas, se realizaron pruebas de quimiotaxis en presencia de

anticuerpos específicos contra MCP-3 y -4, y se observó que los anticuerpos inhibieron completamente los dos principales picos de actividad quimiotáctica, los dos picos secundarios (13 y 33) de actividad no fueron inhibidos por las anticuerpos anti-MCP-3 y anti-MCP-4. La inhibición fue dependiente de la concentración de los anticuerpos, y la mayor inhibición se observó a 10 µg/ml.

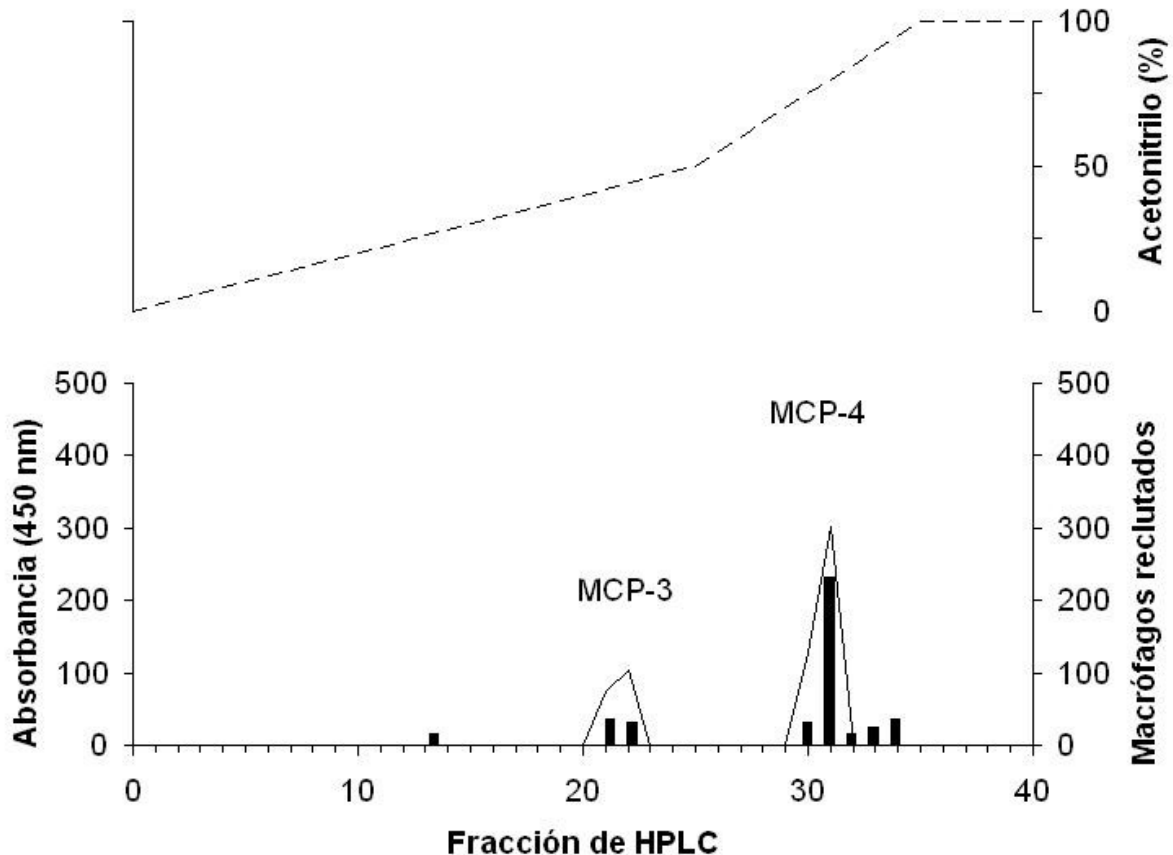


Figure 8. Actividades quimiotácticas para monocitos en aspirados nasales en fracciones de HPLC. Se aplicaron 30 ml de un homogeneizado de 20 muestras de niños con infección viral respiratoria, a una columna de fase reversa (RP-8), y el material unido se eluyó de la columna mediante un gradiente lineal de acetonitrilo (línea a trazos) en 40 min. La quimiotaxis para monocitos de las fracciones está dada como el número de monocitos que fueron atraídos por área observada (barras negras). Se identificaron cuatro picos de actividad quimiotáctica para monocitos los cuales eluyeron a 13, 22, 31 y 33 min. Por ELISA se encontró que dos de los picos (22 y 31) corresponden a MCP-3 y-4 respectivamente (línea continua). HPLC, cromatografía líquida de alta resolución, MCP-3, proteína quimiotáctica de monocitos-3, MCP-4, proteína quimiotáctica de monocitos-4.

También se calculó el porcentaje de reclutamiento de macrófagos que correspondió a las fracciones de las MCPs. Para esto se sumó la cantidad de macrófagos reclutados en las pruebas de quimiotaxis, por todas las fracciones de la HPLC, como el total, y se obtuvo el porcentaje que correspondía a cada fracción (tabla 11). MCP-3 contribuye con 16.0 % (fracciones 21 y 22) del total de la actividad quimioatrayente; MCP-4, con 62.12 % (fracciones 30 y 31); y las dos juntas con 78.12 % del total. Tomados en conjunto, los datos

indican que las secreciones nasales de los niños con infección viral respiratoria contienen cuatro picos de actividad quimiotáctica in vitro, de los cuales dos que corresponden a la MCP-3 y a la MCP-4, contribuyen con la mayor parte de la actividad quimiotáctica observada en las muestras clínicas.

**Tabla 11. Porcentajes de macrófagos reclutados por las fracciones de la HPLC de secreciones nasales de niños con infección respiratoria aguda.**

Fracciones	ELISA para MCP-3 (A 450nm)	ELISA para MCP-4 (A 450 nm)	Macrófagos reclutados (promedio)	Porcentaje del total
13	0	0	16	3.76
21	73.56	0	36	8.47
22	104.66	0	32	7.53
30	0	128	32	7.53
31	0	301	232	54.59
32	0	0	16	3.76
33	0	0	24	5.65
34	0	0	37	8.71
Total			425	100

Las fracciones no mencionadas no reclutaron monocitos en las pruebas de quimiotaxis.

### DetECCIÓN DE MCP'S

Con la idea de complementar las observaciones anteriores, se determinaron los niveles de las cuatro MCPs en las muestras individuales de aspirado nasal. Las cuatro MCP's estudiadas estuvieron presentes en las muestras con diferentes valores promedio. Los niveles de MCP-1 y MCP-2 durante la infección viral presentaron valores similares a los valores de las muestras controles, es decir no cambian durante una infección viral. MCP-1 presentó valores promedio de  $22.9 \pm 6.1$  y  $16.4 \pm 1.3$  pg/ml, durante la infección viral y durante un periodo asintomático, respectivamente (Figura 9). MCP-2 tuvo valores de  $11.85 \pm 4.1$  y  $7.2 \pm 1.2$  pg/ml, respectivamente (Figura 10). En cambio la MCP-3 y la MCP-4 presentaron valores elevados,  $185 \pm 17.1$  y  $243 \pm 18.67$ , en los niños con cuadros respiratorios virales (figura 11 y 12), los valores de MCP-3 y MCP-4 en el grupo control fueron respectivamente de  $32.0 \pm 0.78$  y  $33.8 \pm 1.56$  pg/ml. Así, los niveles de MCP-3 y -4 en la mucosa respiratoria durante la infección viral aumentan de manera estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) en comparación con los valores de las muestras tomadas durante un periodo asintomático. Todos los virus respiratorios inducen concentraciones comparables de MCP-3 y MCP-4 en las secreciones nasales (Figura 13).

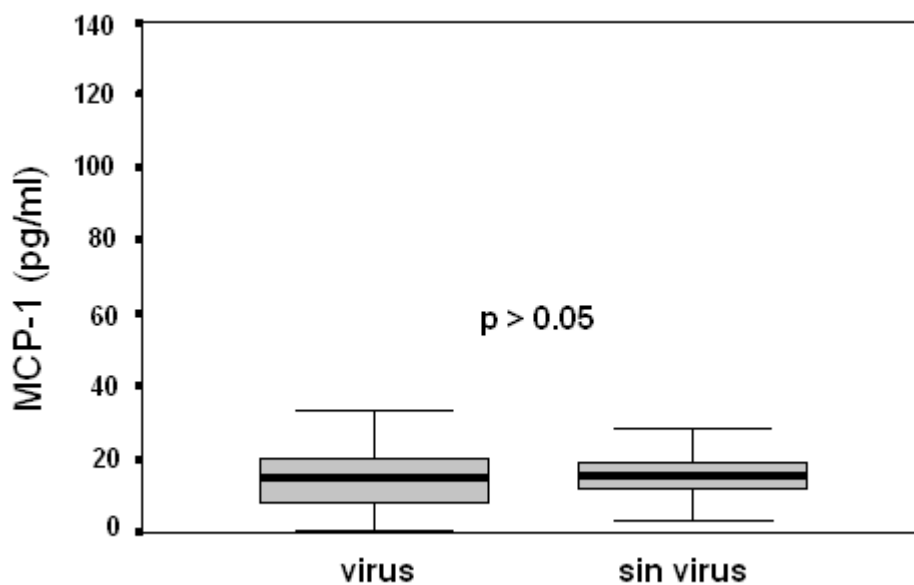


Figura 9. Niveles de MCP1 en secreción nasal de niños con infección viral respiratoria. No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos, con infección viral (n = 89) y asintomáticos (n = 48) ( $p > 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis).

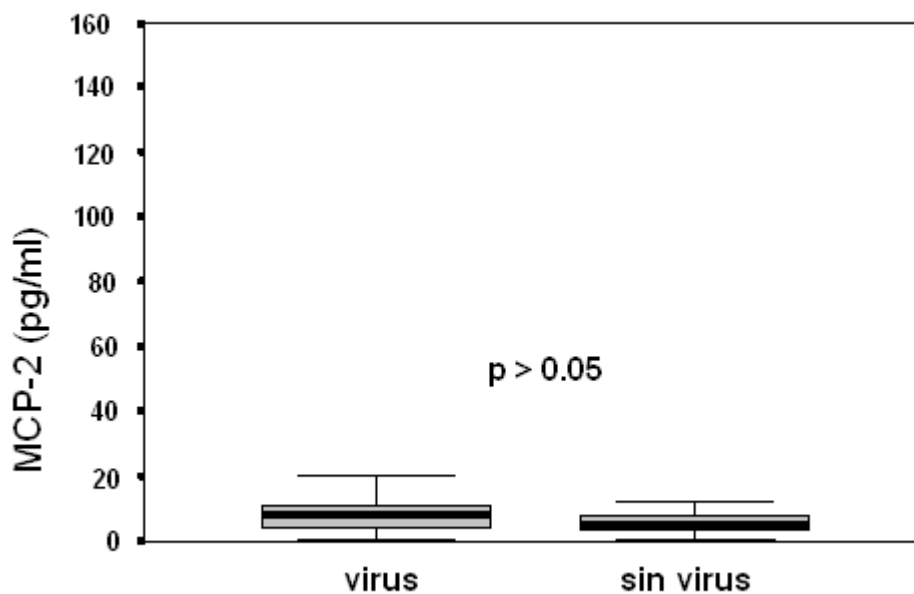


Figura 10. Niveles de MCP2 en secreción nasal de niños con infección viral respiratoria. No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos ( $p > 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis).

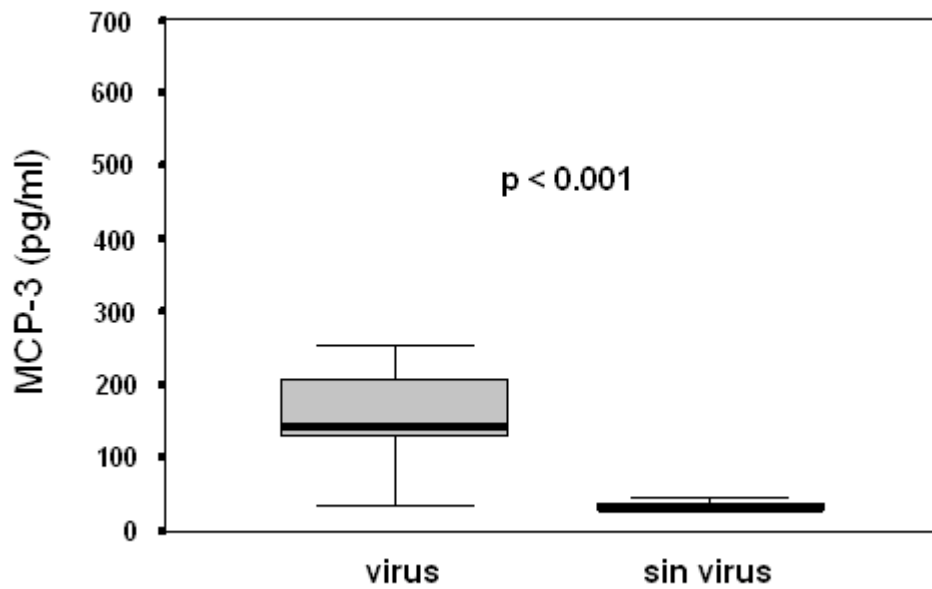


Figura 11. Niveles de MCP3 en secreción nasal de niños con infección viral respiratoria. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo con infección viral y el grupo sin infección viral ( $p < 0.001$ , prueba de Kruskal-Wallis).

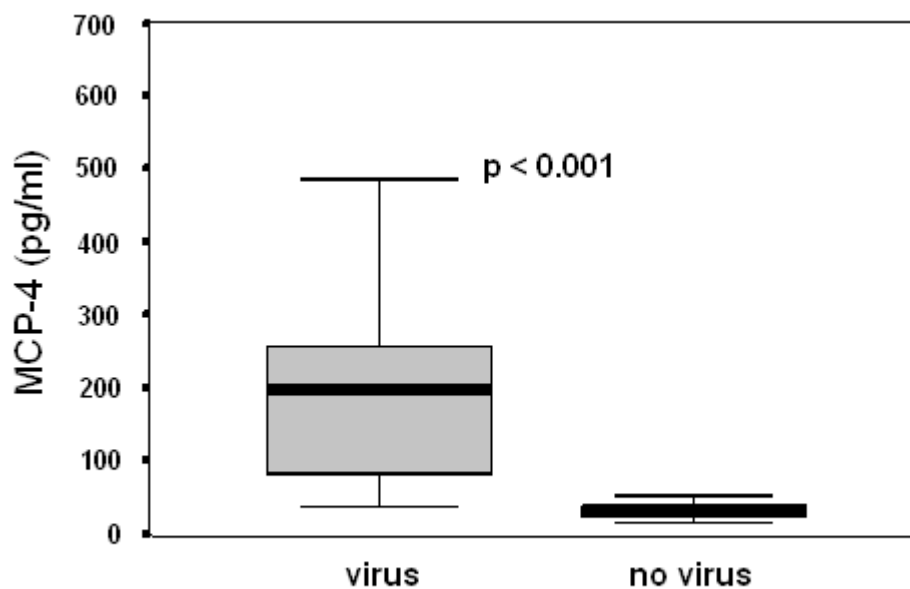
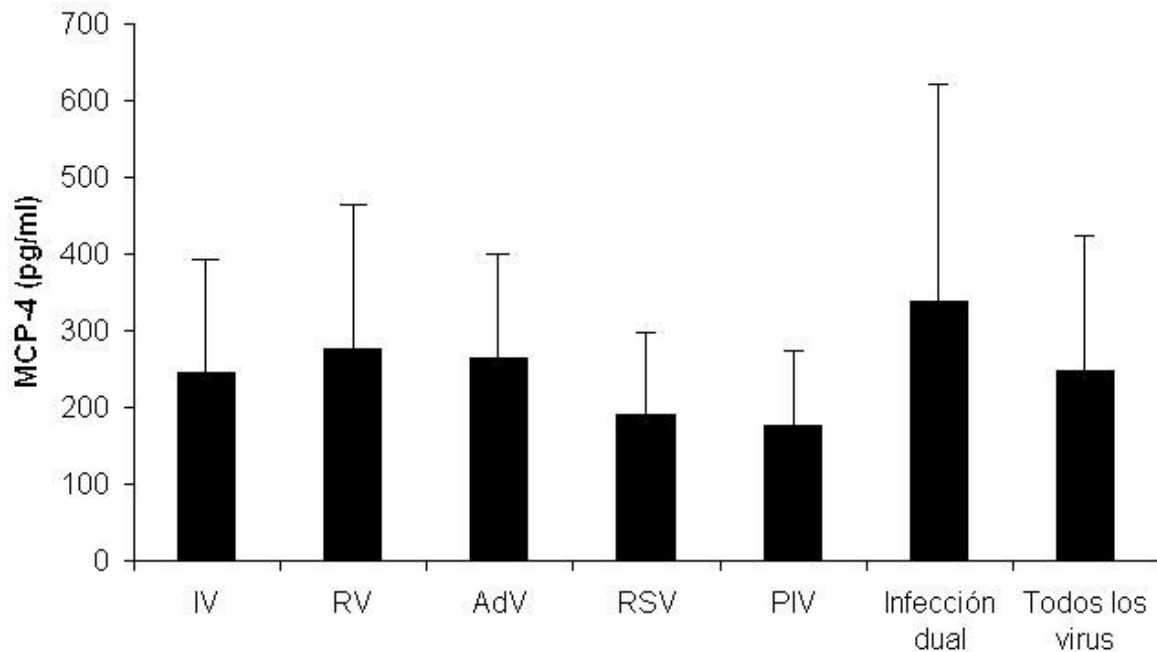


Figura 12. Niveles de MCP4 en secreción nasal de niños con infección viral respiratoria. Se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos, con infección viral y sin infección ( $p < 0.001$ , prueba de Kruskal-Wallis).



**Figura 13.** Niveles de MCP-4 en secreciones nasales de niños con infección respiratoria agrupados por virus respiratorio. Promedios  $\pm$  desviación estándar.

### **Correlaciones entre las quimiocinas en la secreción nasal y los macrófagos reclutados**

El siguiente objetivo del trabajo fue analizar la posible función de MCP-3 y MCP-4 en el reclutamiento de los macrófagos durante la infección viral. Para esto se estudió la correlación de los niveles de MCP-3 y MCP-4 con los macrófagos reclutados en los aspirados nasales, y se observó una correlación significativa ( $r = 0.5305$ ) (figura 14). Lo mismo ocurrió con MCP-4 ( $r = 0.4368$ ) (figura 15). Estos datos sugieren que el reclutamiento de los macrófagos en la mucosa nasal depende en gran parte de estas dos quimiocinas. Además, los niveles de las dos quimiocinas mostraron una tendencia a asociarse con el grado de severidad de los síntomas superiores (MCP-3,  $r = 0.654$ ,  $p = 0.003$ ; MCP-4,  $r = 0.204$ ,  $p = 0.058$ ) (Figuras 16 y 17).



