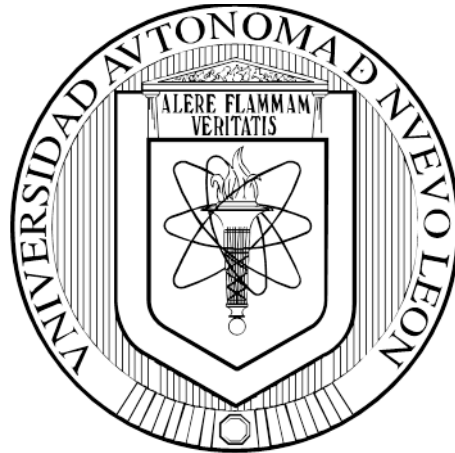


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO DE LA INFECCIÓN DEL RINOVIRUS HUMANO 1B Y LA CO-  
INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A H1N1 SOBRE LA  
POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS**

**POR**

**Q.B.C. JAUDIEL HUMBERTO SALADO GÁMEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOLOGÍA  
MÉDICA**

**DICIEMBRE, 2019**


**EFFECTO DE LA INFECCIÓN DEL RINOVIRUS HUMANO 1B Y LA CO-INFECCIÓN  
DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A H1N1 SOBRE LA POLARIZACIÓN DE  
MACRÓFAGOS**

**Aprobación de la Tesis:**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco**  
**Director de Tesis**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. C. Ernesto Torres López**  
**Co-director de Tesis**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. C. Mario César Salinas Carmona**  
**Miembro de la Comisión**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**  
**Subdirector de Estudios de Posgrado**

**EFFECTO DE LA INFECCIÓN DEL RINOVIRUS HUMANO 1B Y LA CO-INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A H1N1 SOBRE LA POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS**

Presentado por:

**Q.B.C. Jaudiel Humberto Salado Gámez**

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunología Molecular y Inmunovirología del Departamento y Servicio de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco y la co-dirección del Dr. C. Ernesto Torres López.

Director



Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco

Co-director



Dr. C. Ernesto Torres López.

Miembro de la Comisión



Dr. C. Mario César Salinas Carmona

## DEDICATORIA

A Dios por haberme dado la fuerza, sabiduría y valentía de enfrentar este gran reto en mi vida.

A mi Mamá, Hermanos y Papá por todo el apoyo, amor y confianza. A mi abuelita, siempre te recordare y te tendré en mi corazón.

A mis amigos Valeria y Ángel por su amistad, consejos y por cada momento que pasamos juntos en esta etapa tan importante de nuestras vidas.

A mis amigos Alex y Juanito, gracias por su amistad y todo su apoyo. A todos mis amigos de la generación, en especial a Marcos, Cuerna, David, Roberto, Trujillo.

A mis Amigos de Hermosillo, Javier, Rigo y Jorge que, aunque no estuvieron presentes, la distancia no fue obstáculo para mandarme siempre sus buenos deseos.

A mis amigos de Convivencia Familiar que siempre me tuvieron en sus oraciones.

## **AGRADECIMIENTO**

Al Dr. Adrián Rosas Taraco por permitirme trabajar en su laboratorio y por toda la confianza brindada durante todo este tiempo, además, por enseñarme que “en la vida todo debe ser ganar-ganar”, siempre estaré agradecido con usted. Al Dr. Ernesto Torres López por su apoyo y siempre compartirme de sus sabios consejos. Al Dr. Mario César Salinas por abrirme las puertas del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina, UANL.

A mis compañeros del laboratorio de Inmunología Molecular que fueron de gran ayuda para la realización de mis experimentos: Azalia, Armando y Kevin.

Al Servicio de Hematología de la UANL por permitirnos hacer uso de sus instalaciones y equipos.

Al Fondo de Investigación Básica SEP-CONACYT 2015 (No. 253330) por haber hecho posible la realización de este proyecto.

A CONACYT por la beca otorgada durante el programa de Maestría.

## RESUMEN


**Q.B.C. Jaudiel Humberto Salado Gámez**

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.

Título del estudio: **EFFECTO DE LA INFECCIÓN DEL RINOVIRUS HUMANO 1B Y LA CO-INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A H1N1 SOBRE LA POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS**

Números de páginas: 68

**Propósito y método de estudio:** El Rinovirus Humano y Virus de Influenza A son de los agentes etiológicos más frecuentes en causar infecciones respiratorias, además, se ha reportado como una de las co-infecciones virales más comunes. Los macrófagos desempeñan un rol muy importante en la respuesta inmune antiviral. Recientes estudios han demostrado que el estado de polarización de los macrófagos (M1 y M2) se ha relacionado con el control o establecimiento de infecciones virales. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la infección del Rinovirus Humano 1B y co-infección con el Virus de Influenza A H1N1 sobre la polarización de macrófagos en un modelo de infección *in vitro*. Macrófagos THP-1 fueron infectados y co-infectados con el RV1B y/o VIA H1N1 (A/Virginia/ATCC1/2009) utilizando una MOI de 1 para cada virus. Las células fueron recuperadas para determinar los niveles intracelulares de citocinas relacionados con macrófagos M1 (TNF $\alpha$ ), M2a (IL-4) y M2c (IL-10) por citometría de flujo, así como, para la determinación de la carga viral de ambos virus utilizando qRT-PCR. Además, se utilizó ELISA tipo sándwich para medir los niveles de TNF $\alpha$  en los sobrenadantes. **Contribuciones y conclusiones:** Rinovirus Humano 1B induce la polarización de los macrófagos a M1 en la etapa temprana de la infección y a M2 en la etapa tardía, sin embargo, se establece la co-infección del Virus de la Influenza A H1N1.



---

**Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco**

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Infecciones respiratorias virales.....	1
1.1.1. Epidemiología de las infecciones respiratorias virales.....	2
1.1.2. Rinovirus humano.....	3
1.1.3. Virus de la Influenza A.....	5
1.2. Respuesta inmune antiviral.....	7
1.3. Macrófagos.....	9
1.3.1. Generalidades.....	9
1.3.2. Polarización de macrófagos.....	11
1.3.3. Macrófagos M1 y M2.....	12
ANTECEDENTES.....	14
JUSTIFICACIÓN.....	17
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
7.1 Partículas virales.....	21
7.2. Manejo y propagación de la línea celular THP-1.....	21
7.3. Desarrollo del modelo de diferenciación de macrófagos THP-1.....	22
7.3.1. Morfología y prueba de fagocitosis.....	23
7.3.2. Viabilidad celular.....	24
7.4. Modelo de monoinfección y co-infección viral.....	24
7.4.1. Determinación de la carga viral.....	25
7.4.2. Inmunofenotipo de macrófagos.....	28

7.4.3. Cuantificación de los niveles de TNF $\alpha$ en macrófagos.....	30
7.5. Análisis estadístico.....	32
RESULTADOS.....	33
8.1. Desarrollo del modelo de diferenciación en la línea THP-1.....	33
8.2. Establecimiento del modelo de monoinfección y co-infección viral.....	37
8.3. Efecto en la polarización de macrófagos.....	40
DISCUSIÓN.....	50
9.1. Modelo de diferenciación celular.....	50
9.2. Modelos de monoinfección y co-infección: RVh y VIA.....	52
9.3. Efecto de la monoinfección y co-infección con RVh y VIA en la polarización de M $\Phi$ .....	55
CONCLUSIÓN.....	59
PERSPECTIVAS A FUTURO.....	60
REFERENCIAS.....	61
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	68

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Organización genómica y estructura de la partícula viral RVh.....	4
<b>Figura 2.</b> Organización genómica y estructura de la partícula viral VIA.....	6
<b>Figura 3.</b> Modelo de diferenciación celular.....	23
<b>Figura 4.</b> Línea celular monocítica THP-1 (ATCC TIB 202) .....	33
<b>Figura 5.</b> Morfología de MΦ THP-1 diferenciados con PMA.....	34
<b>Figura 6.</b> Capacidad fagocítica de MΦ THP-1 diferenciados con PMA.....	35
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de viabilidad celular de MΦ THP-1 diferenciados con PMA.....	36
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de células TNFα+, IL-4+, IL-10+ e IL-4+/IL-10+ en MΦ diferenciados con 20 nM de PMA.....	37
<b>Figura 9.</b> Curva estándar empleando el control positivo para el RVh.....	38
<b>Figura 10.</b> Curva estándar empleando el control positivo para el VIA.....	38
<b>Figura 11.</b> Cuantificación del número de copias de ARN/μL del RVh por qRT-PCR.....	39
<b>Figura 12.</b> Cuantificación del número de copias de ARN/μL del VIA por qRT-PCR.....	40
<b>Figura 13.</b> Análisis de la expresión de TNFα en MΦ mono infectados y co-infectados con RVh y VIA por citometría de flujo.....	42
<b>Figura 14.</b> Expresión de TNFα en MΦ mono infectados y co-infectados con RVh y VIA.....	43

<b>Figura 15.</b> Producción de TNF $\alpha$ en M $\Phi$ mono infectados y co-infectados con RV y VIA.....	44
<b>Figura 16.</b> Análisis de la expresión de IL-4, IL-10 e IL-4/IL-10 en M $\Phi$ mono infectados y co-infectados con RVh y VIA por citometría de flujo.....	46
<b>Figura 17.</b> Expresión de IL-4 en M $\Phi$ mono infectados y co-infectados con RVh y VIA.....	47
<b>Figura 18.</b> Expresión de IL-10 M $\Phi$ mono infectados y co-infectados con RVh y VIA.....	48
<b>Figura 19.</b> Co-expresión de IL-4/IL-10 en M $\Phi$ mono infectados y co-infectados con RVh y VIA.....	49

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Descripción partículas virales.....	21
<b>Tabla 2.</b> Descripción de la línea celular THP-1.....	22
<b>Tabla 3.</b> Grupos experimentales.....	25
<b>Tabla 4.</b> Mezcla de reacción para PCR cuantitativa para RVh y VIA.....	26
<b>Tabla 5.</b> Diluciones para construcción de curva estándar de RVh y VIA.....	27
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de PCR para la detección de RVh y VIA.....	28
<b>Tabla 7.</b> Anticuerpos utilizados en el análisis por citometría de flujo.....	29

## ABREVIATURAS

<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>CDHR3</b>	Miembro 3 de la familia relacionado con cadherina
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>HA</b>	Hemaglutinina
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intracelular 1
<b>IFN<math>\alpha</math></b>	Interferón alfa
<b>IFN<math>\beta</math></b>	Interferón beta
<b>IL-4</b>	Interleucina-4
<b>IL-10</b>	Interleucina-10
<b>IR</b>	Infecciones respiratorias
<b>IRV</b>	Infecciones respiratorias virales
<b>ISG</b>	Genes estimulados por interferón
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LDLR</b>	Receptor de lipoproteína de baja densidad
<b>M<math>\Phi</math></b>	Macrófagos
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MOI</b>	Multiplicidad de la infección
<b>NA</b>	Neuraminidasa
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>PRR</b>	Receptores para el reconocimiento de patrones
<b>PAMP</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino

<b>PMA</b>	Forbol miristato acetato
<b>RPMI 1640</b>	Roswell Park Memorial Institute 1640
<b>RVh</b>	Rinovirus humano
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SA</b>	Ácido siálico
<b>TCID50</b>	Median Tissue Culture Infectious Dose
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>VIA</b>	Virus de influenza A

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Infecciones respiratorias virales

Las infecciones respiratorias (IR) son la principal causa de muerte en el mundo en niños menores de 5 años de edad en países en desarrollo, siendo la neumonía la complicación más grave.<sup>1</sup> Dichas infecciones representan un importante problema de salud pública debido a su alta incidencia y su fácil propagación en la comunidad. Además las IR se asocian con una morbilidad significativa y son la razón más común de visitas ambulatorias y hospitalizaciones entre los niños.<sup>2</sup>

Los principales agentes etiológicos en causar IR son los virus, a pesar de que bacterias, hongos y parásitos también pueden ocasionarlas. Dentro de los virus más importantes se encuentran el rinovirus humano (RVh), virus de la influenza A (VIA), virus de parainfluenza humana, coronavirus, virus sincitial respiratorio, metaneumovirus, adenovirus, enterovirus, entre otros.<sup>3</sup>