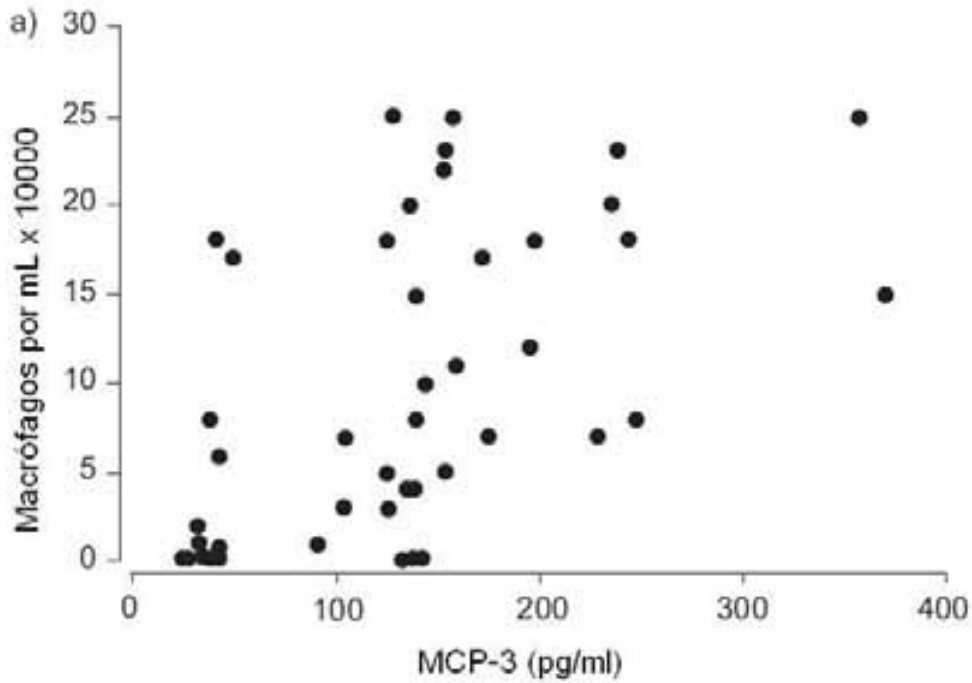


Figura 14. Correlación entre concentración de MCP-3 y número de macrófagos en muestras nasales de niños con infección viral respiratoria. ( $r = 0.654$ ,  $p = 0.003$ )

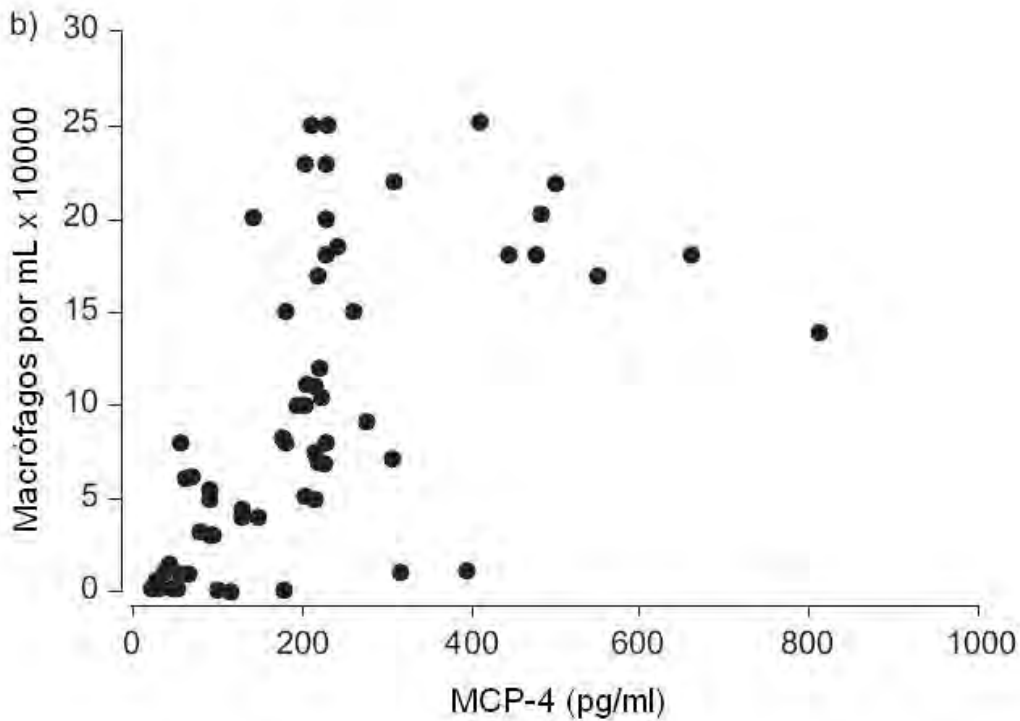


Figura 15. Correlación entre concentración de MCP-4 y número de macrófagos en muestras nasales de niños con infección viral respiratoria. ( $r = 0.648$ ,  $p = 0.003$ ).

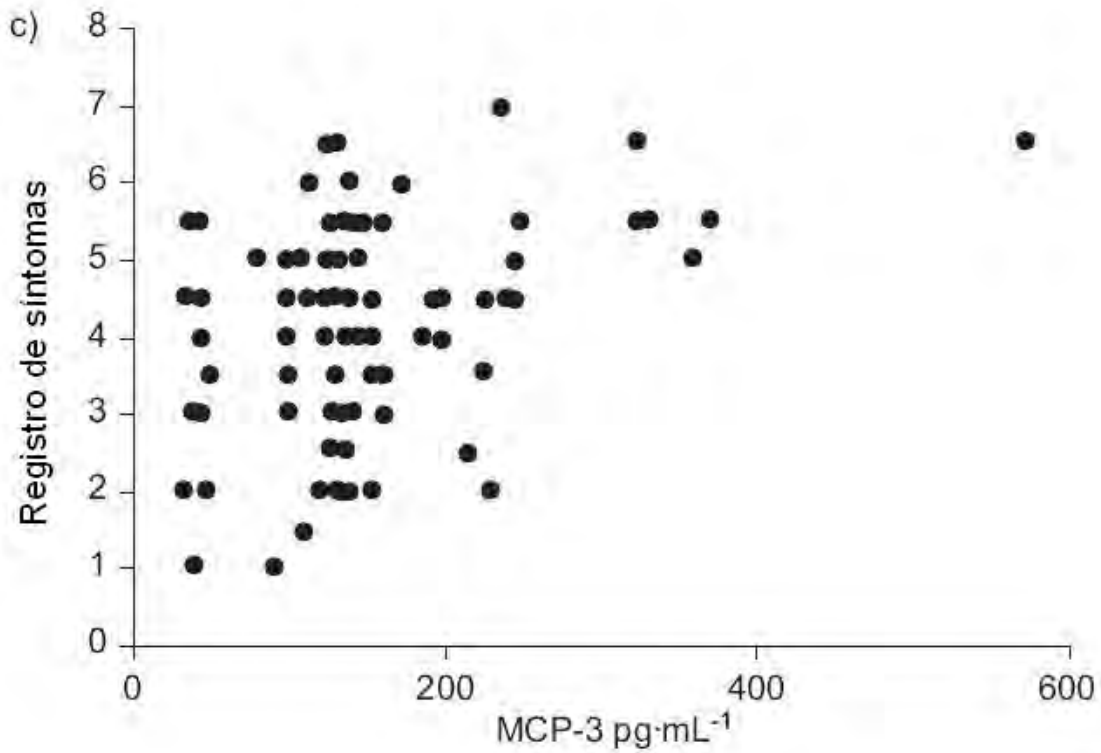


Figura 16. Correlación entre niveles de MCP-3 en secreciones nasales de niños con infección viral respiratoria, y síntomas de tracto respiratorio superior. ( $r = 0.231$ ,  $p = 0.069$ , prueba de la suma de rangos de Spearman.)

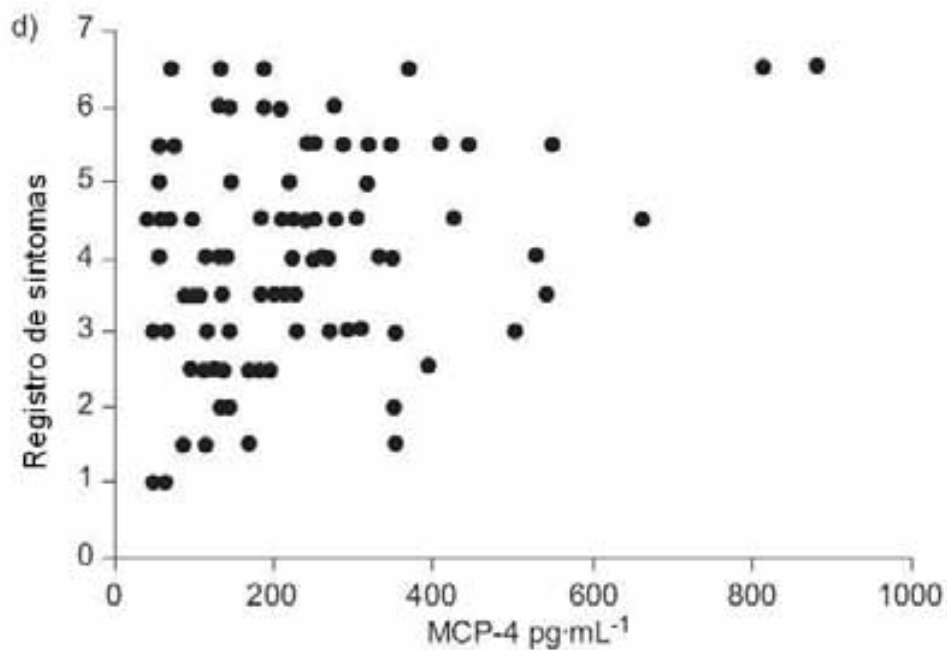


Figura 17. Correlación entre niveles de MCP-4 en secreciones nasales de niños con infección viral respiratoria, y síntomas de tracto respiratorio superior. ( $r = 0.204$ ,  $p = 0.058$ , prueba de la suma de rangos de Spearman.)

## Purificación de MCP-3 y MCP-4 a partir de las muestras nasales

Se procedió entonces a purificar las quimiocinas MCP-3 y MCP-4 a partir de las muestras nasales. Para esto se utilizó de nuevo la mezcla homogeneizada de 20 muestras, la mezcla se aplicó ahora a una columna de afinidad preparada con anticuerpos anti-MCP-3 y anti-MCP-4. Las fracciones eluidas perteneciente al pico de proteínas purificadas, se liofilizaron y se aplicaron a la columna de HPLC. Las fracciones presentan dos picos de absorbancia a 280 nm, que coinciden con los picos de actividad quimiotáctica, en el ensayo de quimiotaxis. Además una prueba de ELISA demostró que un pico (fracción 22) correspondía a la MCP-3, y el segundo (fracción 31) a la MCP-4. Estos resultados demuestran la actividad biológica de MCP-3 y MCP-4, las dos quimiocinas reclutaron monocitos en el ensayo in vitro.

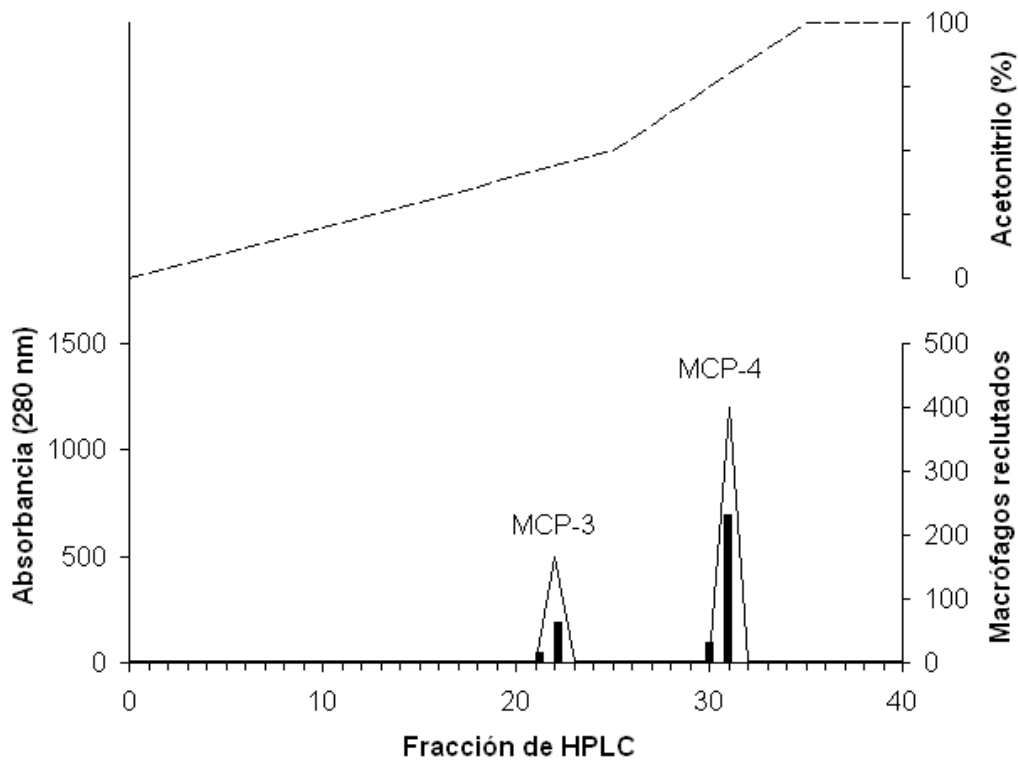


Figure 18. Actividades quimiotácticas para monocitos purificadas a partir de aspirados nasales mediante cromatografía de afinidad y HPLC. De nuevo se homogeneizaron 20 muestras de niños con infección viral respiratoria y se aplicaron a una columna de afinidad preparada con anticuerpos anti-MCP-1, -2, -3 y -4. El material eluido de la columna de afinidad fue aplicado en una cromatografía de fase reversa (RP-8), y el material unido se lavo de la columna mediante un gradiente lineal de acetonitrilo (línea a trazos) en 40 min. La quimiotaxis para monocitos de las fracciones está dada como el número de monocitos que fueron atraídos por área (barras negras). Se identificaron dos actividades quimiotácticas para monocitos las cuales eluyeron a 22 y 31 min. Los dos picos corresponden, mediante pruebas de ELISA, a la MCP-3 y-4 respectivamente. HPLC, cromatografía líquida de alta resolución, MCP-3, proteína quimiotáctica de monocitos-3, MCP-4, proteína quimiotáctica de monocitos-4.

## Lipoperoxidación en la mucosa respiratoria

Finalmente, como los neutrófilos y los macrófagos son poblaciones que se presentan de manera frecuente en las muestras de secreción nasal, durante la infección viral, y ya que las dos subpoblaciones tienen la capacidad de sintetizar especies reactivas de oxígeno, decidimos cuantificar el grado de lipoperoxidación en la mucosa, como una medida de la producción de dichos radicales y del daño causado en la mucosa. Las muestras de secreción nasal presentaron mayores niveles de productos de la lipoperoxidación durante la infección viral ( $0.142 \pm 0.078$  nmol TBAR/ml) que durante un periodo sin síntomas ( $0.067 \pm 0.050$ ) (figura 19), aunque las diferencias no fueron significativas.

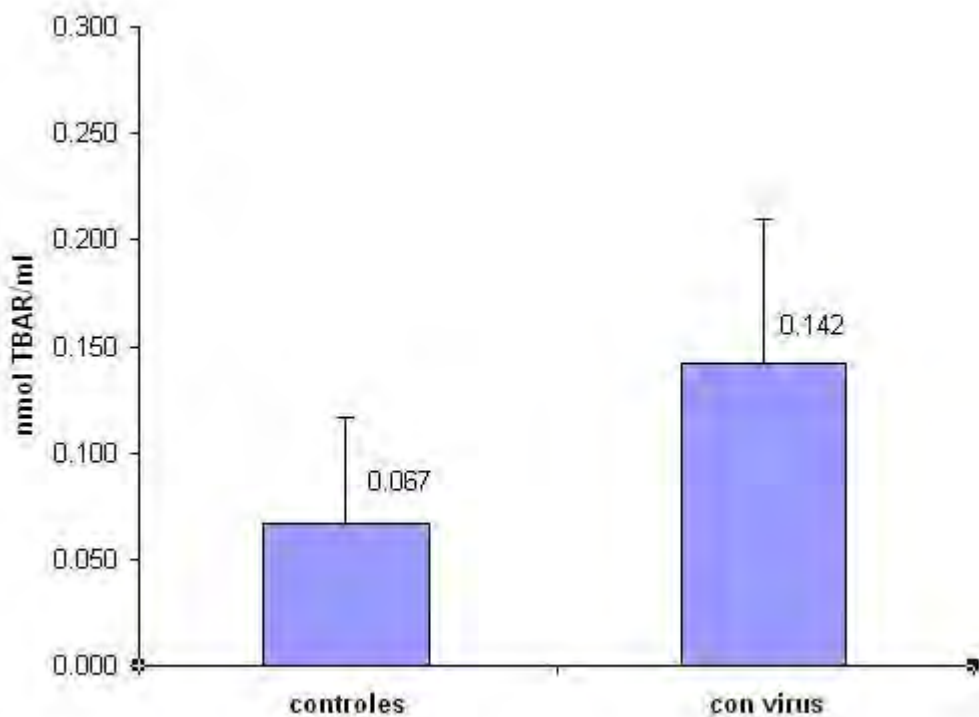


Figura 19. Lipoperoxidación en muestras de secreción nasal de niños con infección viral respiratorias. La gráfica muestra el consumo de ácido tiobarbitúrico (TBAR) por las muestras de secreción nasal de niños con infección viral (con virus) y sin infección (controles) (n = 15).

## DISCUSIÓN

En países desarrollados se ha visto que las infecciones virales respiratorias son una causa importante de morbi-mortalidad (Thompson et al., 2003; Stralio et al., 2002; Grondahl et al., 1999). En aquellos países en vías de desarrollo en los cuales se han estudiado, los virus también han resultado ser agentes importantes de infecciones respiratorias (Maitreyi et al., 2000; Cabello et al., 2006). En el presente trabajo se estudiaron por primera vez, en una muestra de niños escolares, los ocho virus respiratorios que se reportan con mayor frecuencia en la bibliografía internacional: rinovirus (RV), virus de influenza A y B, virus de parainfluenza 1, 2 y 3, adenovirus y virus sincitial respiratorio. Se encontró que un grupo piloto de 48 niños, y que formaban parte de una cohorte de 130 niños, sufrió 294 cuadros respiratorios en el transcurso de dos años. De estos cuadros, 126 (43 %) demostraron infección viral. Los virus que se presentaron con mayor frecuencia fueron los rinovirus (30 %). Los virus de influenza, los virus de parainfluenza, los adenovirus y el virus sincitial respiratorio se presentaron con una frecuencia menor, 16.67, 15.87, 13.49 y 11.90, respectivamente. En México se han hecho pocos trabajos que estudien a los virus respiratorios. En algunos de estos estudios se han observado, en comparación con el nuestro, pocos virus detectados o bajos porcentajes de los mismos; por ejemplo, en uno de ellos sólo se observaron porcentajes significativos para adenovirus (18 %) y virus de parainfluenza (4 %) (García-Ramos et al., 1991), en 531 muestras de niños con IRA; y en otro se observó un importante porcentaje sólo para el RSV (34.6 %) (Noyola et al., 2005). Esto posiblemente se deba a diferencias en las técnicas empleadas en los trabajos mencionados, en los grupos de estudio seleccionados, en los periodos de estudio o en el tipo de muestra elegida.