Estos agentes etiológicos inducen infecciones respiratorias virales (IRV), y pueden afectar tanto el tracto respiratorio superior como inferior. Las infecciones del tracto respiratorio superior comprenden las vías aéreas desde las fosas nasales hasta las cuerdas vocales de la laringe. Las infecciones del tracto respiratorio inferior comprenden las vías aéreas que va desde la tráquea hasta los alvéolos.<sup>4</sup>

### **1.1.1. Epidemiología de las infecciones respiratorias virales**

En México en la temporada 2018/2019 el número de casos de IR fueron más de 5 millones de los cuales más de 27,663 se complicaron a neumonía/bronconeumonía. Entre las entidades federales más afectadas durante la semana epidemiológica 36 del año 2017, fueron Yucatán, Quintana Roo, Zacatecas, Colima y Agascalientes.<sup>5</sup> El número de casos y defunciones por influenza en México en la temporada 2016-2017 fueron 5220 casos y 417 defunciones de las cuales el subtipo viral más común fue el VIA H1N1 con 2618 casos que equivalen a más de la mitad de los casos totales reportados y 310 defunciones que equivalen a más del 75% de las defunciones totales.

Actualmente no existe un sistema de vigilancia epidemiológico en México para el reporte de los casos de infecciones respiratorias causadas por RVh, sin embargo, estudios multicéntricos nacionales han permitido conocer la prevalencia de este virus. Wong-chang *et al.*, identificaron que RVh es de los tres principales agentes etiológicos en causar estas infecciones en niños menores de 5 años, incluso por arriba de VIA. Además, fue el virus más frecuente asociado a co-infecciones virales.<sup>6</sup>

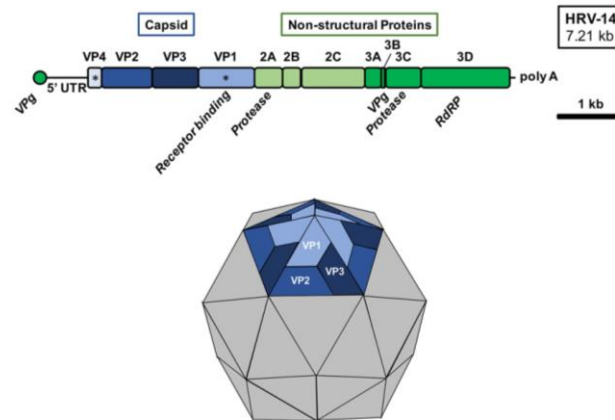
Por otra parte, el proyecto de vigilancia “*The Respiratory Virus Surveillance Project (RVSP)*” llevado a cabo en la temporada 2015-2016 en el estado de Texas, reportó que dentro de los virus más identificados en causar IR se encontraron RVh y VIA. El RVh fue más frecuentemente identificado en la temporada otoño-invierno y VIA en invierno-primavera.<sup>7</sup>

### 1.1.2. Rinovirus Humano

El RVh es el agente más común en causar infecciones del tracto respiratorio superior que usualmente se resuelve dentro de los primeros 5 a 7 días. La infección cursa generalmente con síntomas leves como congestión nasal, estornudos, tos y dolor de garganta, sin embargo, en algunos individuos puede provocar complicaciones tales como exacerbación asmática, bronquiolitis grave y hasta neumonía. A pesar de que los síntomas causados por RVh son leves en comparación con otros virus respiratorios, es considerado la causa más común de enfermedad respiratoria viral a nivel mundial.<sup>8</sup>

El modo de transmisión de RVh es mediante aerosoles que contienen gotitas procedentes de las vías respiratorias y por fomites<sup>9</sup>. Actualmente no hay medicamentos antivirales aprobados para las infecciones causadas por RVh, el tratamiento empleado va dirigido en resolver los síntomas generados.<sup>10</sup>

El RVh es un virus que pertenece a la familia *Picornaviridae*, del género *Enterovirus*, es un virus no envuelto, de ARN monocatenario y polaridad positiva que consta de aproximadamente 7200 pares de bases las cuales codifican para 11 proteínas virales. Su cápside icosaédrica está compuesta por 60 copias de cada una de las cuatro proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4; el resto de las proteínas codificadas por su genoma participan en su replicación viral. La proteína VP1 es la responsable de la adhesión del virus a receptores de superficie de la célula huésped (Figura 1).<sup>9,11</sup>



**Figura 1.** Organización genómica y estructura de la partícula viral RVh. Tomada de Christopher C. Sobart *et al.*, 2017, *Front. Microbiol.*<sup>12</sup>

El RVh se ha clasificado en tres especies: RV-A (80 serotipos), RV-B (32 serotipos) y RV-C (55 serotipos). Las clasificaciones de serotipos y especies están determinadas principalmente por la identidad de la secuencia de nucleótidos. Además, los serotipos dentro de RV-A y RV-B se han clasificado en grupos mayores y menores según su especificidad de receptor celular. Los serotipos que usan la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) como receptor (68 de los serotipos RV-A y todos los serotipos RV-B) pertenecen al grupo principal de receptores. Los 12 serotipos RV-A restantes utilizan miembros de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) y pertenecen al grupo de receptores menores. Los serotipos RV-C se unen a CDHR3, que es un miembro de la familia de las cadherinas y está involucrado en la susceptibilidad al asma infantil.<sup>13</sup>

Dependiendo del tipo de receptor, la internalización de RVh se puede dar a través de endocitosis dependiente o independiente de clatrina o mediante macropinocitosis. Después de haber ingresado, una disminución en el pH conduce a la liberación del material genético, el ARN de cadena negativa sintetizado se replica y se traduce en proteínas estructurales (cápside) y no estructurales. El virión se ensambla y empaqueta antes de su exportación celular a través de la lisis celular<sup>11</sup>.

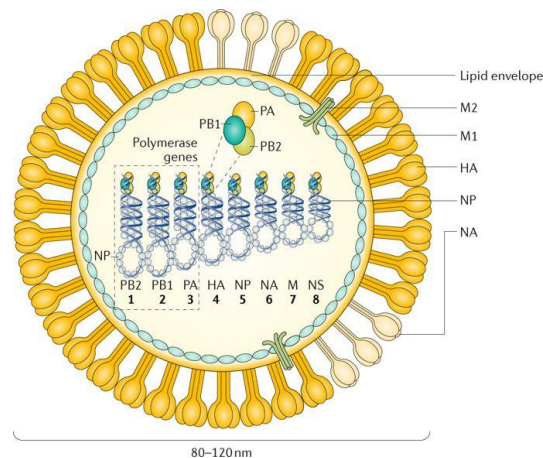
### **1.1.3. Virus de la Influenza A**

La influenza es una enfermedad respiratoria infectocontagiosa, la cual puede presentarse en forma leve a grave y en ocasiones puede llevar a la muerte, el agente etiológico es el virus de la influenza. En promedio, los virus de la influenza infectan del 5 al 10% de la población humana cada año, estos porcentajes pueden ser considerablemente más altos en ciertas áreas geográficas o grupos de edad, así como cuando los nuevos virus de la influenza se encuentran con una población humana que carece inmunidad protectora contra estos nuevos virus<sup>14</sup>.

El éxito epidemiológico de los virus de la influenza radica en su capacidad de propagarse eficientemente de persona a persona. Se han identificado tres mecanismos de transmisión: aerosol, gotitas y transmisión por contacto, y la importancia relativa de cada mecanismo es un tema de debate hoy en día<sup>15</sup>.

Algunos de los síntomas de la enfermedad pueden ser fiebre con escalofríos, tos, dolor de garganta, mucosidad nasal, fatiga, dolores musculares y de cabeza. Los niños, personas de la tercera edad y mujeres embarazadas son los grupos más susceptibles a desarrollar la forma grave de la enfermedad<sup>16</sup>.

VIA pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, es un virus monocatenario de ARN de polaridad negativa y envuelto. Su genoma segmentado está compuesto por ocho genes que codifican para once proteínas. (Figura 2)<sup>17</sup>. El ARN viral codifica para una subunidad de ARN polimerasa, glicoproteínas virales tales como hemaglutinina (HA) la cual facilita la entrada viral y neuraminidasa (NA) que facilita la liberación del virus. Además, su genoma codifica para una nucleoproteína viral (NP), la proteína matriz (M1), proteína de membrana (M2), la proteína no estructural NS1 y la proteína de exportación nuclear (NEP)<sup>18</sup>.



**Figura 2.** Organización genómica y estructura de la partícula viral VIA. Tomada de Florian Krammer *et al.*, 2018. Nature reviews.<sup>18</sup>

VIA se dividen en subtipos en función de las propiedades antigénicas de las glucoproteínas de superficie HA y NA, los dos antígenos virales principales. Asimismo son los principales objetivos de los anticuerpos protectores inducidos por la infección y la vacunación<sup>18</sup>.

La proteína HA presente en la envoltura viral puede reconocer los receptores de ácido siálico (SA) presentes en la superficie de la célula huésped, el cual es el paso más crucial en el proceso de invasión de VIA en un organismo. Los virus de la influenza tienen dos receptores celulares comunes: SA  $\alpha$ -2,3 galactosa (SA $\alpha$ -2,3-Gal) y SA  $\alpha$ -2,6 galactosa (SA $\alpha$ -2,6-Gal). Se ha encontrado que las cepas de influenza humana se unen preferentemente al receptor SA $\alpha$ -2,6-Gal<sup>19</sup>. El virus entra a la célula por endocitosis donde la acidificación induce la fusión de la membrana viral con la membrana lisosomal liberando los complejos de ribonucleoproteína en el citoplasma<sup>20</sup>, se transportan al núcleo, se replican y se transcriben por el complejo de polimerasas virales. Los complejos de ribonucleoproteína viral y las proteínas estructurales recién transportadas se transportan a las membrana plasmática, donde se forman los nuevos virus y brotan<sup>21</sup>.

## **1.2. Respuesta inmune antiviral**

El inicio de toda respuesta inmune se da por el reconocimiento de estructuras presentes en los microorganismos. PRRs (*pattern recognition receptors*) son

receptores que permiten este reconocimiento de las estructuras y se encuentran localizados en la superficie celular, endosomas y de forma soluble<sup>22</sup>. Estos se encuentran presentes en una gran variedad de células, entre ellas están las células del sistema inmune innato que reconocen PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) las cuales son estructuras presentes y compartidas entre microorganismos.

Dentro de los PRRs se incluyen a los TLRs (Tol- like receptors) y receptores de lectina tipo C presentes tanto en la superficie celular como en endosomas. RLRs (retinoic acid inducible gene- I-like receptors), NLRs (nucleotide oligomerization, and binding domain-like receptors) y receptores PYHIN (Pyrin-HIN domain) los cuales se encuentran de manera soluble<sup>22</sup>. Los ácidos nucleicos virales producidos en células infectadas pueden ser reconocido por PRRs solubles.

Después del reconocimiento de las estructuras virales, los PRRs inician la respuesta inmune antiviral, la cual incluye la producción de una gran variedad de citocinas y la inducción de la respuesta inmune inflamatoria y más tardíamente la respuesta inmune adaptativa<sup>23</sup>.

Los interferones tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) son de las citocinas más importantes producidas en respuesta a infecciones virales y tienen como objetivo interferir con la replicación

viral en células infectadas, esto debido a la inducción de ISG (interferon-stimulated genes). ISGs se expresan en respuesta a interferones tipo I y promueven un estado antiviral en células vecinas y restringen el ciclo de replicación viral en células que ya han sido infectadas. Además, incrementan las funciones de las células dendríticas y monocitos, promueve la respuesta de linfocitos T CD4+ y CD8+, mejora la respuesta de células NK y linfocitos B<sup>24</sup>.

### **1.3. Macrófagos**

#### **1.3.1. Generalidades**

Los macrófagos (M $\Phi$ ) son células de la respuesta inmune innata que juegan un papel importante en las infecciones virales, estas células participan en los procesos inflamatorios, aunque también son cruciales en el mantenimiento de la homeostasis y reparación de tejidos dañados. Son células mononucleares que se encuentran localizadas en todos los tejidos del cuerpo, donde aparecen como células grandes vacuoladas con abundante citoplasma que contiene gránulos lisosomales<sup>25</sup>.