En trabajos que reportan una mayor frecuencia de infección viral se observó que los virus más frecuentes son virus de influenza (20.9 %), PIV (17.4 %) y RSV (28.7 %) en niños pequeños con IRA (Cabello et al., 2006); virus de influenza (30 %) y sincitial respiratorio (RSV) (7 %) en niños con croup (Héller et al., 1978); RSV, virus de influenza y virus de parainfluenza en niños con exacerbaciones de asma (López et al., 1993), y RSV (22 %) en niños menores de un año con infección de vías bajas (Tirado et al., 1995). Uno de los trabajos más completos (Cabello et al., 2006) reporta un importante porcentaje de virus en las muestras estudiadas (87 %), no obstante en este estudio no se determinó la presencia de rinovirus.

En este trabajo un importante porcentaje de muestras resultó negativo a la detección de virus (57 %) (Figura 5a), no obstante, no se estudiaron otros virus que también tienen una importante participación como agentes patógenos de vías respiratorias, y que muy probablemente hubieran contribuido con porcentajes adicionales, es decir, virus como coronavirus, metapneumovirus humano, y bocavirus. El estudio de estos virus posiblemente hubiera aumentado el porcentaje de muestras positivas a virus, a un valor superior al 50 % como se ha observado en otras latitudes. Estos virus se estudiarán en un proyecto posterior.

Este es el primer trabajo que reporta a los RV como la principal causa de infección respiratoria viral en una muestra de niños escolares de nuestro país. Esta observación confirma la importancia de la infección por rinovirus, y aunque la enfermedad por RV por lo regular no es grave, sí es causa importante de gastos médicos y de ausentismo escolar y laboral (Fendrick et al., 2003). Además los pacientes asmáticos son más susceptibles a esta infección (Gern y Busse, 1999; Teran et al., 1994); así entonces sería importante determinar en nuestro país el impacto de la infección por rinovirus en la población de niños asmáticos, ya

que sólo se han estudiado los virus de influenza, el virus de parainfluenza y el RSV (López et al., 1993).

La infección por el virus de influenza puede poner en riesgo la vida de niños pequeños, ancianos y pacientes inmunocomprometidos (Thompson et al., 2003); además este es un virus sobre el cual se aplica vigilancia epidemiológica para prevenir las pandemias que acostumbra causar, en particular cuando irrumpen en nuestra especie cepas de origen animal (Cyranoski, 2003). En nuestro trabajo encontramos que el 17 % de los aislamientos fueron de virus de influenza, esto habla de la importancia de este virus en nuestra población, más si se toma en consideración, primero, que el ambiente escolar es el lugar propicio para la transmisión de los virus respiratorios entre los niños, los cuales pueden llevar después el virus al hogar, en segundo lugar que el virus de influenza se transmite de una manera explosiva (Nicholson, 1992), y en tercero la generación periódica de variantes emergentes del virus de la influenza tipo A (Taubenberger y Morens, 2008). Además, como se mencionó antes, hubo 15 casos de niños con infección dual, de los cuales 10 tuvieron el virus de la influenza. Este predominio podría estar dado por dos condiciones que no se excluyen entre sí, el deterioro del epitelio y la barrera mucociliar durante la infección por el primer virus, lo cual facilitaría la colonización por un segundo virus como se ha visto en otros trabajos (Maitreyi et al., 2000), y posiblemente la amplificación de la respuesta inflamatoria con el desarrollo de síntomas, y en segundo lugar, la facilidad de transmisión del virus de influenza (Nicholson, 1992) que le permitiría infectar a un individuo ya infectado por otro virus. Una posibilidad adicional sería la entrada simultánea de dos virus a la mucosa respiratoria. Los factores que son responsables de la infección dual con dos virus no han sido determinados, pero pueden incluir el sistema inmunitario, las propiedades de los virus, factores epidemiológicos, u otros factores. Se considera entonces que son necesarios estudios adicionales para elucidar los mecanismos de infección simultánea por dos virus. La infección por influenza con frecuencia es más grave que la de rinovirus, en niños sin enfermedad respiratoria asociada, ya que ataca al estado general del paciente, produciendo tos y fiebre, de manera que sería adecuado encontrar medidas terapéuticas efectivas que controlen o reduzcan el daño producido por la inflamación característica que ocasiona este virus. Los rinovirus en cambio tienen una asociación más fuerte con exacerbaciones de asma y EPOC, en este caso sería importante disecar los factores que determinan esta asociación, con la idea final de encontrar alternativas en el tratamiento de la infección viral y en el de la enfermedad crónica pulmonar.

De manera general, nuestros resultados confirman en nuestro país que los virus producen una importante proporción de infecciones respiratorias, lo cual concuerda con la mayoría de los trabajos publicados. De manera particular hay algunas discrepancias aparentes, como se puede ver en la tabla 12. En primer lugar, nosotros encontramos una elevada proporción de rinovirus, y en la mayoría de los estudios no se identifican los rinovirus. En segundo, los virus de influenza casi siempre ocupan un lugar predominante como causantes de infección respiratoria aguda, esto también se puede deber a que en los demás estudios no se determina la presencia de rinovirus y así el virus de influenza ocupa el primer lugar como causa de infección respiratoria. En tercero, en nuestro trabajo se presentó una menor proporción de casos con RSV, en los demás trabajos la proporción es mucho mayor, lo cual se puede deber a diferencias en las muestras estudiadas, ya que provienen de niños menores de cinco años (Tabla 13), y el virus es un agente común en estas poblaciones, principalmente en niños menores de 1 año (Anderson et al., 1990; Tirado et al., 1995). Así que nuestro estudio no contradice, sino que más bien complementa estas observaciones.

Tabla 12. Proporciones de virus aislados en cuatro estudios diferentes en comparación con nuestros resultados.

Virus	RV	IV	PIV	AdV	RSV	País	Cita
Porcentajes de virus	30.16	16.67	15.87	13.49	11.9	México	Nuestro trabajo
	nh	nh	16.1	12.9	71.0	Kenia	Bii et al., 2002
	nh	4.6	4.1	16.4	71.6	Brasil	Straliotto et al., 2002
	nh	32.6	25.8	3.4	38.2	India	Maitreyi et al., 2000
	11.6	24.9	8.5	14.1	40.9	Alemania	Grondahl et al., 1999

Abreviaturas: nh, no se hizo. Se escogieron dos estudios de países desarrollados y dos de países en vías de desarrollo que son representativos.

Tabla 13. Características de los estudios realizados en otros países en comparación con el nuestro.

País	Cuadros con virus (%)	Estudio	Población (muestra)	Cita
México	43	Prospectivo, longitudinal	Cohorte de niños escolares (6 a 12 años) con IRA 69 aspirados nasofaríngeos (de 470)	Nuestro estudio
Kenia	31.0	Transversal	Niños menores de 5 años con neumonía, aspirados nasofaríngeos	Bii et al., 2002
Brasil	36.6	Prospectivo	Cohorte de niños menores de 5 años con IRA, 862 exudados nasofaríngeos	Straliotto et al., 2002
India	44.5	Prospectivo	Cohorte de niños menores de 5 años con IRA, tracto inferior 200 aspirados nasofaríngeos	Maitreyi et al., 2000
Alemania	32.1	Prospectivo	Cohorte de 1118 niños con IRA, exudados faríngeos	Grondahl et al., 1999

Abreviaturas: IRA, infección respiratoria aguda

En nuestro trabajo se estudió una cohorte de niños escolares por la facilidad de tener a los sujetos estudiados reunidos en un sitio de fácil acceso, y por la mayor facilidad de trabajar con ellos en comparación con niños pequeños. Además, los niños de 6 a 12 años representan uno de los grupos que también son afectados de manera importante por las infecciones virales, de acuerdo con estudios realizados en otros países (Tang et al., 2008; Lichenstein et al., 2002).

Entre los virus menos frecuentes en nuestro estudio, estuvieron los AdV y los virus de parainfluenza. Nosotros observamos que los virus de parainfluenza tuvieron una proporción de 12 %; en los ejemplos, la variación de los porcentajes observados para los virus de

parainfluenza fue de 4 a 25 % (tabla 12), de manera que el porcentaje que observamos se encuentra en un valor intermedio. Los AdV se encontraron en nuestro trabajo en un porcentaje de 10 %, lo cual es consistente con los resultados observados en los otros países, en los cuales variaron de 3 a 16 % (tabla 12). Sería interesante determinar la participación de los mismos virus en una población de mayor riesgo como son los niños pequeños y los lactantes.

Este es el primer estudio detallado de reclutamiento de macrófagos en la mucosa nasal durante una infección viral respiratoria. Como primer paso, se separaron cuidadosamente las células del moco mediante un método sencillo, basado en pasos de centrifugaciones diferenciales que permiten separar moco, células y sobrenadante. Las suspensiones de células obtenidas mantuvieron su viabilidad en un porcentaje mayor a 95 %. Además, las células mantienen sus características de tal modo que pudieron ser estudiadas mediante citometría de flujo. Con el procedimiento mencionado las células mantienen su tamaño y su granularidad, además de los receptores de superficie que las identifican: CD3, CD4, CD8, CD14, CD21 y CD15, CD16 y CD56 (datos no mostrados). Mediante nuestro procedimiento de separación las células conservaron su viabilidad y sus características fenotípicas.

Con el procedimiento de separación celular estandarizado, se observó que las principales células reclutadas en la mucosa respiratoria durante la infección viral son los neutrófilos, los monocitos y los linfocitos (Tabla 10). Las quimiocinas responsables de la atracción de los neutrófilos se han estudiado con bastante detalle en las infecciones por virus. De manera general se ha observado que la infección viral respiratoria incrementa los niveles de factores quimiotácticos de neutrófilos, entre ellos tenemos a la IL-8; esta quimiocina es secretada en la mucosa respiratoria durante la infección por RV, por RSV, por virus de influenza, por virus de parainfluenza, además en el caso de rinovirus e influenza los niveles de IL-8 en secreción nasal correlacionan con la severidad de los síntomas de la infección (Turner 1990; Teran et al., 1994; Jarjour et al., 2000; Abu-Harb et al., 1999; Gern et al., 2002; Oh et al., 2002). Además, también se han investigado marcadores de la presencia de neutrófilos, así se ha observado incremento en los niveles de mieloperoxidasa y proteína básica mayor, de neutrófilos y eosinófilos respectivamente (Teran et al., 1997; Teran et al., 1999a).

Los eosinófilos también han sido estudiados con bastante detalle, ya que son una de las poblaciones de células que se han relacionado de manera importante con el asma y las alergias y, como se mencionó, los virus se encuentran entre los principales agentes relacionados con exacerbaciones asmáticas (Teran et al., 1994). Por ejemplo, Greiff et al (1999) observó que la infección experimental por rinovirus induce la expresión de eotaxina en pacientes atópicos. También hay secreción de RANTES y MIP-1 $\alpha$  durante la infección viral respiratoria por rinovirus \*(Teran et al., 1999a). Además la expresión de quimiocinas que atraen eosinófilos se ha relacionado con la expresión de un patrón de citocinas Th2 por células pulmonares (Teran et al., 1999b; Teran, 1999).

En cambio, son pocos los estudios que se han hecho para diseccionar los mecanismos de reclutamiento de macrófagos. De hecho, no hay reportes de producción de MCPs *in vivo* durante la infección viral respiratoria en el ser humano. Nosotros aprovechamos los sobrenadantes obtenidos de las muestras mediante nuestro proceso de separación, para realizar un ELISA de alta sensibilidad, el cual fue desarrollado en nuestro laboratorio. El límite de detección de nuestros ensayos se encuentra en el orden de 1 picogramo, de acuerdo con los estándares empleados. Con esta sensibilidad, se midieron los niveles de las cuatro MCP's en las muestras nasales. Nuestro trabajo reporta por primera vez concentraciones



elevadas de MCP-3 y MCP-4 en secreciones nasales de niños con infección natural por virus respiratorios, y los niveles de las dos quimiocinas correlacionaron de manera significativa con la cantidad de macrófagos reclutados en la mucosa durante la infección, esto sugiere que las quimiocinas contribuyen con el reclutamiento de los macrófagos *in vivo*. En realidad, la purificación de estas dos quimiocinas mediante cromatografía de afinidad y HPLC muestra que tienen actividad quimiotáctica sobre monocitos de sangre periférica. Hasta donde se sabe estos son los primeros datos que indican que estas quimiocinas tal vez contribuyan con la patogénesis de la infección viral respiratoria. Por el contrario, los niveles de MCP-1 y la MCP-2 no fueron diferentes entre los niños infectados y los mismos niños cuando no tenían infección respiratoria.

Las MCPs son potentes quimioatrayentes de macrófagos y tienen de 58 a 71 % de homología, de estas la única que se ha estudiado durante una infección viral respiratoria es la MCP-1. Hay un reporte (Becker y Soukup, 1999) de que el RSV estimuló la liberación de MCP-1 de monocitos cocultivados con células epiteliales respiratorias *in vitro*, mientras que en otro trabajo (Noah y Becker, 2000) se demuestra que la infección experimental por el mismo virus en voluntarios estimula la producción de MCP-1 en vías superiores. Sin embargo, ninguna de las MCPs había sido estudiada durante la infección natural del aparato respiratorio. Como se mencionó antes, las proteínas MCP's fueron reconocidas por su actividad predominante durante el reclutamiento de monocitos/macrófagos; sin embargo, también pueden atraer linfocitos, basófilos, y eosinófilos; además, recientemente se ha observado que los neutrófilos activados también pueden tener receptores de tipo CCR bajo condiciones particulares, de manera que estas células también podrían ser activadas por CC quimiocinas como las MCPs (Hartl et al., 2008; Jan et al., 2006). Nosotros observamos que las principales células reclutadas fueron neutrófilos, macrófagos y linfocitos. Los eosinófilos se presentaron sólo en un número reducido de niños con la infección viral, y cuando lo hicieron se presentaron en una proporción muy baja. Por tanto es posible que los eosinófilos se hubieran desintegrado durante el proceso infeccioso o durante el procesamiento de la muestra; sería interesante entonces confirmar la ausencia de moléculas marcadoras de la presencia de eosinófilos, como la MBP o la ECP, lo cual se realizará en una etapa posterior del protocolo. En cambio, los porcentajes de macrófagos siempre fueron considerables en las muestras de moco nasal (Tabla 10). Los valores de MCP-3 y MCP-4 fueron, en promedio, considerablemente elevados en las muestras de secreción nasal durante la infección viral (figuras 11 y 12) y, además, presentaron una correlación significativa con los valores de macrófagos reclutados en el moco nasal (figuras 14 y 15). Esto sugiere que los niveles elevados de MCP-3 y MCP-4 son responsables del reclutamiento de los macrófagos durante la infección viral respiratoria. Una manera de complementar este punto sería observar el nivel de expresión de receptores para MCP's en los macrófagos de las muestras estudiadas, lo cual se podría hacer más adelante mediante citometría de flujo.

En particular el hecho de que no se hubiera detectado MCP-1 en este trabajo concuerda con una observación previa (Culley et al., 2006) de que las citocinas Th2 inducen MCP-1 en el modelo del ratón, en particular si pensamos que durante la infección viral usualmente se monta una respuesta de tipo Th1. Así entonces es probable que las respuestas antivirales de los niños hayan sido de tipo Th1 porque, por la epidemiología de los virus respiratorios, lo más probable es que estos niños ya hubieran tenido contacto con los AdV, el RSV, los rinovirus y los virus de influenza. No obstante no es posible asegurarlo, a menos que se realicen pruebas para detectar los anticuerpos que induce una infección previa y para medir el perfil de citocinas en nuestras muestras.

Mientras que la producción de MCP-3 y MCP-4 ocurrió durante la infección viral, los mecanismos que inducen este evento no están bien entendidos. Algunos virus respiratorios, como adenovirus y citomegalovirus, se ha demostrado que tienen factores de transactivación que pueden incrementar la expresión y la síntesis de citocinas relevantes al asma en los macrófagos y linfocitos (Weitraub y Dean, 1992; Crump et al., 1992). Mientras que el RV es capaz de activar promotores de citocinas como la IL-6, actuando a través del factor nuclear (NF)- $\kappa$ B (Zhu et al., 1996), así las citocinas en combinación con la infección por RV estimulan de manera sinérgica la producción de quimiocinas como la IL-8 (Newcomb et al., 2007). Una posibilidad es que las quimiocinas sean inducidas durante la infección viral respiratoria a través de la activación de los PRRs, los cuales mediante transducción de señales pueden activar factores de transcripción. En los genes de las MCPs hay varios sitios potenciales de unión a factores de transcripción, incluyendo a la proteína activadora 1 y a NF- $\kappa$ B (Wuyts et al., 2003; Grassl et al., 2005; Cullen et al., 2005). En realidad, se ha demostrado que el bloqueo de NF- $\kappa$ B mediante el pirrolidín ditiocarbamato, reduce la producción de MCP-3 (Wuyts et al., 2003). Sin embargo, el mecanismo mediante el cual los virus inducen la síntesis de MCP-3 y MCP-4 durante la infección natural por virus respiratorios está por determinarse.

Los niveles de MCP-3 y MCP-4 mostraron una tendencia a correlacionarse con los síntomas. Es posible entonces que el reclutamiento de macrófagos tenga que ver con el desarrollo de daño en la mucosa y de los síntomas del episodio. Los resultados de las determinaciones de radicales libres presentaron una tendencia hacia una mayor concentración de radicales en las muestras clínicas de los niños con infección viral respiratoria. Sin embargo, los datos no son concluyentes. Queda abierta entonces la posibilidad de que los macrófagos contribuyan con el daño en la mucosa respiratoria. Dado que durante las infecciones virales respiratorias (e.g., por RV) los neutrófilos y los macrófagos aparecen de una manera constante como una población importante entre las células reclutadas, y dado que pudieran estar contribuyendo con el daño respiratorio durante la inflamación provocada por la infección viral, sería importante entonces estudiar las posibilidades en cuanto a modular la reacción inflamatoria, para reducir el daño en la mucosa que puede estar asociado con la liberación de enzimas y de especies reactivas de oxígeno, provenientes de macrófagos y neutrófilos. Las estrategias que se han empezado a explorar en este sentido son uso de corticosteroides, aplicación de anticuerpos anti-quimiocinas, uso de antagonistas de quimiocinas, y uso de formas solubles de receptores de quimiocinas. En el caso de las MCPs, éstas activan a los monocitos a través de CCR2, el cual es un receptor principal expresado tanto en monocitos como en macrófagos (Rollins, 1997) es tentadora la idea de usar antagonistas de CCR2 con un propósito terapéutico.