Estas células se originan durante los diferentes estados del desarrollo embrionario. Inicialmente, surgen de células progenitoras mieloides presentes en el saco vitelino, dando lugar a la microglía, células de Kupffer y células de Langerhans. Posteriormente, los monocitos derivados del hígado fetal se diferencian en M $\Phi$  tisulares y contribuyen a la acumulación de células de Langerhans, estas células migran a la piel y a la lámina

propia del intestino, respectivamente<sup>26</sup>. En la etapa adulta, se originan a partir de células progenitoras mieloides presentes en médula ósea, estas pertenecen al linaje de células mononucleares junto con los monocitos de sangre periférica y células dendríticas<sup>27</sup>.

Los M $\Phi$  en los tejidos individuales son notablemente heterogéneos en términos de su fenotipo, transcriptoma y epigenoma, aunque muchas de sus funciones se conservan en los tejidos, tales como la eliminación de células apoptóticas y células senescentes. Las poblaciones individuales de M $\Phi$  se adaptan a las necesidades de su entorno y cumplen funciones específicas según el tejido donde se localicen, dicha heterogeneidad no es sorprendente, dadas las diferencias sustanciales entre los órganos en términos de sus funciones fisiológicas, exposición a la microbiota, nutrientes y metabolitos, y el hecho de que los M $\Phi$  se desarrollan de forma sincronizada con su órgano de residencia<sup>25</sup>.

Estas células tienen una amplia distribución y están preparadas para responder ante cualquier amenaza local existente, gracias a que poseen una amplia variedad de receptores, los cuales les permiten reconocer y responder a una gran variedad de ligandos<sup>28</sup>. Dentro de estos receptores se encuentran a) receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) intracelulares y de superficie celular que detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y patrones moleculares asociados a daño

(DAMP); b) receptores de células apoptóticas; c) receptores de citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-4 que promueven la polarización de M $\Phi$  M1 y M2, respectivamente; d) receptores de neurotransmisores; e) receptores que regulan la activación o inhibición de M $\Phi$ ; y f) integrinas que median la interacción con la matriz extracelular. Los M $\Phi$  producen numerosas moléculas que contribuyen a la remodelación e inflamación del tejido y median el aclaramiento de los cuerpos apoptóticos, los desechos celulares y los compuestos solubles. Las actividades fagocíticas y endocíticas elevadas, así como la motilidad, son fundamentales para la capacidad de los M $\Phi$  para llevar a cabo todas sus funciones en los tejidos<sup>28</sup>.

### **1.3.2. Polarización de macrófagos**

La primera evidencia de la polarización de M $\Phi$  fueron debido al descubrimiento que la citocina IL-4 podía inducir diferentes efectos en la expresión de genes en M $\Phi$  en comparación con el efecto producido por IFN $\gamma$  y LPS. En contraste con la activación clásica de M $\Phi$  por interferón  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ )<sup>29</sup>, la expresión génica de M $\Phi$  inducida por IL-4 se describió como activación alternativa.<sup>30</sup>

Más tarde se propuso el concepto M $\Phi$  M1 y M $\Phi$  M2 debido a la expresión diferencial en el metabolismo de la arginina en modelo murino. M $\Phi$  de ratones de cepas prototípicas Th1 (C57BL/6, B10D2) se activaban más fácilmente para producir óxido nítrico (NO) al ser estimulado con IFN $\gamma$  o LPS que los M $\Phi$  de cepas prototípicas Th2

(BALB/c). En cambio, el LPS estimula los MΦ Th2 para aumentar el metabolismo de la arginina hacia la generación de ornitina.<sup>31 32</sup>

Los MΦ poseen una alta plasticidad biológica lo que explica la gran diversidad de funciones que pueden llevar a cabo. Estas células pueden adoptar diferentes fenotipos en base a diferentes señales microbianas y del microambiente en el que se encuentran. Aunque existen varias subpoblaciones de MΦ conocidas hoy en día los más estudiados son MΦ M1 y MΦ M2 las cuales se les atribuye diferentes funciones, además, cada una se caracteriza por el repertorio de citocinas y quimiocinas que libera, así como marcadores de superficie.<sup>33</sup>

### **1.3.3. Macrófagos M1 y M2**

Los MΦ M1 son MΦ inflamatorios caracterizados por una presentación eficaz del antígeno, una alta actividad bactericida y la producción de citocinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. En cambio, a MΦ M2 se les atribuye funciones inmunorreguladoras debido a la secreción de citocinas antiinflamatorias, disminuir la producción de citocinas proinflamatorias y poseen una presentación de antígeno menos eficiente. Además, MΦ M2 son predominantemente MΦ reguladores involucrados en la remodelación de tejidos, progresión tumoral, curación de heridas, angiogénesis, respuestas anti-helminthos y reacciones alérgicas<sup>34</sup>.

Después de la estimulación con TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y/o LPS, los M $\Phi$  se polarizan a M1 o activados clásicamente, esto debido a la activación de factores de transcripción nuclear y proteínas reguladoras como STAT1 (transductor de señal y activador de la transcripción 1), NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa beta), PI3K (fosfoinositol 3-quinasa) y MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) lo que conduce a la activación de citocinas inflamatorias, quimiocinas y óxido nítrico<sup>33</sup>.

Los M $\Phi$  M2 o activados alternativamente incluyen a los M2a, M2b y M2c. El fenotipo M2a se produce *in vitro* por exposición a IL-4 y/o IL-13, que actúa a través del receptor común de IL-4R $\alpha$  para aumentar la expresión de CD206, arginasa y TGF $\beta$ . El fenotipo M2b se produce por exposición a una combinación de complejos inmunes IgG y LPS, lo que aumenta la producción de IL-10 y disminuye la producción de IL-12, impartiendo potentes propiedades antiinflamatorias. La exposición *in vitro* a IL-10 o glucocorticoides produce el fenotipo M2c, que se caracteriza de manera similar por una alta producción de IL-10 y baja producción de IL-12, así como una alta expresión del receptor *scavenger* (Figura 3)<sup>35</sup>.

Dentro de este espectro, las funciones de cicatrización de heridas o reparación de tejidos se atribuyen frecuentemente a M $\Phi$  M2a, aunque estos también pueden llevar a cabo otras funciones como fagocitosis, secreción de citocinas y factores de crecimiento y remodelación de la matriz<sup>35</sup>.

## 2. ANTECEDENTES

Las co-infecciones respiratorias virales son frecuentes en pacientes, entre las principales se encuentra RVh con el VIA<sup>36</sup>. Las células epiteliales del tracto respiratorio son las principales células infectadas por RVh<sup>11</sup> y VIA<sup>20</sup>, sin embargo, recientes estudios han demostrado que también pueden infectar MΦ<sup>37 38</sup>. Además, los MΦ son los leucocitos más abundantes encontrados en el tracto respiratorio y son una fuente importante de producción de citocinas y quimiocinas, por lo que desempeñan un papel importante en la respuesta inmune antiviral<sup>39</sup>. Actualmente, existen pocos modelos de co-infección reportado con dichos virus, por lo que importante investigar cuales son los mecanismos involucrados que permitan el establecimiento de dicha co-infección.

Actualmente, se ha observado que el estadio de polarización de MΦ M1 y M2 se ha relacionado con el control o el progreso de las infecciones, siendo reportado los MΦ M2 más susceptibles a infecciones virales tal como lo es la infección por el virus de VIH<sup>40</sup> y diferentes subtipos VIA<sup>38 41</sup>.

En la actualidad se conoce poco del efecto de la infección de RVh sobre la polarización de los MΦ. Nagarkar D. *et al.*, observaron que los MΦ sobre expresaban marcadores de polarización M2; IL-13 y otras citocinas de tipo 2 en respuesta a la infección de RVh *ex vivo*<sup>42</sup>. Por otro lado, Chung *et al.*, reportaron un aumento en la expresión del

marcador CD206 (receptor de manosa) y una alta producción de IL-13 en ratones BALB/c infectados con RVh, cuando se comparó con el grupo control, ambos marcadores de MΦ M2.<sup>43</sup>

MΦ M2 poseen una respuesta atenuada de IFN-β e IFN-λ1, los cuales son fundamentales en la respuesta inmune antiviral<sup>44</sup>. La expresión deficiente de interferones en pacientes asmáticos se correlaciona con una mayor replicación de RVh<sup>45 46</sup>. En cambio, MΦ M1 son importantes en la respuesta inmune contra virus<sup>47</sup>.

En contraparte, Charu *et al* observaron un distintivo patrón de expresión en MΦ polarizados M1 y M2 cuando eran infectados con el RVh, donde la infección con el RVh indujo la expresión diferencial de 195 genes distintos en MΦ M1 pero solo siete genes distintos en células polarizadas M2. La qPCR demostró una mayor expresión de CCL8, CXCL10, TNFSF10, TNFSF18, IL-6, NOD2 y GSDMD y una expresión reducida de VNN1, AGO1 y AGO2. Juntos, estos datos muestran que, en contraste con los MΦ polarizados M2, la expresión génica de los MΦ M1 está altamente regulada por RVh<sup>39</sup>.

Las investigaciones acerca del efecto del VIA sobre la polarización de los MΦ también son limitadas. Geiler *et al.*, utilizaron MΦ derivados de monocitos humanos para posteriormente infectarlos con distintas cepas del VIA, destacando la cepa pandémica

del 2009 H1N1 y observaron una alta producción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6) a diferentes tiempos con distintas cepas de VIA utilizadas<sup>48</sup>.

Por otra parte, Dutry *et al.*, reportaron una mayor susceptibilidad de M $\Phi$  M2 a la infección por el VIA, lo anterior fue comprobado por la presencia de una mayor carga viral cuando fueron infectados con distintas cepas del VIA (H1N1, H9N2 y H5N1) en comparación con los M $\Phi$  M1<sup>38</sup>. Similarmente al anterior estudio, los M $\Phi$  M2 derivados de médula ósea de ratones 129 Sv/Ev mostraron niveles más altos de antígeno viral (VIA H1N1 cepa A/WSN/33) y altos niveles de mRNA de la proteína M1 viral sintetizado en estas células<sup>41</sup>.

Como se mencionó previamente entre las co-infecciones virales respiratorias más frecuentes se encuentra RVh con el VIA, por un lado, se ha visto que RVh puede modular el estadio de polarización de los M $\Phi$  a un fenotipo M2, y estas subpoblaciones de M $\Phi$  son más susceptibles al VIA. Por lo tanto, la co-infección entre estos dos virus respiratorios podría ser posible en M $\Phi$ . Las investigaciones acerca de este mecanismo no han sido estudiadas por completo por lo cual es importante investigar cuales son los mecanismos inmunológicos involucrados en las co-infecciones virales en la particular la co-infección: RVh y VIA.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones respiratorias son causadas principalmente por virus, RVh y VIA son los más frecuentemente identificadas, además es considerada una de las co-infecciones más comunes.

Los M $\Phi$  son importantes mediadores de la respuesta inmune innata en el control de las infecciones virales, su estadio de polarización M1 y M2 se ha relacionado con el control o establecimiento de infecciones.

Por lo tanto, es importante investigar el efecto de la infección del rinovirus humano en la polarización de M $\Phi$  y observar el impacto en el establecimiento de la co-infección con virus de influenza A.

#### **4. HIPÓTESIS**

El rinovirus humano 1B induce la polarización de los M $\Phi$  a M2 permitiendo el establecimiento de la co-infección con el VIA H1N1.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Analizar el efecto de la infección del rinovirus humano 1B y la co-infección del virus de influenza A H1N1 sobre la polarización de M $\Phi$ .

## 6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar un modelo de diferenciación para la generación de M $\Phi$  en la línea celular monocítica THP-1.
2. Desarrollar un modelo de mono infección y co-infección con RVh y VIA en M $\Phi$  THP-1.
3. Analizar la polarización de M $\Phi$  M1 y M $\Phi$  M2 (M2a y M2c) generados durante la mono infección y co-infección con RVh y VIA.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Partículas virales

Para las infecciones se partió de concentrados (stock) virales los cuales fueron obtenidas de la ATCC. La replicación viral de RV 1B se generó en la línea celular H1HeLa, en cambio, para la replicación viral del virus de influenza A H1N1 se utilizó la línea celular MDCK (Tabla 1). Para evaluar la actividad de las partículas virales se utilizó la técnica de TCID50, la cual determina la cantidad de virus necesaria para destruir o producir cualquier otro tipo de efecto citopático en el 50% de las células en monocapa.