## **CONCLUSIONES**

Nuestro modelo de estudio, permite analizar con una muestra de aspirado nasal, los virus causantes de infección respiratoria, las células reclutadas en la mucosa nasal y las linfocinas secretadas en dicho tejido.

Se observó una elevada frecuencia de rinovirus en infección respiratoria aguda en niños de nuestro país.

Los neutrófilos, los monocitos y los linfocitos son las células con mayores porcentajes de reclutamiento en la mucosa nasal durante la enfermedad respiratoria.

Existen altos niveles de MCP-3 y MCP-4 en secreción nasal durante la infección viral respiratoria.

Hay una correlación entre los niveles de ambas quimiocinas y la cantidad de macrófagos infiltrados en la mucosa nasal.

## ABREVIATURAS

AdV. adenovirus.  
ARDS, síndrome de distrés respiratorio agudo.  
BSA. albúmina sérica bovina.  
C5a, proteína (fragmento) 5a del complemento.  
C5aR, receptor de C5a.  
CAR, receptor para adenovirus y coxsackievirus.  
CCR1, etc. receptor 1 de quimiocina de tipo CC, etc.  
CD4, etc. cluster of differentiation number 4, etc.  
CFSE, carboxifluoresceína succinimidil éster.  
CM. células mononucleares.  
CoV. coronavirus,  
CXCR, receptor de quimiocina tipo CXC.  
DC. células dendríticas.  
DE. desviación estándar.  
DEPC. dietilpirocarbonato.  
DNA. ácido desoxirribonucleico.  
DEPC, dietil pirocarbonato.  
dNTP's, trifosfatos de desoxirribonucleótidos.  
dsRNA, ácidos ribonucleicos de doble cadena.  
E1A. proteína temprana 1 A, de adenovirus.  
ECP, proteína catiónica de eosinófilos.  
ELISA. *análisis inmunoabsorbente enzimático (linked)*.  
EPOC. enfermedad pulmonar obstructiva crónica.  
ESM. error estándar de la media.  
FC. citometría de flujo.  
Fc. fracción cristalizable de anticuerpos.  
Fig. figura.  
FITC. isotiocianato de fluoresceína.  
fMLP, formil-methionyl-leucyl-phenylalanina.  
fMLPR, receptor del fMLP.  
G-CSF. Granulocyte colony stimulating factor.  
GM-CSF, factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos.  
 $\gamma$ FcRI. receptor I para Fc de IgG.  
GRO. oncogen regulado por el crecimiento.  
HE. hematoxilina eosina.  
hMPV. Metapneumovirus humano.  
Ho. hipótesis nula.  
HPLC. cromatografía líquida de alta precisión.  
HSV. virus de herpes simple.  
IFN. interferón.  
ICAM. molécula de adhesión intercelular.  
IgG, etc. inmunoglobulina de tipo G, etc.  
IL-1, -2, etc. interleucina 1, 2, etc.  
IRF3, factor 3 regulador de interferón.  
IV. Virus de influenza.  
IVA, IVB. Virus de influenza A, Virus de influenza B.  
LPS. lipopolisacárido.  
LRR, repeticiones ricas en leucina.

LTC4. leucotrieno C4.  
mAc. anticuerpo monoclonal.  
MBP, proteína básica mayor.  
MCP-1, -2, -3, -4. proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1, tipo 2, tipo 3, tipo 4.  
Mhc-II, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II.  
MIP-1 $\alpha$ . proteína inflamatoria de macrófagos alfa.  
mRNA. ácido ribonucleico mensajero.  
NAIP, proteína inhibidora de la apoptosis de neuronas.  
MDA5, gen 5 asociado a la diferenciación de melanoma.  
NF- $\kappa$ B, factor nuclear  $\kappa$ B.  
NK cells. células asesinas naturales.  
NLR, receptores con repeticiones ricas en leucina con dominios de tipo NAIP.  
PAF, factor activador de plaquetas.  
PAFR, receptor del PAF.  
PAMP. patrón molecular asociado a patógeno.  
PBA. buffer salino de fosfatos (*phosphate*) con albúmina sérica bovina y azida de sodio.  
PBS. buffer salino de fosfatos (*phosphate buffer saline*).  
PCR. reacción de polimerasa en cadena.  
PEF. pico de flujo espiratorio.  
PIV. Virus de parainfluenza.  
PMN, fagocitos polimorfonucleares.  
PRR. receptores de reconocimiento de patógenos.  
RANTES. proteína expresada y secretada por células T normales regulada por activación.  
RIG-I, gen I inducible del ácido retinoico.  
RSV. virus sincitial respiratorio.  
RT-PCR. retrotranscripción en secuencia con una reacción en cadena de polimerasa.  
RV. rinovirus.  
SARS. Síndrome respiratorio agudo severo.  
SIDA. síndrome de inmunodeficiencia adquirida.  
ssRNA, RNA de cadena sencilla.  
STRI. síntomas del tracto respiratorio inferior.  
STRS. síntomas del tracto respiratorio superior.  
TBE. buffer de tris, boratos y EDTA  
Th1. células T cooperadoras que producen IFN $\gamma$  y el tipo de respuesta que producen.  
Th2. células T cooperadoras que producen IL-4 y el tipo de respuesta que producen.  
TLR. receptor de tipo Toll.  
TNF. factor de necrosis tumoral.  
Tregs, células T reguladoras.  
VLA-4. antígeno muy tardío tipo 4.  
WHO. World Health Organization.  
SINAIS. Sistema Nacional de Información en Salud.

## BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. 2008. World Health Statistics 2008. World Health Organization; París, Francia, pp. 18, 30.
2. SINAIS. 2008. Principales causas de mortalidad general 2000-2005. Mortalidad. Estadísticas por Tema. Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS), Secretaría de Salud, México. <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html>
3. Lambert SB, Allen KM, Carter RC, Nolan TM. 2008, The cost of community-managed viral respiratory illnesses in a cohort of healthy preschool-aged children. *Respir Res.* 9:11.
4. Fendrick AM, Monto AS, Nightengale B, Sarnes M. 2003. The Economic Burden of Non-Influenza-Related Viral Respiratory Tract Infection in the United States. *Arch Intern Med.* 163:487-494.
5. Winther B, McCue K, Ashe K, Rubino JR, Hendley JO. 2007. Environmental contamination with rhinovirus and transfer to fingers of healthy individuals by daily life activity. *J Med Virol* 79:1606-10.
6. Hammond S, Chenever E, Durbin JE. 2007. Respiratory virus infection in infants and children. *Pediatr Dev Pathol.* 10:172-80.
7. Samransamruajkit R, Hiranrat T, Chieochansin T, Sritippayawan S, Deerojanawong J, Prapphal N, Poovorawan Y. 2008. Prevalence, clinical presentations and complications among hospitalized children with influenza pneumonia. *Jpn J Infect Dis.* 61:446-9.
8. Vervloet LA, Marguet C, Camargos PA. 2007. Infection by *Mycoplasma pneumoniae* and its importance as an etiological agent in childhood community-acquired pneumonias. *Braz J Infect Dis.* 11:507-14.
9. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2009. Pneumonia hospitalizations among young children before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine--United States, 1997-2006. *Morb Mortal Wkly Rep.* 58:1-4.
10. Liam CK, Pang YK, Poosparajah S, Chua KT. 2007. Community-acquired pneumonia: an Asia Pacific perspective. *Respirology.* 12:162-4.
11. Cabello C, Manjarrez ME, Olvera R, Villalba J, Valle L, Paramo I. 2006. Frequency of viruses associated with acute respiratory infections in children younger than five years of age at a locality of México City. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101:21-24.
12. Noyola DE, Alpuche-Solís AG, Herrera-Díaz A, Soria-Guerra RE, Sánchez-Alvarado J, López-Revilla R. 2005. Human metapneumovirus infections in Mexico: epidemiological and clinical characteristics. *J Med Microbiol.* 57:969-74.
13. Garcia-Ramos E, Pizarro Suarez E, Sapiain LA, Lugo de la Fuente G. 1991. Epidemiologic and etiologic study of acute respiratory infections in children under 5 years of age. *Rev Latinoam Microbiol* 33:109-19.

14. Heller Rouassant S, Castillo Santos CA, Silva Acosta C, Sanchez Cerdan CJ, Ruiz, Gomez J. 1978. Antiviral antibodies in acute laryngotracheobronchitis. *Bol Med Hosp Infant Mex* 35:145-50.
15. Lopez Perez GT, Onuma Takane E, Garcia Caballero R, Huerta Lopez JG, Navarrete N, Castaneda Narvaez JL, 1993. Viruses precipitating asthmatic crises. *Rev Alerg Mex* 40:135-8.
16. Tirado R, Sarmiento RE, Bustos J, Thompson O, Gomez B, 1995. Occurrence of respiratory syncytial virus subtypes in Mexican infants with acute lower respiratory tract disease. *Arch Med Res* 26:121-6.
17. Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, Symington P, O'Toole S, Myint SH, Tyrrell DAJ, Holgate ST. 1995. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *Brit Med J.* 310:1225-9.
18. Gern JE, Busse WW. 1999, Association of rhinovirus infections with asthma. *Clin Microbiol Rev.* 12:9-18.
19. Teran LM, Johnston SL, Shute JK, Church MK, Holgate ST. 1994. Increased levels of interleukin-8 in the nasal aspirates of children with virus-associated asthma. *J Allergy Clin Immunol* 93:272.
20. Papadopoulos NG, Bates PJ, Bardin PG, Papi A, Leir SH, Fraenkel DJ, Meyer J, Lackie PM, Sanderson G, Holgate ST, Johnston SL. 2000. Rhinoviruses infect the lower airways. *J Infect Dis* 181:1875-84.
21. Falsey AR, Walsh EE, Hayden FG. 2002. Rhinovirus and Coronavirus Infection–Associated Hospitalizations among Older Adults. *J Infect Dis.* 185:1338-1341.
22. Lu X, Holloway B, Dare RK, Kuypers J, Yagi S, Williams JV, Hall CB, Erdman DD. 2008. Real-time reverse transcription-PCR assay for comprehensive detection of human rhinoviruses. *J Clin Microbiol.* 46:533-9.
23. Varkey JB, Varkey B. 2008. Viral infections in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med.* 14:89-94.
24. Turner RB, Hendley JO, Gwaltney JM Jr. 1982. Shedding of infected ciliated epithelial cells in rhinovirus colds. *J Infect Dis* 145:849-853.
25. Arruda E, Boyle TR, Winther B, Pevear DC, Gwaltney JM Ur, Hayden FG. 1995. Localization of human rhinovirus replication in the upper respiratory tract by in situ hybridization. *J Infect Dis* 171:1329-1333.
26. Rotbart HA, Hayden FG. 2000. Picornavirus infections: a primer for the practitioner. *Arch Fam Med* 9:913-20.
27. Greenberg SB. 2003. Respiratory consequences of rhinovirus infection. *Arch Intern Med.* 163:278-284.
28. Jang YJ, Lee SH, Kwon HJ, Chung YS, Lee BJ. 2005. Development of rhinovirus study model using organ culture of turbinate mucosa. *J Virol Methods.* 125:41-7.

29. Patick AK. 2006. Rhinovirus chemotherapy. *Antiviral Res.* 71:391-396.
30. Igarashi Y, Skoner DP, Doyle WJ, White MV, Fireman P, Kaliner MA. 1993. Analysis of nasal secretions during experimental rhinovirus upper respiratory infections. *J Allergy Clin Immunol.* 92:722-31.
31. Proud D, Gwaltney JM Jr, Hendley JO, Dinarello CA, Gillis S, Schleimer RP. 1994. Increased levels of interleukin-1 are detected in nasal secretions of volunteers during experimental rhinovirus colds. *J Infect Dis* 169:1007-1013.
32. Sperber SJ y Hayden FG. 1988. Chemotherapy of rhinovirus colds. *Antimicrob Agents Chemother.* 32:409-19.
33. Naclerio RM, Proud D, Lichtenstein LM, Kagey SA, Hendley JO, Sorrentino J, Gwaltney JM Jr. 1988. Kinins are generated during experimental rhinovirus colds. *J Infect Dis* 157:133-142.
34. Proud D, Naclerio RM, Gwaltney JM Jr, Hendley JO. 1990, Kinins are generated in nasal secretions during natural rhinovirus colds. *J Infect Dis* 161:120-123.
35. Subauste MC, Jacoby DB, Richards SM, Proud D. 1995. Infection of a human respiratory epithelial cell line with rhinovirus. Induction of cytokine release and modulation of susceptibility to infection by cytokine exposure. *J Clin Invest.* 96:549-57.
36. Gern JE, Vrtis R, Grindle KA, Swenson C, Busse WW. 2000, Relationship of upper and lower airway cytokines to outcome of experimental rhinovirus infection. *Am J Respir Crit Care Med* 162:2226–2231.
37. Jarjour NN, Gern JE, Kelly EA, Swenson CA, Dick CR, Busse WW. 2000. The effect of an experimental rhinovirus 16 infection on bronchial lavage neutrophils. *J Allergy Clin Immunol* 105:1169–1177.
38. Message SD, y Johnston SL. 2004. Host defense function of the airway epithelium in health and disease: clinical background. *J Leukoc Biol.* 75:5-17.
39. Wark PA, Bucchieri F, Johnston SL, Gibson PG, Hamilton L, Mimica J, Zummo G, Holgate ST, Attia J, Thakkestian A, Davies DE. 2007, IFN-gamma-induced protein 10 is a novel biomarker of rhinovirus-induced asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol.* 120:586-93.
40. Turner RB. 1990. The role of neutrophils in the pathogenesis of rhinovirus infections. *Pediatr Infect Dis J* 9:832-835.
41. Johnston SL. 1995. Natural and experimental rhinovirus infections of the lower respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med.* 152:S46-52.
42. Teran LM, SL Johnston, J Schröder, MK Church y ST Holgate. 1997. Role of Nasal Interleukin-8 in neutrophil Recruitment and Activation in Children with Virus-Induced Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 155:1362-1366.
43. Gern JE, Martin MS, Anklam KA, Shen K, Roberg KA, Carlson-Dakes KT, Adler K, Gilbertson-White S, Hamilton R, Shult PA, Kirk CJ, Da Silva DF, Sund SA, Kosorok



- MR, Lemanske RF Jr. 2002. Relationships among specific viral pathogens, virus-induced interleukin-8, and respiratory symptoms in infancy. *Pediatr Allergy Immunol.* 13:386-93.
44. Barrett B, Brown R, Volland R, Maberry R, Turner R. 2006. Relations among questionnaire and laboratory measures of rhinovirus infection. *Eur Respir J.* 28:358-63.
45. Levandowsky RA, Ou DW, Jackson GG. 1986, Acute-phase decrease of T Lymphocyte subsets in rhinovirus infection. *J Infect Dis* 153:743-748.
46. Hsia J, Goldstein AI, Simon GL, Sztejn M, Hayden FG. 1990, Peripheral blood mononuclear cell interleukin-2 and interferon-gamma production, cytotoxicity, and antigen-simulated blastogenesis during experimental rhinovirus infection. *J Infect Dis* 162:591-597.
47. Gern UE, Vrtis R, Kelly EA, Dick EC, Busse WW. 1996, Rhinovirus produces non specific activation of lymphocytes through a monocyte-dependent mechanism. *J Immunol* 157:1605-1612.
48. Sanders SP, Proud D, Permutt S, Siekierski ES, Yachechko R, Liu MC. 2004. Role of nasal nitric oxide in the resolution of experimental rhinovirus infection. *J Allergy Clin Immunol.* 113:697-702.
49. van Benten IJ, van Drunen CM, Koopman LP, van Middelkoop BC, Hop WC, Osterhaus AD, Neijens HJ, Fokkens WJ. 2005. Age- and infection-related maturation of the nasal immune response in 0-2-year-old children. *Allergy.* 60:226-32.
50. Message SD, Johnston SL. 2001, The immunology of virus infection in asthma. *Eur Respir J* 18:1013-1025.

#### Coronavirus

51. Holmes KV, Lai MMC. 1996, Coronaviridae: the viruses and their replication. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Monath TP, Melnick JL, Roizman B, eds. *Fields Virology.* III ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, pp. 1075-93.
52. McIntosh K. 1996, Coronaviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Monath TP, Melnick JL, Roizman B, eds. *Fields Virology.* 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, pp. 1095-1103.
53. Denison MR. 1999. The common cold. En: Dolin R y Wright PF, eds. *Viral infections of the respiratory tract.* I ed. Marcel Dekker Inc., 253-280.
54. Greenberg SB. 2007. Rhinovirus and coronavirus infections. *Semin Respir Crit Care Med.* 28:182-92.
55. Greiff L, Andersson M, Akerlund A, Wollmer P, Svensson C, Alkner U, Persson CG.. 1994. Microvascular exudative hyperresponsiveness in human coronavirus-induced common cold. *Thorax.* 49:121-7.
56. Linden M, Greiff L, Andersson M, Svensson C, Akerlund A, Bende M, Andersson E, Persson CG. 1995. Nasal cytokines in common cold and allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 25:166-172.

57. Pearlman S, Dandekar AA. 2005, Coronavirus infections: implications for SARS. *Nature Rev. Immunol.* 5:917-27.
58. Chen J, Subbarao K. 2007. The immunobiology of SARS. *Ann Rev Immunol.* 25:443-75.
59. Ng PC, Lam CW, Li AM, Wong CK, Cheng FW, Leung TF, Hon EK, Chan IH, Li CK, Fung KS, Fok TF. 2004. Inflammatory cytokine profile in children with severe acute respiratory syndrome. *Pediatrics.* 113:e7-14.
60. Johnson G. 2000. The Living World. II ed. McGraw Hill, online (<http://www.mhhe.com/biosci/genbio/tlw/full/new/update7.html>).
61. Nicholson, KG. 1992. Clinical Features of Influenza. *Sem Respir Infect* 7:26-37.
62. Renegar KB, Small PA Jr, Boykins LG, Wright PF. 2004. Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract. *J Immunol.* 173:1978-86.
63. Chan MC, Cheung CY, Chui WH, Tsao SW, Nicholls JM, Chan YO, Chan RW, Long HT, Poon LL, Guan Y, Peiris JS. 2005. Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells. *Respir Res* 6:135-47.
64. Xu W, Zheng S, Goggans TM, Kiser P, Quinones-Mateu ME, Janocha AJ, Comhair SA, Slee R, Williams BR, Erzurum SC. 2006. Cystic fibrosis and normal human airway epithelial cell response to influenza a viral infection. *J Interferon Cytokine Res.* 26:609-27.
65. Korteweg C, Gu J. 2008. Pathology, molecular biology, and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) infection in humans. *Am J Pathol.* 172:1155-70.
66. Cheung CY, Poon LL, Lau AS, Luk W, Lau YL, Shortridge KF, Gordon S, Guan Y, Peiris JS. 2002. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet.* 360:1831-7.
67. Gill MA, Long K, Kwon T, Muniz L, Mejias A, Connolly J, Roy L, Banchereau J, Ramilo O. 2008. Differential recruitment of dendritic cells and monocytes to respiratory mucosal sites in children with influenza virus or respiratory syncytial virus infection. *J Infect Dis.* 198:1667-76.
68. Cannell JJ, Vieth R, Umhau JC, Holick MF, Grant WB, Madronich S, Garland CF, Giovannucci E. 2006, Epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiol Infect.* 134:1129-40.
69. Roberts NJ (a), Prill AH, Mann TN. 1986. Interleukin 1 and interleukin 1 inhibitor production by human macrophages exposed to influenza virus or respiratory syncytial virus: respiratory syncytial virus is a potent inducer of inhibitory activity. *J Exp Med.* 163:511-519.
70. Skoner DP, Gentile DA, Patel A, Doyle WJ. 1999. Evidence for Cytokine Mediation of Disease Expression in Adults Experimentally Infected with Influenza A Virus. *J Infect Dis.* 180:10-14.

71. Julkunen I, Melen K, Nyqvist M, Pirhonen J, Sareneva T, Matikainen S. 2000. Inflammatory responses in influenza A virus infection. *Vaccine*. 19 Suppl 1:S32-7.
72. Welliver, Timothy P.; Garofalo, Roberto P.; Hosakote, Yashoda; Hintz, Karen H.; Avendano, Luis; Sanchez, Katherine; Velozo, Luis; Jafri, Hasan; Chavez-Bueno, Susana; Ogra, Pearay L.; McKinney, LuAnn; Reed, Jennifer L.; Welliver, Sr., Robert C. 2007. Severe human lower respiratory tract illness caused by respiratory syncytial virus and influenza virus is characterized by the absence of pulmonary cytotoxic lymphocyte responses. *J Infect Dis* 195:1126-1136.
73. Van Reeth K, Van Gucht S, Pensaert M. 2002. In vivo studies on cytokine involvement during acute viral respiratory disease of swine: troublesome but rewarding. *Vet Immunol Immunopathol*. 87:161-8.
74. Rothberg MB, Haessler SD, Brown RB. 2008. Complications of viral influenza. *Am J Med*. 121:258-64.
75. Proud D, Chow C. 2006. Role of viral infection in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 35:513-518.
76. Hashem M, Hall CB. 2003. Respiratory syncytial virus in healthy adults: the cost of a cold. *J Clin Virol*. 27:14-21.
77. Lee MS, Walker RE, Mendelman PM. 2005. Medical burden of respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3 infection among US children. Implications for design of vaccine trials. *Hum Vaccin*. 1:6-11.
78. Mohapatra SS, Boyapalle S. 2008. Epidemiologic, experimental, and clinical links between respiratory syncytial virus infection and asthma. *Clin Microbiol Rev*. 21:495-504.
79. Bueno SM, González PA, Pacheco R, Leiva ED, Cautivo KM, Tobar HE, Mora JE, Prado CE, Zúñiga JP, Jiménez J, Riedel CA, Kalergis AM. 2008. Host immunity during RSV pathogenesis. *Int Immunopharmacol*. 8:1320-9.
80. Noah T, Henderson FW, Wortman I, Devlin R, Handy J, Koren H, et al. 1995. Nasal cytokine production in viral acute upper respiratory infection of childhood. *J Infect Dis* 171:584-592.
81. Okamoto Y, Kudo K, Ishikawa K, Ito E, Togawa K, Saito I, et al. 1993. Presence of respiratory syncytial virus genomic sequences in middle ear fluid and its relationship to expression of cytokines and cell adhesions molecules. *J Infect Dis* 168:1277-1288.
82. Neuzil K, Tang Y, Graham Bs. 1996. Protective effects of TNF- $\alpha$  on respiratory syncytial virus infection in vitro and in vivo. *Am J Med Sci* 311:201-204.
83. Smyth RL. 2007. Innate immunity in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Exp Lung Res*. 33:543-7.
84. Ingram JM, Rakes GP, Hoover GE, Platts-Mills TA, Heymann PW. 1995. Eosinophil cationic protein in serum and nasal washes from wheezing infants and children. *J Pediatr* 127:558-564.

85. Chin J, Magoffin RL, Sheare LA, Schieble JH, Lennette EG. 1969. Field evaluation of a respiratory syncytial virus vaccine and a trivalent parainfluenza virus vaccine in a pediatric population. *Am J Epidemiol* 89:449-463.
86. Simard C, Nadon F, Seguin C, Thien NN, Binz H, Basso J, Laliberte JF, Trudel M. 1997. Subgroup specific protection of mice from respiratory syncytial virus infection with peptides encompassing the amino acid region 174-187 from the G glycoprotein: the role of cysteinyl residues in protection. *Vaccine* 15:423-432.
87. Srikiatkachorn A, Braciale TJ. 1997. Virus-specific CD8+ T lymphocytes downregulate T helper cell type 2 cytokine secretion and pulmonary eosinophilia during experimental murine respiratory syncytial virus infection. *J Exp Med* 186:421-432.
88. Hall CB, Douglas RG Jr, Simons RL, Geiman JM. 1978. Interferon production in children with respiratory syncytial, influenza, and parainfluenza virus infections. *J Pediatr.* 93:28-32.
89. Anderson J, Norden J, Saunders D, Toms G, Scott R. 1990. Analysis of the local and systemic immune responses induced in BALB/c mice by experimental respiratory syncytial virus infection. *J Gen Virol* 71:1561-1570.
90. Becker Y. 2006 . 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.* 33:235-52.
91. Jafri HF. 2002. Role of chemokines in respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Infect Dis J* 21:454-456.
92. Kapikian AZ, Mitchell RH, Chanock RM, Shvedoff RA, Stewart CE. 1969. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am J Epidemiol.* 89:405-21.
93. Aberle JH, Aberle SW, Dworzak MN, Mandl CW, Rebhandl W, Vollnhofer G, Kundi M, Popow-Kraupp T. 1999. Reduced interferon-gamma expression in peripheral blood mononuclear cells of infants with severe respiratory syncytial virus disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 160:1263-8.
94. Román M, Calhoun WJ, Hinton KL, Avendaño LF, Simon V, Escobar AM, Gaggero A, Díaz PV. 1997. Respiratory syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th-2-like response. *Am J Respir Crit Care Med.* 156:190-5.
95. Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, van Aalderen WM, Brus F, Draaisma JM, Pekelharing-Berghuis M, van Diemen-Steenvoorde RA, Kimpen JL. 2001. Local interferon-gamma levels during respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection are associated with disease severity. *J Infect Dis.* 184:355-8.
96. Abu-Harb M, Bell F, Finn A, Rao WH, Nixon L, Shale D, Everard ML. 1999. IL-8 and neutrophil elastase levels in the respiratory tract of infants with RSV bronchiolitis. *Eur Respir J.* 14:139-43.

97. Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, van Aalderen WM, Brus F, Draaisma JT, Geelen SM, Kimpen JL. 2000. 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*. 161:1518-23.
98. Kimpen JLL. 2001. Respiratory Syncytial virus and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 163:S7-S9.
99. Boelen A, Andeweg A, Kwakkel J, Lokhorst W, Bestebroer T, Dormans J, Kimman T. 2000. Both immunisation with a formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV)vaccine and a mock antigen vaccine induce severe lung pathology and a Th2 cytokine profile in RSV-challenged mice. *Vaccine*. 19:982-91.
100. Matsuda K, Tsutsumi H, Sone S *et al.* 1996. Characteristics of IL-6 and TNF-alpha production by respiratory syncytial virus-infected macrophages in the neonate. *J Med Virol* 48:199-203.
101. Krilov LR, McCloskey TW, Harkness SH, Pontrelli L, Pahwa S. 2000. Alterations in apoptosis of cord and adult peripheral blood mononuclear cells induced by *in vitro* infection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 181: 349-53
102. De Boeck K., Moens M., Schddinck L. 1996. Only ribavirin treatment did not prevent severe disease in high-risk bronchopulmonary dysplasia patients with respiratory syncytial virus infection. *Pediatric pulmonology* 21:343.
103. Denny FW, Murphy TF, Clyde WA Jr, Collier AM, Henderson FW. 1983. Croup: an 11 year study in a pediatric practice. *Pediatrics* 71:871-876.
104. Schmidt AC. 2007. Progress in Respiratory virus vaccine development. *Semin Respir Cri Care Med* 28:243-252.
105. Henrickson KJ. 2003. Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev* 16:242-264.
106. Hayashi S, Hogg JC. 2007. Adenovirus infections and lung disease. *Curr Opinion Pharmacol* 7:237-43.
107. Büchen-Osmond, C. (Ed). 2006. Index to ICTVdB virus descriptions. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. ICTVdB Management, Mailman School of Public Health, Columbia University, Nueva York, NY, EU.
108. Fuller O, Perez-Romero P. 2002. Mechanisms of DNA virus infection: Entry and early events. *Frontiers in Bioscience* 7:d390-d406.
109. Zhang Y, Bergelson JM. 2005. 2005. Adenovirus receptors. *J Virol* 79:12125-31.
110. Bangari DS, Sharma A, Mittal SK. 2005. Bovine adenovirus type 3 internalization is independent of primary receptors of human adenovirus type 5 and porcine adenovirus type 3. *Biochem Biophys Res Commun* 331:1478-84.
111. Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ. 1999.  $\alpha V\beta 5$  integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 5:78-82.

112. Echavarría M. 2008. Adenovirus in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Rev* 21:704-715.
113. Hu Y, Sperber K, Mayer L, Hsu MT. 1992. Persistent infection of human adenovirus type-5 in human monocyte cell lines. *Virology* 188:793-800.
114. Macek V, Sorli J, Kopriva S, Marin J. 1994. Persistent adenoviral infection and chronic airway obstruction in children. *Am J Respir Crit Care Med* 150:7-10.
115. Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Wilson JM. 1994. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4407-4411.
116. Hippenstiel S, Opitz B, Schmeck B, Suttorp N. 2006. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia-molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respir Res.* 7:97-112.
117. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
118. Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, Lee G, Choi S. 2007. Toll-like receptor signal transduction. *Exp Mol Med.* 39:421-38.
119. Akira S. 2003. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15:5-11.
120. Beutler B, Jiang Z, Georgel P, Crozat K, Croker B, Rutschmann S, Du X, Hoebe K. 2006. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol.* 24:353-89.
121. Bowie AG. 2007. Recent advances in understanding the role of Toll-like receptors in anti-viral immunity. *Clin Exp Immunol* 147:217-226.
122. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Näslund TI, Liljeström P, Weber F, Reis e Sousa C. 2006. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science.* 314:997-1001.
123. Bürckstümmer T, Baumann C, Blüml S, Dixit E, Dürnberger G, Jahn H, Planyavsky M, Bilban M, Colinge J, Bennett KL, Superti-Furga G. 2009. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol.* 10:266-72.
124. Roberts TL, Idris A, Dunn JA, Kelly GM, Burnton CM, Hodgson S, Hardy LL, Garceau V, Sweet MJ, Ross IL, Hume DA, Stacey KJ. 2009. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science.* 323:1057-60.
125. Santoro MG, Rossi A, Amici C. 2003. NF-kappaB and virus infection: who controls whom. *EMBO J.* 22:2552-60.
126. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol.* 1:398-401.

127. Mansson A, Cardell LO. 2008. Activation of eosinophils via Toll-like receptor (TLR)3, TLR7 and TLR9: Link between viral infection and asthma? *Eur Respir Rev* 17:46-8.
128. Vercammen E, Staal J, Beyaert R. 2008. Sensing viral infection and activation of innate immunity by Toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev* 21:13-25.
129. Nembrini C, Abel B, Kopf M, Marsland BJ. 2006. Strong TCR signaling, TLR ligands, and cytokine redundancies ensure robust development of type 1 effector T cells. *J Immunol*. 176:7180-8.
130. Parker LC, Prince LR, Sabroe I. 2007. Translational Mini-Review Series on Toll-like Receptors: Networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clin Exp Immunol* 147:199-207.
131. Delgado MF, Coviello S, Monsalvo AC, Melendi GA, Hernandez JZ, Batalle JP, Diaz L, Trento A, Chang HY, Mitzner W, Ravetch J, Melero JA, Irusta PM, Polack FP. 2009. Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nat Med*. 15:34-41.
132. Gordon SB, Read RC. 2002. Macrophage defences against respiratory tract infections. *Brit Med Bull* 61:45-61.
133. Sabroe I, Whyte MKB. 2007. Toll-like receptor (TLR)-based networks regulate neutrophilic inflammation in respiratory disease. *Biochem Soc Trans*. 35:1492-5.
134. Panuska JR, Hertz MI, Taraf H, Villani A, Cirino NM. 1992. Respiratory syncytial virus infection of alveolar macrophages in adult transplant patients. *Am Rev Respir Dis*. 145:934-9.
135. Writing Committee of the Second World Health Organization Consultation on Clinical Aspects of Human Infection with Avian Influenza A (H5N1) Virus. 2008. Update on Avian Influenza A (H5N1) Virus Infection in Humans. *N Engl J Med* 358:261-273.
136. Panuska JR, Midulla F, Cirino NM, Villani A, Gilbert IA, McFadden ER Jr, Huang YT. 1990. Virus-induced alterations in macrophage production of tumor necrosis factor and prostaglandin E2. *Am J Physiol*. 259:L396-402.
137. Chung Y, Cheung, Leo L. M. Poon, Iris H. Y. Ng, Winsie Luk, Sin-Fun Sia, Mavis H. S. Wu, Kwok-Hung Chan, Kwok-Yung Yuen, Siamon Gordon, Yi Guan, and Joseph S. M. Peiris. 2005. Cytokine Responses in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-Infected Macrophages In Vitro: Possible Relevance to Pathogenesis. *J Virol* 79:7819-26.
138. Thiel V, Weber F. 2008. Interferon and cytokine responses to SARS-coronavirus infection. *Cytokine Growth Factor Rev*. 19:121-32.
139. McNamara PS, Smyth RL. 2002. The pathogenesis of respiratory syncytial virus disease in childhood. *Brit Med Bull* 61:13-28.

140. Panuska J, Merolla R, Rebert N, Hoffman S, Tsivitse P, Cirino N. 1995. Respiratory syncytial virus induces interleukin-10 by human alveolar macrophages. *J Clin Invest* 96:2445-2453.
141. Konno S, Grindle KA, Lee WM, Schroth MK, Mosser AG, Brockman-Schneider RA, Busse WW, Gern JE. 2002. Interferon-gamma enhances rhinovirus-induced RANTES secretion by airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 26:594-601.
142. Kristjansson S, Bjarnarson SP, Wennergren G, Palsdottir AH, Arnadottir T, Haraldsson A, Jonsdottir I. 2005. Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses during the first 3 months of life promote a local TH2-like response. *J Allergy Clin Immunol*. 116:805-11.
143. Muir A, Soong G, Sokol S, Reddy B, Gomez MI, Van Heeckeren A, Prince A. 2004. Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 30:777-83.
144. Greene CM, Carroll TP, Smith SG, Taggart CC, Devaney J, Griffin S, O'Neill SJ, McElvaney NG. 2005. TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells. *J Immunol*. 174:1638-46.
145. Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, Escriou N, Akira S, Chignard M, Si-Tahar M. 2005. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem*. 280:5571-80.
146. Hewson CA, Jardine A, Edwards MR, Laza-Stanca V, Johnston SL. 2005. Toll-Like Receptor 3 Is Induced by and Mediates Antiviral Activity against Rhinovirus Infection of Human Bronchial Epithelial Cells. *J. Virol*. 79: 12273-12279.
147. Rudd BD, Burstein E, Duckett CS, Li X, Lukacs NW. 2005. Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression. *J Virol*. 79:3350-7.
148. Groskreutz DJ, Monick MM, Powers LS, Yarovinsky TO, Look DC, Hunninghake GW. 2006. Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells. *J Immunol*. 176:1733-40.
149. Le Goffic R, Balloy V, Lagranderie M, Alexopoulou L, Escriou N, Flavell R, Chignard M, Si-Tahar M. 2006. Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS Pathog*. 2:e53.
150. Papi A, Stanciu LA, Papadopoulos NG, Teran LM, Holgate ST, Johnston SL. 2000. Rhinovirus infection induces major histocompatibility complex class I and costimulatory molecule upregulation on respiratory epithelial cells. *J Infect Dis*. 181:1780-4.
151. Matsukura S, Stellato C, Plitt JR, Bickel C, Miura K, Georas SN, Casolaro V, Schleimer RP. 1999. Activation of eotaxin gene transcription by NF-kappa B and STAT6 in human airway epithelial cells. *J Immunol*. 163:6876-83.
152. Zach TL, Hill LD, Herrman VA, Leuschen MP, Hostetter MK. 1992. Effect of glucocorticoids on C3 gene expression by the A549 human pulmonary epithelial cell line. *J Immunol* 148:3964-69.