**Tabla 1.** Descripción partículas virales.

Partícula viral	Rinovirus humano 1B	Virus de influenza A (H1N1)
Cepa	B632	A/Virginia/ATCC1/2009
Clasificación	<i>Picornaviridae, Enterovirus</i>	<i>Orthomyxoviridae</i>
Propagación	H1HeLa	MDCK
Efecto en el hospedero	Redondeo y desprendimiento	Células refráctiles y redondeadas con degeneración celular

### 7.2. Manejo y propagación de la línea celular THP-1

La línea celular monocítica THP-1 fue obtenida de la ATCC y cultivada en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco) inactivado por calor

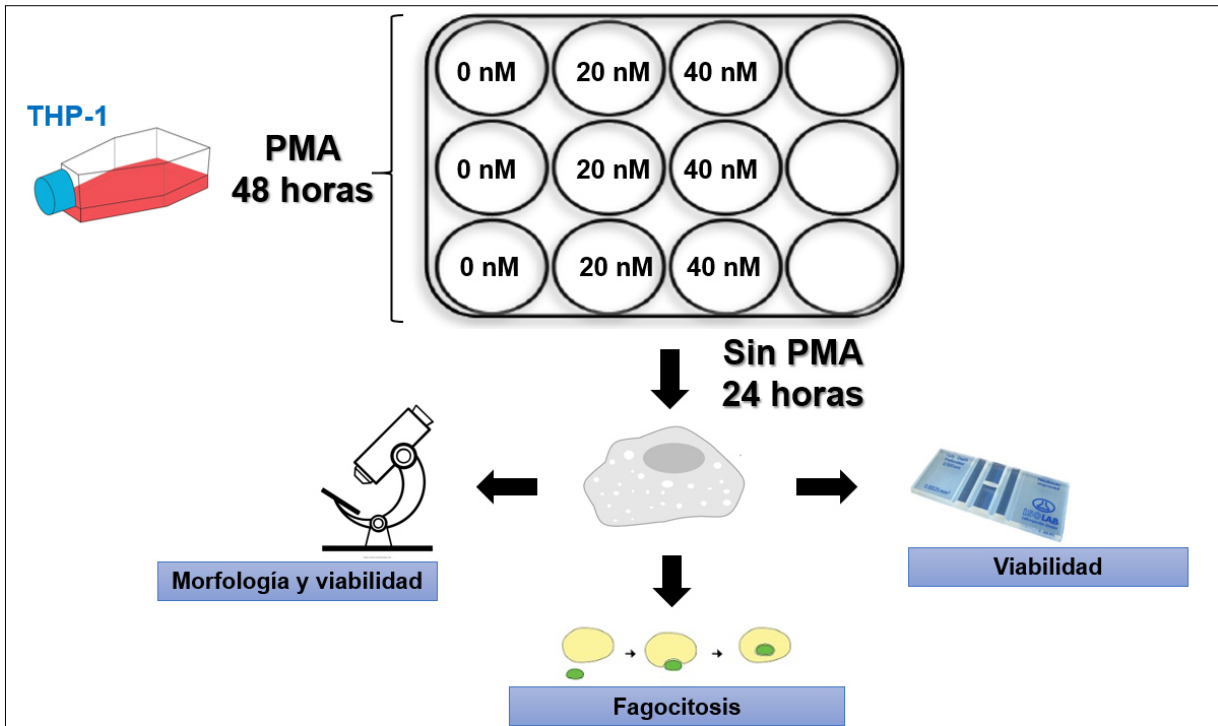
(30 minutos a 56 °C), 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) y 2-mercaptoetanol (0.05 mM) (Sigma). Para la propagación de la línea celular utilizaron frascos de cultivo T25 y T75 (Corning). El cambio de medio de cultivo se realizó cada 2 a 3 días (Tabla 2).

**Tabla 2.** Descripción de la línea celular THP-1.

<b>Línea celular</b>	THP-1 (ATCC TIB 202)
<b>Organismo</b>	Homo sapiens, humano
<b>Tejido</b>	Sangre periférica
<b>Enfermedad</b>	Leucemia monocítica aguda
<b>Tipo celular</b>	Monocitos
<b>Edad</b>	1 año
<b>Genero</b>	Hombre
<b>Morfología</b>	Monocitos
<b>Crecimiento</b>	Suspensión

### 7.3. Desarrollo del modelo de diferenciación de macrófagos THP-1.

Las células THP-1 fueron sembradas a una densidad celular de  $2.5 \times 10^5$  o  $5.0 \times 10^5$  en placas de 12 y 24 pozos, en las condiciones de cultivo descritas anteriormente. Para la diferenciación de los monocitos a  $M\Phi$  se utilizaron concentraciones de 0 nM (control/monocitos), 20 y 40 nM de PMA por 48 horas. Posteriormente, se hizo cambio de medio de cultivo (sin estímulo) y se incubó por 24 horas. Se hicieron las siguientes determinaciones para comprobar dicha diferenciación: morfología y fagocitosis. Además, se midió viabilidad celular para observar si el tratamiento con PMA empleado tenía un efecto citotóxico sobre los  $M\Phi$  (Figura 3).



**Figura 3.** Modelo de diferenciación celular.

### 7.3.1. Morfología y prueba de fagocitosis

Las células fueron descritas en base a forma, tamaño y propiedad de adhesión tomando de referencia el control (monocitos THP-1). Los MΦ son células fagocíticas, para mostrar dicha característica, las células fueron sembradas a una densidad celular de  $2.5 \times 10^5$  células por pozo y estas fueron incubadas con perlas de látex (1:10) por 3 horas, 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **7.3.2. Viabilidad celular**

Para la viabilidad celular se utilizó el colorante azul de tripano el cual es permisivo para células muertas. Los MΦ se contaron en cámara de Neubauer y se calculó el % de células viables.

### **7.4. Modelo de monoinfección y co-infección viral**

Los MΦ fueron sembrados en placas de 6 pozos a una densidad celular de  $1.0 \times 10^6/2\text{ml/pozo}$  con medio RPMI 1640 completo. Terminado el tiempo de reposo de 24 horas sin PMA los MΦ fueron infectados un grupo con RVh (MOI: 1) y otro grupo independiente con VIA (MOI: 1), las placas fueron incubadas por 1 hora a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> con agitación de placa cada 15 min. Después de la hora se retiró el medio de infección, se hicieron lavados con PSB 1x estéril y se agregó el medio fresco. Los MΦ infectados con RVh fueron incubados, una placa por 24 horas y otro independiente por 48 horas, esto mismo se realizó con las células infectadas con VIA. Los MΦ con medio de cultivo, sin virus, se utilizaron como control.