153. Garofalo RP, Haeberle H. 2000. Epithelial regulation of innate immunity to respiratory syncytial virus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23:581-5.
154. Luster AD. 2001. Chemotaxis: Role in Immune Response. In: Encyclopedia of Life Sciences [online] Dec 12 2001. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. Available from [www.els.net](http://www.els.net).
155. Wang SZ, Forsyth KD. 2000. The interaction of neutrophils with respiratory epithelial cell in viral infection. *Respirology* 5:1-10.
156. Nakamura H, Yoshimura K, McElvaney NG, Crystal RG. 1992. Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J Clin Invest.* 89:1478-84.
157. Greene CM, Carroll TP, Smith SG, Taggart CC, Devaney J, Griffin S, O'Neill SJ, McElvaney NG. 2005. TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells. *J Immunol.* 174:1638-46.
158. Daley JM, Reichner JS, Mahoney EJ, Manfield L, Henry WL Jr, Mastrofrancesco B, Albina JE. 2005. Modulation of macrophage phenotype by soluble product(s) released from neutrophils. *J Immunol.* 174:2265-72.
159. Baraldo S, Turato G, Badin C, Bazzan E, Beghé B, Zuin R, Calabrese F, Casoni G, Maestrelli P, Papi A, Fabbri LM, Saetta M. 2004. Neutrophilic infiltration within the airway smooth muscle in patients with COPD. *Thorax.* 59:308-12.
160. Oltmanns U, Sukkar MB, Xie S, John M, Chung KF. 2005. Induction of human airway smooth muscle apoptosis by neutrophils and neutrophil elastase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 32:334-41.
161. Fan J, Frey RS, Malik AB. 2003. TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. *J Clin Invest.* 2003 Oct;112(8):1234-43. Comment in: *J Clin Invest.* 112:1136-7.
162. Molesworth-Kenyon SJ, Oakes JE, Lausch RN. 2005. A novel role for neutrophils as a source of T cell-recruiting chemokines IP-10 and Mig during the DTH response to HSV-1 antigen. *J Leukoc Biol.* 77:552-9.
163. Bianchi SM, Dockrell DH, Renshaw SA, Sabroe I, Whyte MK. 2006. Granulocyte apoptosis in the pathogenesis and resolution of lung disease. *Clin Sci (Lond).* 110:293-304.
164. Taubenberger y Morens, 2008. The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol* 3:499-522.
165. Wark PA, Saltos N, Simpson J, Slater S, Hensley MJ, Gibson PG. 2000. Induced sputum eosinophils and neutrophils and bronchiectasis severity in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Eur Respir J.* 16:1095-101.
166. Raja A. 2004. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* 120:213-32.

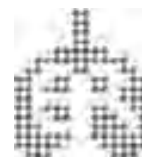
167. Moritz P, Steidle LJ, Felisbino MB, Kleveston T, Pizzichini MM, Pizzichini E. 2008. Determination of the inflammatory component of airway diseases by induced sputum cell counts: use in clinical practice. *J Bras Pneumol.* 34:913-21.
168. Olszewska-Pazdrak B, Pazdrak K, Ogra PL, Garofalo RP. 1998. Respiratory syncytial virus-infected pulmonary epithelial cells induce eosinophil degranulation by a CD18-mediated mechanism. *J Immunol.* 160:4889-95.
169. Pazdrak K, Olszewska-Pazdrak B, Liu T, Takizawa R, Brasier AR, Garofalo RP, Casola A. 2002. MAPK activation is involved in posttranscriptional regulation of RSV-induced RANTES gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 283:L364-72.
170. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F. 1994. Eosinophil cationic protein in nasal secretion and in serum and myeloperoxidase in serum in respiratory syncytial virus bronchiolitis: relation to asthma and atopy. *Acta Paediatr.* 83:1151-5.
171. Garofalo R, Kimpen JL, Welliver RC, Ogra PL. 1992. Eosinophil degranulation in the respiratory tract during naturally acquired respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr.* 120:28-32.
172. Ingram JM, Rakes GP, Hoover GE, Platts-Mills TA, Heymann PW. Eosinophil cationic protein in serum and nasal washes from wheezing infants and children. *J Pediatr.* 127:558-64.
173. Fraenkel DJ, Bardin PG, Sanderson G, Lampe F, Johnston SL, Holgate ST. 1995. Lower airways inflammation during rhinovirus colds in normal and in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 151:879-86.
174. Grünberg K, Smits HH, Timmers MC, de Klerk EP, Dolhain RJ, Dick EC, Hiemstra PS, Sterk PJ. 1997. Experimental rhinovirus 16 infection. Effects on cell differentials and soluble markers in sputum in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 156:609-16.
175. Grayson MH, Holtzman MJ. 2007. Emerging role of dendritic cells in respiratory viral infection. *J Mol Med* 85:1057-1068.
176. Iwasaki A. 2007. Mucosal dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 25:381-418.
177. Belz GT, Smith CM, Kleinert L, Reading P, Brooks A, et al. 2004. Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:8670-75.
178. Ghaffar O, Q Hamid, PM Renzi, Z Allakhverdi, S Molet, JC Hogg, SA Shore, AD Luster y B Lamkhioed. 1999. Constitutive and Cytokine-Stimulated Expression of Eotaxin by Human Airway Smooth Muscle Cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 159:1933-1942.
179. Sozzani S, Sallusto F, Luini W, Zhou D, Piemonti L, Allavena P, Van Damme J, Valitutti S, Lanzavecchia A, Mantovani A. 1995. Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a and a distinct set of chemokines. *J. Immunol.* 155: 3292.

180. Chensue SW, 2001. Molecular machinations: chemokine signals in host-pathogen interactions. *Clin Microbiol Rev.* 14:821-35.
181. Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, Appella E, Kung HF, Leonard EJ, Oppenheim JJ. 1988. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 167:1883-93.
182. Tanaka S, Robinson EA, Yoshimura T, Matsushima K, Leonard EJ, Appella E. 1988. Synthesis and biological characterization of monocyte-derived neutrophil chemotactic factor. *FEBS Lett.* 236:467-70.
183. Oppenheim JJ, Matsushima K, Yoshimura T, Leonard EJ. 1987. The activities of cytokines are pleiotropic and interdependent. *Immunol Lett.* 16:179-83.
184. Oppenheim JJ, Zachariae C O, Mukaida N, Matsushima K. 1991. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol.* 9:617-48.
185. Mahalingam S, Clark K, Matthaehi KI, Foster PS. 2001. Antiviral potential of chemokines. *BioEssays* 23:428-435.
186. Matsukura S, F Kokubu, H Noda, H Tokunaga y M Adachi. 1996. Expression of IL-6, IL-8, and RANTES on human bronchial epithelial cells, NCI-H292, induced by influenza virus A. *J Allergy Clin Immunol.* 98:1080-1087.
187. Terajima, Yamaya, Sekizawa, Okinaga, Suzuki, Yamada, Nakayama, Ohru, Oshima, Numazaki, Sasaki. 1997. Rhinovirus infection of primary cultures of human tracheal epithelium; role of ICAM-1 and IL-1 $\beta$ . *Am J Physiol.* 273:L749-L759.
188. Saito T, RW Deskin, A Casola, h Häeberle, B Olszewska, PB Ernst, R Alam, PL Ogra y R Garofalo. 1997. Respiratory Syncytial Virus Induces Selective Production of the Chemokine RANTES by Upper Airway Epithelial Cells. *J Infect Dis.* 175:497-504.
189. Domachowske JB, Bonville CA, Dyer KD, Easton AJ, Rosenberg HF. 2000. Pulmonary eosinophilia and production of MIP-1 $\alpha$  are prominent responses to infection with pneumonia virus of mice. *Cell Immunol.* 200:98-104.
190. Bonville CA, Rosenberg HF, Domachowske JB. 1999. Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  and RANTES are present in nasal secretions during ongoing upper respiratory tract infection. *Pediatr Allergy Immunol.* 10:39-44.
191. Greiff L, M Andersson, E Andersson, M Linden, S Myint, C Svensson y CGA Persson, 1999. Experimental common cold increases mucosal output of eotaxin in atopic individuals. *Allergy* 54:1204-1208.
192. Scheerens J, Folkerts G, Van Der Linde H, Sterk PJ, Conroy DM, Williams TJ, Nijkamp FP. 1999. Eotaxin levels and eosinophils in guinea pig broncho-alveolar lavage fluid are increased at the onset of a viral respiratory infection. *Clin Exp Allergy.* 29(Suppl 2):74-7.

193. Sozzani S, Locati M, Allavena P, Van Damme J, Mantovani A. 1996. Chemokines: a superfamily of chemotactic cytokines. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 26: 69-82.
194. Opdenakker G, Froyen G, Fiten P, Proost P, Van Damme J. 1993. Human monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3): molecular cloning of the cDNA and comparison with other chemokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191: 535-42.
195. Van Damme J, Proost P, Lenaerts JP, Opdenakker G. 1992. Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J. Exp. Med.* 176: 59-65.
196. Sozzani S, Zhou D, Locati M, Rieppi M, Proost P, Magazin M, Vita N, Van Damme J, Mantovani A. 1994. Receptors and transduction pathways for monocyte chemotactic protein-2 and monocyte chemotactic protein-3 similarities and differences with MCP-1. *J. Immunol.* 152: 3615-22.
197. Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. 1994. Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *FASEB J.* 8: 1055-60.
198. Taub DD, Proost P, Murphy W J, Anver M, Longo D L, Van Damme J, Oppenheim JJ. 1995. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 95: 1370-6.
199. Allavena P, Bianchi G, Zhou D, Van Damme J, Jilek P, Sozzani S, Mantovani A. 1994. Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. *Eur. J. Immunol.* 24: 3233-6.
200. Dahinden C A, Geiser T, Brunner T, von Tscherner V, Caput D, Ferrara P, Minty A, Baggiolini M. 1994. Monocyte chemotactic protein-3 is a most effective basophil- and eosinophil-activating chemokine. *J. Exp. Med.* 179: 751-6.
201. Chauhan AJ, Inskip HM, Linaker CH, Smith S, Schreiber J, Johnston SL, Holgate ST. 2003. Personal exposure to nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) and the severity of virus-induced asthma in children. *Lancet* 361:1939-1944.
202. Manjarrez ME, Rosete DP, Rincón M, Villalba J, Cravioto A, Cabrera R. 2003. Comparative viral frequency in Mexican children under 5 years of age with and without upper respiratory symptoms. *J Med Microbiol.* 52(Pt 7):579-83.
203. Thompson, WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer, L Cox N, Anderson, LJ Fukuda K. 2003. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA* 289:179-86.
204. Straliotto SM, Siqueira MM, Muller RL, Fischer GB, Cunha ML, Nestor SM. 2002. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 35:283-91.
205. Grondahl B, Puppe W, Hoppe A, Kuhne I, Weigl JA, Schmitt HJ. 1999. Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study. *J Clin Microbiol* 37:1-7

206. Maitreyi RS, Broor S, Kabra SK, Ghosh M, Seth P, Dar L, Prasad AK. 2000. Rapid detection of respiratory viruses by centrifugation enhanced cultures from children with acute lower respiratory tract infections. *J Clin Virol* 16:41-7.
207. Cyranoski D. 2003. Vaccine sought as bird flu infects humans. *Nature* 422:6.
208. Taubenberger JK, Morens DM. 2008. The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol* 3:499-522.
209. Bii CC, Yamaguchi H, Kai M, Nagai K, Sugiura Y, Taguchi H, Chakaya JM, Mbugua GG, Kamiya H. 2002. *Mycoplasma pneumoniae* in children with pneumonia at Mbagathi District Hospital, Nairobi. *East Afr Med J*. 79:317-22.
210. Grondahl B, Puppe W, Hoppe A, Kuhne I, Weigl JA, Schmitt HJ. 1999. Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study. *J Clin Microbiol* 37:1-7.
211. Tang LF, Wang TL, Tang HF, Chen ZM. 2008. Viral pathogens of acute lower respiratory tract infection in China. *Indian Pediatr*. 45:971-5.
212. Lichenstein R, King JC Jr, Lovchik J, Keane V. 2002. Respiratory viral infections in hospitalized children: implications for infection control. *South Med J*. 95:1022-5.
213. Abu-Harb M, Bell F, Finn A, Rao WH, Nixon L, Shale D, Everard ML. 1999. IL-8 and neutrophil elastase levels in the respiratory tract of infants with RSV bronchiolitis. *Eur Respir J*. 14:139-43.
214. Oh JW, Lee HB, Park IK, Kang JO. 2002. Interleukin-6, interleukin-8, interleukin-11, and interferon-gamma levels in nasopharyngeal aspirates from wheezing children with respiratory syncytial virus or influenza A virus infection. *Pediatr Allergy Immunol*. 13:350-6.
215. Teran LM, MC Seminario, JK Shute, A Papi, SJ Compton, JL Low, GJ Gleich y SL Johnston. 1999a. RANTES, Macrophage-Inhibitory Protein alpha, and the Eosinophil Product Major Basic Protein Are Released into Upper Respiratory Secretions during Virus-Induced Asthma Exacerbations in Children. *J Infect Dis* 179:677-681.
216. Teran LM, Mochizuki M, Bartels J, Valencia EL, Nakajima T, Hirai K, Schroder JM. 1999b. Th1- and Th2-type cytokines regulate the expression and production of eotaxin and RANTES by human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 20:777-86.
217. Teran LM. 1999. Chemokines and IL-5: major players of eosinophil recruitment in asthma. *Clin Exp Allergy*. 29:287-90.
218. Becker S, Soukup JM. 1999. Airway epithelial cell-induced activation of monocytes and eosinophils in respiratory syncytial viral infection. *Immunobiology* 201:88-106.
219. Noah TL, Becker S. 2000. Chemokines in nasal secretions of normal adults experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Clin Immunol* 97:43-9.
220. Hartl D, Krauss-Etschmann S, Koller B, Hordijk PL, Kuijpers TW, Hoffmann F, Hector A, Eber E, Marcos V, Bittmann I, Eickelberg O, Griese M, Roos D. 2008.

- Infiltrated neutrophils acquire novel chemokine receptor expression and chemokine responsiveness in chronic inflammatory lung diseases. *J Immunol.* 181:8053-67.
221. Jan MS, Huang YH, Shieh B, Teng RH, Yan YP, Lee YT, Liao KK, Li C. 2006. CC chemokines induce neutrophils to chemotaxis, degranulation, and alpha-defensin release. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 41:6-16.
222. Culley FJ, Pennycook AM, Tregoning JS, Hussell T, Openshaw PJ. 2006. Differential chemokine expression following respiratory virus infection reflects Th1- or Th2-biased immunopathology. *J Virol.* 80:4521-7.
223. Weitraub S, Dean DC. 1992. Interaction of a common factor with ATF, Sp1 or TATAA promoter elements is required for these sequences to mediate transcription by the adenoviral oncogene E1A. *Mol Cell Biol* 12:512-517.
224. Crump JW, Geist LJ, Auron PE, Webb AC, Stinski MF, Hunninghake GW. 1992. The immediate early genes of human cytomegalovirus require only proximal promoter elements to upregulate expression of interleukin-1beta. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6:674-677.
225. Zhu Z, Tang W, Ray A, Wu Y, Einarsson O, Landry ML, Gwaltney J Jr, Elias JA. 1996. Rhinovirus stimulation of interleukin-6 in vivo and in vitro. Evidence for nuclear factor kappa B-dependent transcriptional activation. *J Clin Invest* 97:421-30.
226. Newcomb DC, Sajjan US, Nagarkar DR, Goldsmith AM, Bentley JK, Hershenson MB. 2007. Cooperative effects of rhinovirus and TNF-alpha on airway epithelial cell chemokine expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 293:L1021-8.
227. Wuyts WA, Vanaudenaerde BM, Duupont LJ, Demedts MG, Verleden GM. 2003. Involvement of p38 MAPK, JNK, p42/p44 ERK and NF-kappaB in IL-1beta-induced chemokine release in human airway smooth muscle cells. *Respir Med* 97:811-7.
228. Grassl GA, Fessele S, Merfort I, Lindenmeyer MT, Castro V, Murillo R, Nelson PJ, Autenrieth IB. 2005. Sesquiterpene lactones inhibit *Yersinia* invasion protein-induced IL-8 and MCP-1 production in epithelial cells. *Int J Med Microbiol* 295:531-8.
229. Cullen JP, Sayeed S, Jin Y, Theodorakis NG, Sitzmann JV, Cahill PA, Redmond EM. 2005. Ethanol inhibits monocyte chemotactic protein-1 expression in interleukin-1(beta)-activated human endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H1669-75.
230. Rollins BJ. 1997. Chemokines. *Blood* 90:909-28.



# Role of monocyte chemotactic protein-3 and -4 in children with virus exacerbation of asthma

J. Santiago<sup>\*,#,\*†</sup>, J.L. Hernández-Cruz<sup>\*</sup>, M.E. Manjarrez-Zavala<sup>\*</sup>, R. Montes-Vizuet<sup>\*</sup>, D.P. Rosete-Olvera<sup>\*</sup>, A.M. Tapia-Díaz<sup>\*</sup>, H. Zepeda-Peney<sup>\*</sup> and L.M. Terán<sup>\*,†</sup>

**ABSTRACT:** Macrophages play a crucial role in respiratory viral infections. However, the mechanisms by which these cells are recruited locally are not fully understood. The current authors studied the role of the chemokines monocyte chemotactic protein (MCP)-1, -2, -3 and -4 on monocyte/macrophage recruitment during respiratory viral infections. Levels of these chemokines were investigated in nasal aspirates from 6–12-yr-old children suffering from respiratory viral infections, caused by rhinoviruses, influenza viruses, parainfluenza viruses, adenoviruses and respiratory syncytial virus.

MCP-3 and -4 were significantly higher in samples derived from virus-infected children compared with samples from the same children when they had been asymptomatic. Concentrations of both chemokines were found to significantly correlate with the number of recruited nasal macrophages. Chemotaxis assays showed that purified MCP-3 and -4 from nasal aspirates showed biological activity *in vitro*. There were no significant differences in MCP-1 and -2 levels between both groups.

The present data indicates that monocyte chemotactic protein-3 and -4 may have an important role in macrophage recruitment in children with proven upper respiratory viral infections. These chemokines could be potential targets for therapeutic intervention in respiratory viral infections.

**KEYWORDS:** Macrophages, monocyte chemotactic protein-1, -2, -3 and -4, upper respiratory infections, viral infections

Viral infections are the major cause of the common cold and are recognised as a major health problem worldwide, particularly because a significant number of patients develop rhinosinusitis and/or asthma. Monocytes play important roles in respiratory viral infections [1]. For example, during infectious inflammatory processes, these cells migrate from the bloodstream into nasal tissue, where they mature into either macrophages or dendritic cells. In contrast to dendritic cells that transfer information from the periphery to the regional lymph nodes, tissue macrophages appear to exert their function *in situ*. These highly phagocytic cells play important roles in innate immunity by engulfing infectious agents and killing them through the action of the lysosomes. They also constitutively express major histocompatibility complex class II molecules and are thus able to instruct the adaptive immune system by presenting pathogen-derived peptides to local T-cells. In the case of viral infections, macrophages play crucial roles in virion phagocytosis and destruction, antigen presentation and cytokine production.

Studies conducted in mice have shown that under steady-state conditions about half of the circulating monocytes leave the bloodstream each day [2]. However, in mice responding to inflammatory challenge, the number of monocytes leaving the circulation per day is at least doubled. The half-life of circulating monocytes in humans is about three times longer than in mice, but the 1,000-fold greater monocyte mass in humans means that ~340 million monocytes leave the circulation each day [2]. Monocyte recruitment into the airways involves a series of events including adhesion to endothelial cells, transendothelial migration and subsequent chemotactic movement. These processes are regulated by the local release of inflammatory mediators and cytokines [3]. The monocyte chemotactic proteins (MCP)-1, -2, -3 and -4 have assumed particular significance in relation to these processes. The MCPs are members of the CC chemokine family and share 51–78% amino acid homology. The four MCPs activate monocytes *via* the CC chemokine receptor (CCR)2. MCP-3

## AFFILIATIONS

<sup>\*</sup>National Institute of Respiratory Diseases,  
<sup>#</sup>Postgraduate Programme of Biological Sciences, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City,  
<sup>†</sup>Biomedicine in the Postgenomic Era, A.C., Mexico.

## CORRESPONDENCE

L.M. Terán  
National Institute of Respiratory Diseases  
Calz. de Tlalpan 4502  
Sección XVI  
14080  
México  
Fax: 55 56655700  
E-mail: linteran@iner.gob.mx

## Received:

July 09 2007

Accepted after revision:

June 09 2008

## SUPPORT STATEMENT

The present study was supported by the grant 45172, from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; Benito Juárez CP, Mexico).

## STATEMENT OF INTEREST

None declared.

European Respiratory Journal  
Print ISSN 0903-1936  
Online ISSN 1399-3003

and -4 additionally activate both CCR1 and CCR3, while MCP-2 activates CCR5 [4].

Naturally occurring common colds have been proved to be an excellent model for the investigation of inflammatory mechanisms in upper viral respiratory disease. Using this model the present authors have previously shown that interleukin (IL)-8, RANTES and macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$  are released in the nasal secretions from children suffering naturally from upper respiratory viral infection, suggesting that they may be important in the recruitment of neutrophils and eosinophils, respectively [5, 6]. However, no studies have been carried out investigating the possible role of MCPs in naturally occurring colds. MCP-1, -2, -3 and -4 are also known as CC chemokine ligand (CCL)2, 8, 7 and 13, respectively.

## METHODS

### Participants

Between October 1999 and September 2001, 51 volunteers were recruited from 125 children on asthma registers kept in the National Institute of Respiratory Diseases (Mexico City, Mexico) from a longitudinal study on virus respiratory infection and asthma conducted in the school "Tizoc" Xochimilco, Mexico City, Mexico. A letter was sent to the parents of each child informing them of the study and inviting their children to participate. Every child was allocated a number, randomly. Most (95%) children had a history of wheeze or cough in the 12 months before the study. The hospital's ethics committee approved the study. Written and verbal consent was obtained from parents and children.

### Procedures

At study entry, participants' height and peak expiratory flow (PEF) rates were recorded. The children were shown the nasal aspirate sampling technique that would be used during the study.

Participants used a diary card to record the peak flow rates. Their atopic status was determined by skin-prick testing with different allergens (*Dermatophagoides pteronissinus* and *D. farinae*, mixed grass, tree pollens, cat and dog dander and cockroach). They also recorded subjective assessments of respiratory symptoms as follows: 0: absent; 1: mild; 2: moderate; and 3: severe. Upper respiratory tract symptoms were: runny nose, sneezing, blocked nose, sore throat, hoarse voice, headaches, aches or pains elsewhere, feeling a chill, fever, or shivers. Lower respiratory tract symptoms were: cough during the day, wheeze during the day, shortness of breath during the day, night cough, and wheeze or shortness of breath during the night. Scores were added to give daily upper and lower respiratory tract scores. When the upper respiratory tract score was  $\geq 1$ , a nasal aspirate was taken from the child, which was tested for the presence of a viral infection. Nasal aspirates were collected from the child within the first 18 h (range 12–24 h) of the outbreak of respiratory symptoms. The nasal aspirate was homogenised in nine volumes of virus transport medium and centrifuged at  $2,500 \times g$  for 10 min at 10°C. Supernatant was recovered and used for cytokine detection; the cell pellet was used to study the nasal recruited cells. Similar samples were obtained when the same children had been asymptomatic for  $\geq 2$  weeks.

An upper respiratory tract infection was diagnosed when a participant reported a cold and infection was detected as

described in virus detection methods. The start of infection was determined using plots of all recorded upper respiratory tract symptoms. Severity was assessed by the change in mean lower respiratory tract symptoms or PEF measurements (largest drop from the median expiratory flow rate) from the week before to the week after the start of infection.

### Virus detection methods

Detection of rhinovirus (RV)-39 (RV-39) was performed by RT-PCR as previously described [5]. Briefly, RNA was purified from 500  $\mu$ L of the original nasal sample with Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and reverse transcribed using Superscript<sup>®</sup> enzyme (Invitrogen) and oligo(dT) primer (Invitrogen). PCR was performed with Expand enzyme (Roche, Indianapolis, IN, USA). The oligonucleotide primer sequences were: sense 5'GCACTTCTGTTTCCCC3' and antisense 5'CGGACACCCAAAGTAG3', which generated a product size of 380 bp. Samples from all reported episodes and all asymptomatic samples were analysed in duplicate.

Detection of other respiratory viruses (adenovirus, parainfluenza virus, influenza virus type A, influenza virus type B and respiratory syncytial virus (RSV)) was performed by cell culture in cell lines including Vero, HEP-2 and Madin-Darby canine kidney cell monolayers. When cytopathic effects were extensive, detached cells were analysed using an immunofluorescence kit (3105; Chemicon, Temecula, CA, USA) [7].

### Differential cell counts

Nasal cells obtained from nasal aspirate were resuspended in PBS ( $10^6$  cells·mL<sup>-1</sup>). A 50- $\mu$ L aliquot of cells was subjected to cyto centrifugation (Wescor 7620; Wescor, Logan, UT, USA), air-dried and stained with a Diff-Quick Stain kit (Dade Behring, Newark, DE, USA). In total, 400 cells per cytospin were counted.

### ELISA for detection of MCPs

Concentrations of MCP-1, -2, -3 and -4 in nasal aspirates were measured using specific sandwich ELISAs as previously described [8]. Briefly, a pair of highly specific antibodies for each chemokine was purchased (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and an ELISA developed following the manufacturer's protocol. Measurements of MCP-3 and -4 were performed in neat (nonconcentrated) nasal aspirates while MCP-1 and -2 were measured in two-fold concentrated nasal aspirates, as these chemokines were not detected in neat samples. The lower limit of detection for all the MCP was 7 pg·mL<sup>-1</sup>.

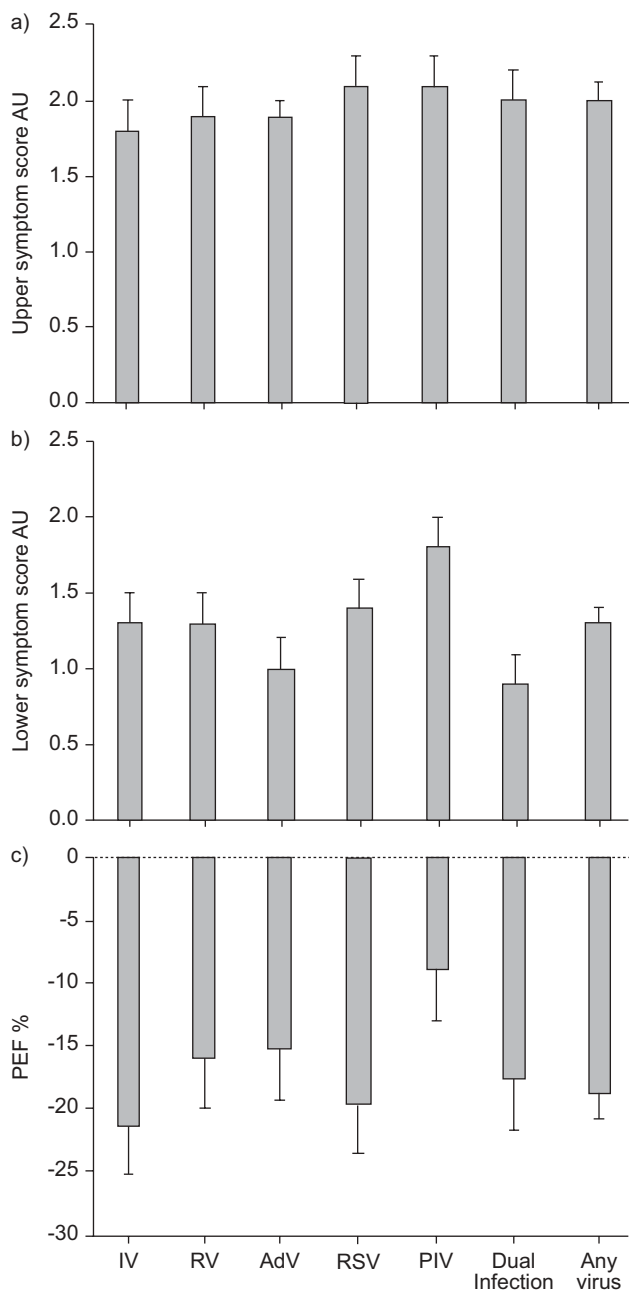
### Partial purification of MCP-3 and -4 from nasal aspirates

Pooled nasal aspirates (30 mL) from 20 children with proven viral acute respiratory infections were applied to a HiTrap<sup>®</sup> column (Amersham, London, UK) coated with specific antibodies to MCP-3 and -4 (Chemicon). Bound MCP-3 and -4 were eluted, freeze-dried and redissolved in 1 mL of PBS, before applying onto a RP-8 reverse-phase column in an HP 1100 HPLC system (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Eluted fractions were freeze-dried, redissolved in 0.1% bovine serum albumin, and subsequently assayed for monocyte chemotaxis.

### Chemotaxis assays

Chemotaxis assays were performed in a microchamber (protocol AC482: Neuro Probe, Gaithersburg, MD, USA) using



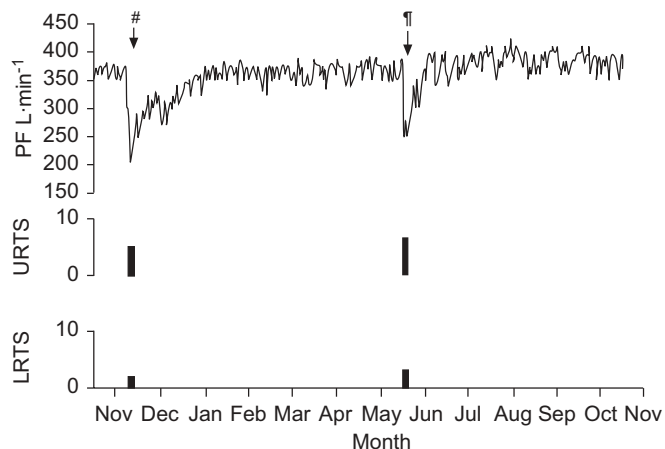


**FIGURE 1.** Mean change in a) upper and b) lower respiratory tract symptom scores and c) peak expiratory flow (PEF) rates in children during viral infection compared with children without viral infection. AU: arbitrary units; IV: influenza virus; RV: rhinovirus; Adv: adenovirus; RSV: respiratory syncytial virus; PIV: parainfluenza virus.

polycarbonate filters (5 µm; Poretics®; Osmonics, Inc., Minnetonka, MN, USA) and human monocytes (10<sup>6</sup> cells·mL<sup>-1</sup>). Chamber was incubated for 90 min at 37°C. Filter was removed, fixed and stained with Giemsa solution. Monocytes per five microscopic fields were counted at a 200 × magnification.

**Statistical analysis**

The clinical data generated from the current study were coded and entered on to a database. The duration of an episode was



**FIGURE 2.** Chart showing virus identification, peak flow (PF), and respiratory symptom scores (■) for a studied child. Samples were taken where indicated (arrows). LRTS: lower respiratory tract symptoms; URTS: upper respiratory tract symptoms. #: influenza A virus; †: rhinovirus.

taken as the time from the initial fall in PEF and/or rises in symptoms to the day when they returned to the median value. Additionally, the infection was further confirmed as described in virus detection methods. The Mann–Whitney U-test was used to compare continuous data between subgroups. Different episodes in the same child were treated as independent. MCP levels were analysed by Kruskal–Wallis test. A p-value <0.05 was regarded as statistically significant. Correlations between chemokine levels and cell counts were analysed using Spearman’s rank sum testing.

**RESULTS**

From the 125 asthmatic children, 51 expressed an interest in participating in the study. The remaining 74 did not wish to participate. Reasons for declining participation included unwillingness to take part in a time-consuming study, domestic difficulties, emigration and the possibility that the project would interfere with school work.

Three children had outgrown their asthma, as reported by their parents. Thus, they were excluded from the study. The present study cohort included 18 males and 30 females (mean (range) age 10.15 (8.2–12.4) yrs). In total, 36 (75%) children were atopic. Mean follow-up was 70 weeks (from November 1999 to June 2001, excluding the summer recess between July and August 2000). The mean (range) forced expiratory volume in one second (FEV<sub>1</sub>) at entry was 1.92 (1.1–2.63) L with a mean FEV<sub>1</sub>% predicted of 76 (50–120)% pred. A total of 15 children took bronchodilators regularly and 19 as required; 10 took prophylactic inhaled steroids. The median (range) baseline PEF was 342 (170–572) L·min<sup>-1</sup>.

There were a total of 89 reported cases of acute respiratory infections from the remaining 48 Mexican children: rhinovirus was detected in 24 (26.97%), influenza A virus in 11 (12.36%), adenoviruses in 11 (12.36%), influenza B in eight (8.99%), RSV in eight (8.99%), parainfluenza virus type 2 in seven (7.87%), parainfluenza virus type 3 in six (6.74%), parainfluenza virus type 1 in three (3.37%), and 11 (12.36%) of dual infection.

**TABLE 1** Differential and total cell counts in nasal aspirate fluids from children with proven viral respiratory infection or asymptomatic

Cells	Asymptomatic <sup>#</sup>	Symptomatic <sup>†</sup>
Neutrophils	11 (4–25)	2350*** (35–12600)
Macrophages	1.5 (0.8–6)	148*** (0–2280)
Lymphocytes	1.2 (0.6–8.0)	188*** (0–1860)
Eosinophils	0.08 (0–1.20)	12 (0–108)
Epithelial	10.5 (5–17)	24*** (0–476)
Total	24 (6–29)	2600*** (40–13800)

Data are presented as median (range)  $\times 10^3$ . #: n=51; †: n=72; \*\*\*: p<0.001 compared with asymptomatic (Kruskal–Wallis test).

Children developed a mean  $\pm$ SD  $1.97 \pm 0.169$  respiratory viral infections over the study period.

Median (range) lower respiratory-tract scores in the week before and after infection were 0.3 (0–2) and 1.9 (0–8), respectively. Inspection of the charts for each child showed that viral infections were associated with sudden severe falls in PEF, followed by recovery to baseline again over the following 2–3 weeks (fig. 1). Median (range) PEF rates in the weeks before and after infection were  $310$  ( $108$ – $458$ )  $L \cdot \text{min}^{-1}$  and  $259$  ( $48$ – $420$ )  $L \cdot \text{min}^{-1}$ , respectively.

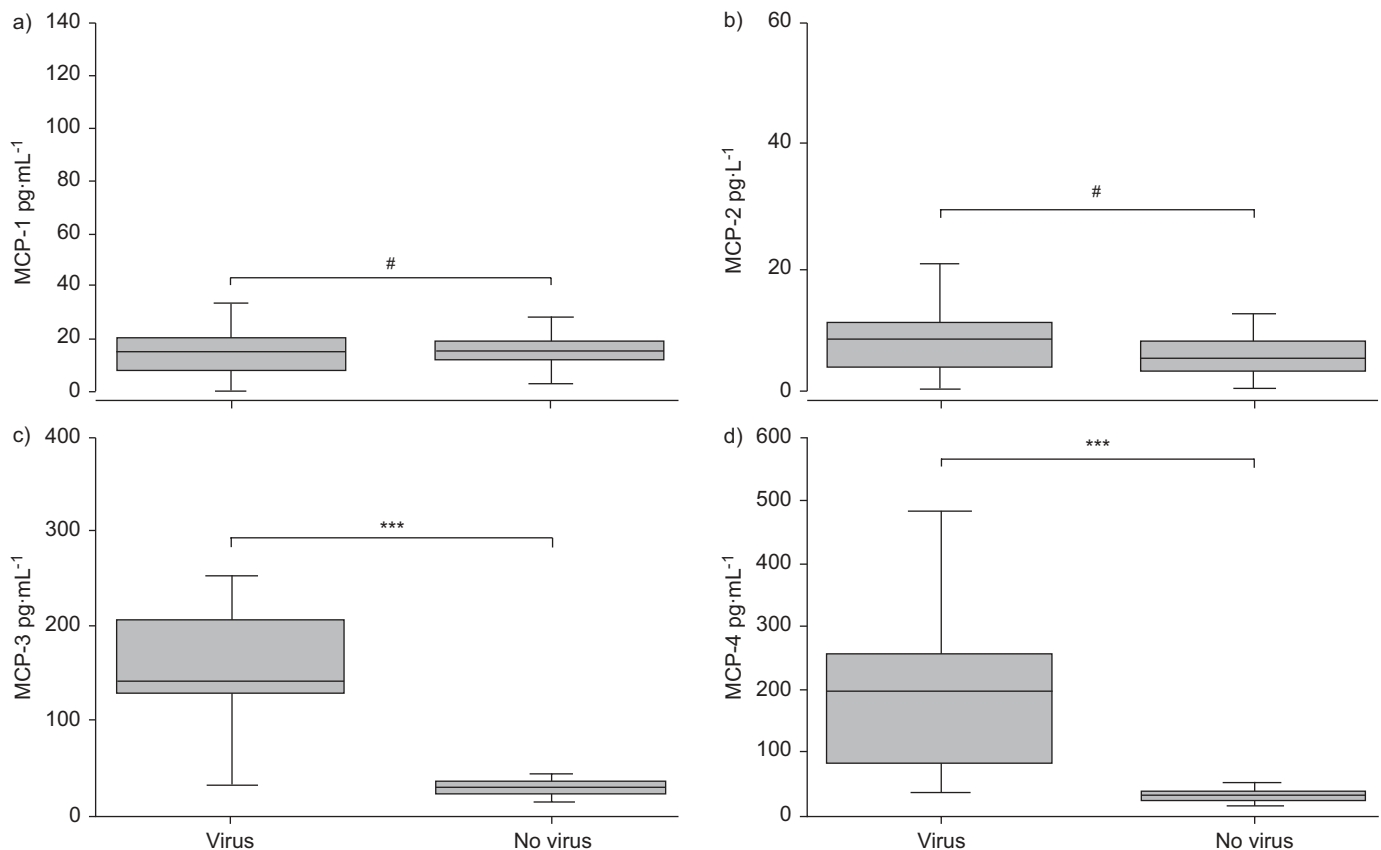
The severity of lower respiratory tract symptoms was increased and PEF measurements dropped with all respiratory virus types. The relationship of lower respiratory tract scores was significant for all virus types (fig. 1d). Peak flows dropped on average by  $16.22 \pm 1.80\%$  ( $55.56 \pm 5.7 L \cdot \text{min}^{-1}$ ) during viral episodes. Figure 2 shows respiratory symptoms, peak flow recordings and viruses isolated for one child.

### Cell counts

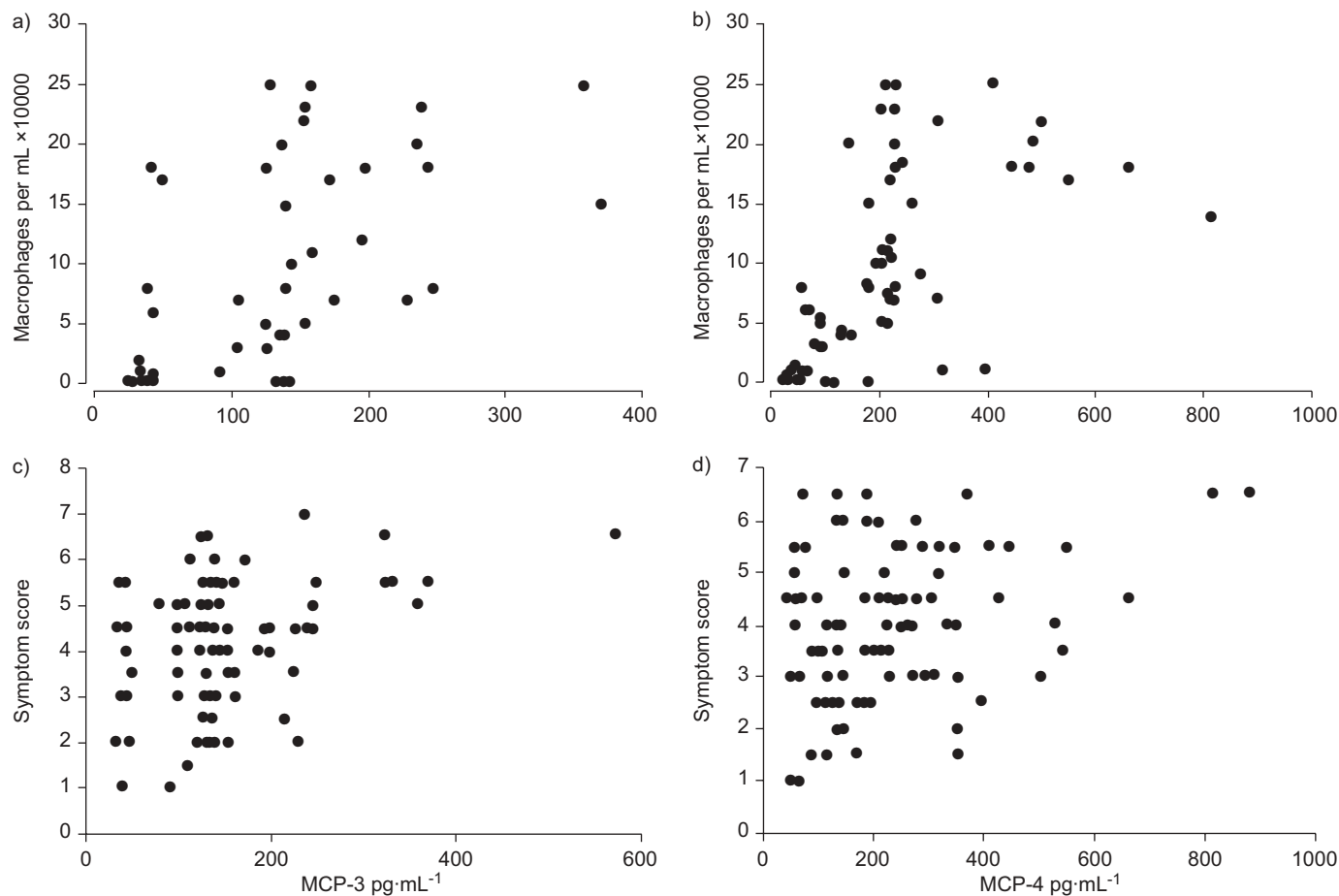
The total numbers of cells recorded during a symptomatic period were nearly 100-fold higher when compared with the asymptomatic period; median (range) values were  $2,600$  ( $40$ – $13,800$ )  $\times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$  and  $24$  ( $6$ – $29$ )  $\times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively. All cell types were found to be increased in the symptomatic group (neutrophils, 200-fold; macrophages, 100-fold; and lymphocytes, 150-fold; table 1) compared with the asymptomatic group; differences were statistically significant (p<0.001). Eosinophils were seen in very few samples and there was no significant difference between the two groups.

### Measurements of MCPs in nasal secretions

Measurements of MCPs by ELISA showed no changes in levels of both MCP-1 ( $22.9 \pm 6.1$  versus  $16.4 \pm 1.3 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) and MCP-2 ( $11.85 \pm 4.1$  versus  $7.2 \pm 1.2 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) in nasal aspirates from children with naturally occurring acute respiratory infections as compared with samples from the same children when they had been asymptomatic (fig. 3a and b). In contrast, MCP-3 and -4 were increased in nasal aspirates from children with acute



**FIGURE 3.** Monocyte chemoattractant protein (MCP) levels in nasal aspirates from 81 children with proven viral respiratory infections compared with 51 children without viral infections. #: nonsignificant; \*\*\*: p<0.001.



**FIGURE 4.** Correlations between macrophage numbers and monocyte chemoattractant protein (MCP)-3 (a) and -4 (b) levels in nasal aspirate samples for children with proven viral respiratory infection. a)  $r=0.654$ ,  $p=0.003$ ; b)  $r=0.648$ ,  $p=0.003$ . Correlation between upper respiratory symptoms and MCP-3 (c) and -4 (d) levels. c)  $r=0.231$ ,  $p=0.069$ ; d)  $r=0.204$ ,  $p=0.058$ . Statistical analysis was performed using Spearman's rank sum test.

respiratory infections compared with the control samples (MCP-3:  $185.0 \pm 17.1$  versus  $32.0 \pm 0.78$   $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; MCP-4:  $243.2 \pm 18.67$  versus  $33.8 \pm 1.56$   $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; fig. 3c and d;  $p < 0.001$ ). All respiratory viruses, including RV, influenza virus, parainfluenza virus and RSV induced comparable concentrations of MCP-3 and -4 in nasal secretions (data not shown).

In order to investigate the relationship between macrophage influx and MCPs, correlations between macrophage counts and MCP-3 and -4 levels were sought. Levels of either MCP-3 or -4 correlated with macrophage numbers recruited in nasal samples from children with respiratory viral infections ( $r=0.654$ ;  $p=0.003$ ; and  $r=0.648$ ;  $p=0.003$ , respectively; fig. 4a and b). Moreover, levels of both chemokines showed a trend towards a significant correlation with upper respiratory symptoms ( $r=0.231$ ;  $p=0.069$ ; and  $r=0.204$ ;  $p=0.058$ , respectively).

#### Biochemical and biological characterisation of MCP-3 and -4 from nasal aspirate samples

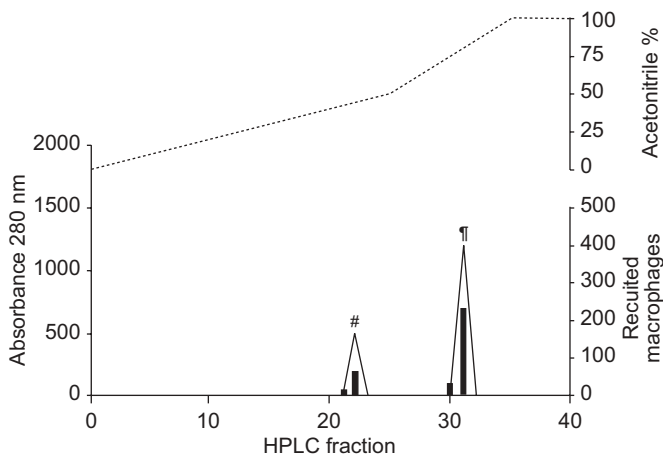
Having demonstrated increased MCP-3 and -4 immunoreactivities associated with upper respiratory infections, the present authors then investigated whether these chemokines were biologically active *in vitro*. Thus, 1.5 mL of nasal aspirates from each one of 20 reported acute respiratory infection

episodes were combined and MCP-3 and -4 were purified by specific anti-MCP affinity chromatography and reverse phase HPLC. Figure 5 shows that monocyte chemotactic activities resolved as two peaks at 22 and 31 min. It was demonstrated by ELISAs that peak one corresponded to MCP-3, while peak two corresponded to MCP-4 (105 and 301  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively).

#### DISCUSSION

The present study is the first demonstrating that children suffering from naturally occurring viral infection release high concentrations of MCP-3 and -4 into the nasal secretions. Levels of both chemokines showed a significant correlation with macrophage numbers, suggesting that they may contribute to their recruitment *in vivo*. Indeed, partial purification of MCP-3 and -4 by HPLC and affinity chromatography showed that they are biologically active on monocytes in chemotaxis assays. In contrast, concentrations of MCP-1 and -2 were not significantly different between virus infected and noninfected children.

MCP-1 to -4 are potent monocyte/macrophage attractants and show 58–71% homology. Among all MCPs, MCP-1 is the only cytokine that has been studied in viral respiratory infection. For example, BECKER and SOUKUP [9] reported that RSV



**FIGURE 5.** Monocyte chemotactic activities in nasal aspirate using HPLC. Material eluted from the anti-monocyte chemotactic protein (MCP)-3 and -4 affinity column was applied to a reverse-phase chromatograph, and bound material was washed from the column using two-step linear gradient of acetonitrile (· · · ·) over a 40-min period. Monocyte chemotaxis to individual fractions is given as the number of monocytes chemoattracted per area (■). Two monocyte chemotactic activities were identified, which eluted at 22 min and 31 min, respectively. By ELISA they were found to correspond to MCP-3 (#) and -4 (\*), respectively.

stimulated the release of MCP-1 from monocytes co-cultured with airway epithelial cells *in vitro*, while NOAH and BECKER [10] have shown that experimentally induced RSV infection in volunteers stimulates MCP-1 production in their upper airways. However, none of MCPs has been investigated in naturally occurring viral respiratory infections.

The present study has demonstrated that naturally occurring upper respiratory viral tract infections induce the release of the chemokines MCP-3 and -4 into the airways of 8–12-yr-old children. Interestingly, concentrations of both chemokines correlated with the macrophage numbers, suggesting that they may be involved in the recruitment of these cells. Indeed, the present finding that nasal MCP-3 and -4 induces monocyte migration *in vitro* further supports this hypothesis. To the current authors' knowledge, these are the first data indicating that MCP-3 and -4 may be involved in the pathogenesis of respiratory viral infections.

While MCP production occurs in the context of virus infection, the mechanisms underlying this event are not well understood. Some respiratory viruses, such as adenovirus and cytomegalovirus, have been shown to have transactivating factors capable of increasing the expression and synthesis of cytokines relevant to asthma in monocytes/macrophages and lymphocyte cell lines [11, 12]. RV-39 are also capable of activating cytokine promoters (IL-6), acting chiefly *via* nuclear factor (NF)- $\kappa$ B [13]. In the MCP genes there are several potential binding sites for transcription factors, including activator protein-1 and NF- $\kappa$ B [14–16]. Indeed, it has been shown that blocking NF- $\kappa$ B, using pyrrolidine dithiocarbamate, reduces MCP-3 production. [14]. The precise mechanisms by which viruses induce MCP-3 and -4 synthesis during naturally occurring colds have yet to be determined.

In contrast to the former chemokines, neither MCP-1 nor MCP-2 were elevated during naturally occurring colds (neither in neat nor in concentrated nasal aspirates). In a previous report, NOAH and BECKER [10] have shown increased levels of MCP-1 in nasal washings derived from RSV experimentally infected subjects. In the present study, levels of MCP-1 were raised significantly in nasal washings 6 days after inoculation with RSV, peaking at 7 days. A similar profile of MCP-1 release has been reported by POWER *et al.* [17] in an animal study which was conducted in mice exposed to phormalin-inactivated RSV. In the latter study, mice were sacrificed 5 and 7 days after inactivated-RSV inoculation. Consistent with the study by NOAH and BECKER [10], POWER *et al.* [17] showed that MCP-1 was upregulated on day 7 but not on day 5, while MCP-3 was highly upregulated at day 5, which suggests that the MCPs may have different kinetics of release. In the present study, nasal secretions in children were taken during early phases of the virus infection (12–24 h of developing clinical symptoms), which may explain the low levels of MCP-1 found in nasal secretions. Thus, future studies must investigate the kinetics of release of the MCPs in naturally occurring colds.

Because in previous studies the current authors' group and others have reported that the monocytes/macrophage attractants RANTES/CCL5 and MIP-1 $\alpha$ /CCL3 are released into the upper airways of patients suffering naturally occurring colds [6, 18], these chemokines were not investigated in the present study. Instead, it focused on the MCPs that have not been previously investigated. Thus, MCP-3 and -4, together with RANTES and MIP-1 $\alpha$ , may orchestrate monocyte/macrophage recruitment into the upper airways of patients suffering from viral infection.

The four MCPs activate monocytes *via* CCR2, which is a major receptor expressed in both monocytes and macrophages [19]. Thus, it may not be relevant that MCP-1 and -2 were not increased, as both MCP-3 and -4, will activate these cells through CCR2. These two chemokines also activate eosinophils *via* CCR3. However, in the present study there was no difference in eosinophil numbers between the two groups. A previous study has shown that CCR2<sup>-/-</sup> mice are protected from early pathological manifestation of influenza infection because of defective monocyte/macrophage recruitment [20]. Thus, it is tempting to hypothesise that the use of CCR2 antagonists may have therapeutic effects. It is now well established that respiratory viruses cause exacerbations of asthma and, consistent with this observation, the present authors found that virus-infected children showed a significant drop in peak flow. The development of CCR2 antagonists that could be used in clinical trials will define the role of these chemokines on common cold and virus exacerbations of asthma.

In summary, the present study has demonstrated that the monocyte chemotactic protein-3 and -4 chemokines are found in increased concentrations in nasal secretions of children suffering from respiratory viral infections. Levels of these chemokines correlated with macrophage numbers and these cytokines, when purified from clinical samples, showed biological activity *in vitro*, suggesting that they may be involved in the activation and migration of monocyte/macrophages. The development of clinical efficient CC chemokine receptor 2 antagonists that neutralise monocyte chemotactic protein-3 and -4 may have

therapeutic effects on common cold and virus exacerbations of asthma.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to C. Arias (Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca, Mexico) and A. Pardo (Facultad de Ciencias UNAM, Mexico City, Mexico) for advice on the experimental design of the study; to E. Valencia-Maqueda and A. Vega-Miranda (INER, Mexico City, Mexico) for technical assistance; and F. Fuentes-Arenas (INER) for sample collection.

#### REFERENCES

- 1 Message SD, Johnston SL. The immunology of virus infection in asthma. *Eur Respir J* 2001; 18: 1013–1025.
- 2 Muller WA. New mechanisms and pathways for monocyte recruitment. *J Exp Med* 2001; 194: F47–F51.
- 3 Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 2005; 12: 1182–1190.
- 4 Sozzani S, Zhou D, Locati M, *et al.* Receptors and transduction pathways for monocyte chemotactic protein-2 and monocyte chemotactic protein-3 similarities and differences with MCP-1. *J Immunol* 1994; 152: 3615–3622.
- 5 Teran LM, Johnston SL, Schröder J, Church MK, Holgate ST. Role of nasal interleukin-8 in neutrophil recruitment and activation in children with virus-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1362–1366.
- 6 Teran LM, Seminario MC, Shute JK, *et al.* RANTES, macrophage-inhibitory protein-1 $\alpha$ , and the eosinophil product major basic protein are released into upper respiratory secretions during virus-induced asthma exacerbations in children. *J Infect Dis* 1999; 179: 677–681.
- 7 Manjarrez ME, Rosete DP, Rincón M, Villalba J, Cravioto A, Cabrera R. Comparative viral frequency in Mexican children under 5 years of age with and without upper respiratory symptoms. *J Med Microbiol* 2003; 52: 579–583.
- 8 Rojas-Ramos E, Avalos AF, Perez-Fernandez L, Cuevas-Schacht F, Valencia-Maqueda E, Teran LM. Role of the chemokines RANTES, monocyte chemotactic proteins-3 and -4, and eotaxins-1 and -2 in childhood asthma. *Eur Respir J* 2003; 22: 310–316.
- 9 Becker S, Soukup JM. Airway epithelial cell-induced activation of monocytes and eosinophils in respiratory syncytial viral infection. *Immunobiology* 1999; 201: 88–106.
- 10 Noah TL, Becker S. Chemokines in nasal secretions of normal adults experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Clin Immunol* 2000; 97: 43–49.
- 11 Weitraub S, Dean DC. Interaction of a common factor with ATF, Sp1 or TATAA promoter elements is required for these sequences to mediate transcription by the adenoviral oncogene E1A. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 512–517.
- 12 Crump JW, Geist LJ, Auron PE, Webb AC, Stinski MF, Hunninghake GW. The immediate early genes of human cytomegalovirus require only proximal promoter elements to upregulate expression of interleukin-1 $\beta$ . *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6: 674–677.
- 13 Zhu Z, Tang W, Ray A, *et al.* Rhinovirus stimulation of interleukin-6 *in vivo* and *in vitro*. Evidence for nuclear factor  $\kappa$ B-dependent transcriptional activation. *J Clin Invest* 1996; 97: 421–430.
- 14 Wuyts WA, Vanaudenaerde BM, Duupont LJ, Demedts MG, Verleden GM. Involvement of p38 MAPK, JNK, p42/p44 ERK and NF- $\kappa$ B in IL-1 $\beta$ -induced chemokine release in human airway smooth muscle cells. *Respir Med* 2003; 97: 811–817.
- 15 Grassl GA, Fessele S, Merfort I, *et al.* Sesquiterpene lactones inhibit Yersinia invasion protein-induced IL-8 and MCP-1 production in epithelial cells. *Int J Med Microbiol* 2005; 295: 531–538.
- 16 Cullen JP, Sayeed S, Jin Y, *et al.* Ethanol inhibits monocyte chemotactic protein-1 expression in interleukin-1 $\beta$ -activated human endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H1669–H1675.
- 17 Power UF, Huss T, Michaud V, Plotnicky-Gilquin H, Bonnefoy JY, Nguyen TN. Differential histopathology and chemokine gene expression in lung tissues following respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV- or BGG2Na-immunized mice. *J Virol* 2001; 75: 12421–12430.
- 18 Bonville CA, Rosenberg HF, Domachowske JB. Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  and RANTES are present in nasal secretions during ongoing upper respiratory tract infection. *Pediatr Allergy Immunol* 1999; 10: 39–44.
- 19 Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997; 90: 909–928.
- 20 Dawson TC, Beck MA, Kuziel WA, Henderson F, Maeda N. Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus. *Am J Pathol* 2000; 156: 1951–1959.