Para las co-infecciones virales los MΦ fueron sembrados similarmente en placas de 6 pozos a una densidad celular de  $1.0 \times 10^6/2\text{ml/pozo}$  con medio RPMI 1640 completo. Terminado el tiempo de reposo de 24 horas sin PMA, los MΦ fueron infectados con el RVh (MOI: 1) y se incubaron por 1 hora a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> con agitación de placa cada 15 min. Después se retiró el medio de infección, se hicieron lavados con PSB 1x

estéril y se agregó el medio fresco, las placas fueron incubadas por 24 horas. A las 24 horas se retiró el sobrenadante y posteriormente las células fueron infectadas con VIA (MOI: 1), las placas fueron incubadas por 1 hora a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> con agitación de placa cada 15 min. Después se retiró el medio de infección, se hicieron lavados con PSB 1x estéril y se agregó el medio fresco, las placas fueron incubadas por 24 horas para su análisis. Este mismo procedimiento se llevó también a la inversa, es decir, primero la infección con VIA y posterior infección con el RVh (Tabla 3).

**Tabla 3.** Grupos experimentales

Mo → RVh	24 horas
Mo → RVh	48 horas
Mo → VIA	24 horas
Mo → VIA	48 horas
Mo → RVh (24 horas) → VIA	24 horas
Mo → VIA (24 horas) → RVh	24 horas

#### 7.4.1. Determinación de la carga viral

En cada grupo experimental se utilizaron  $2.5 \times 10^5$  MΦ para la extracción del ARN viral empleado el kit comercial de QIAamp Viral RNA Mini kit (# de cat. 52906). Las células fueron congeladas y descongeladas para la lisis celular, posteriormente, una serie de centrifugaciones en columnas para la eliminación de restos celulares como proteínas y ADN para por último recuperar el ARN viral. La calidad y pureza se determinó usando

los parámetros 280/260 y 260/230 con NANODROP2000. El ARN viral se almacenó a – 80 °C hasta su uso.

1. Para cada muestra de ARN o curva estándar, se preparó una mezcla de reacción empleando Brilliant III Ultra Fast QRT-PCR Master Mix (Agilent Technologies, Cat. 600884) de acuerdo con la siguiente tabla:

**Tabla 4.** Mezcla de reacción para PCR cuantitativa para RVh y VIA.

<b>Componentes</b>	<b>Volumen</b>
2X Máster Mix RT-qPCR	5 µL
DTT	0.1 µL
Mix Primer/probe FluA-M1 o Mix Primer/probe HRV_spp	0.5 µL
Agua libre de DNasa/RNasa	1.4 µL
Volumen final	7.5 µL

2. Se agregó 7.5 µl de estas mezclas a cada pocillo de acuerdo con la configuración de su placa experimental qPCR.
3. Se agregó 2.5 µl de plantilla de ARN a cada pocillo, de acuerdo con la configuración de su placa experimental. Para pozos de control negativo, se usó 5 µl de agua libre de RNasa / DNasa. El volumen final en cada pocillo fue de 10 µl.

4. Preparación de series de dilución de curva estándar para RVh y VIA., empleando los kit de Genesig HRV\_ spp (cat. Path-HRVsp all subtypes) y FluA-M1 (cat. Path-Flu-A-M1).

- Se agregó 90 µl de tampón de preparación de plantilla a 5 tubos y se etiquetó 2-6

- Se agregó 10 µl de plantilla de control positivo (RVh o VIA) en el tubo 2

- Se mezcló con ayuda de vortéx.

- Se agregó 10 µl del tubo 2 al tubo 3

-Se mezcló con ayuda de vortéx.

Se repitieron los pasos 4 y 5 para completar las diluciones.

**Tabla 5.** Diluciones para construcción de curva estándar de RVh y VIA.

<b>Curva estándar para RVh o VIA</b>	<b>Número de copias</b>
Tubo 1 - Control positivo	$2 \times 10^5 / \mu\text{L}$
Tubo 2	$2 \times 10^4 / \mu\text{L}$
Tubo 3	$2 \times 10^3 / \mu\text{L}$
Tubo 4	$2 \times 10^2 / \mu\text{L}$
Tubo 5	$20 / \mu\text{L}$
Tubo 6	$2 / \mu\text{L}$

5. Se agregó 2.5 µl de templado estándar a cada pocillo para la generación de la curva estándar de acuerdo con la configuración de su placa. El volumen final en cada pocillo fue de 10 µl.
6. Enseguida se muestran las condiciones de amplificación (Tabla 6)

**Tabla 6.** Condiciones de PCR para la detección de RVh y VIA.

<b>Ciclos</b>	<b>Paso</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>
1	Transcripción reversa	10 min	50 °C
1	Desnaturalización	3 min	95 °C
50	Desnaturalización	5 seg	95 °C
	Alineamiento y amplificación (Recolección de datos)	10 seg	60 °C

#### **7.4.2. Inmunofenotipo de macrófagos**

Para evaluar los distintos fenotipos de MΦ generados durante la mono infección y co-infección viral, MΦ fueron recuperados y teñidos intracelularmente con anticuerpos monoclonales dirigidos contra TNFα, IL-4 e IL-10 (Tabla 4). TNFα como un marcador para M1, IL-4 como un marcador de M2a e IL-10 como un marcador distintivo de M2c. Para la tinción y posterior análisis por citometría de flujo se utilizó el siguiente protocolo.

**Tabla 7.** Anticuerpos utilizados en el análisis por citometría de flujo.

Anticuerpo	Isotipo	Clona	Marca	Fluorocromo	x 10 <sup>6</sup> células	Catalogo
IL-10	Mouse IgG1	127107	R&D	PerCP	10 µl	IC2172C
IL-4	Mouse IgG1	8D4-8	Invitrogen	APC	5 µl	17-7049-42
TNF $\alpha$	Mouse IgG1	Mab11	Invitrogen	APC	5 µl	17-7349-82

**4 horas antes de recuperar las células, se agregó un 1 µL de brefeldina (para detener el aparato de Golgi) a cada pozo y se incubó la placa a 37 °C.**

1. Se colocó una bolsa refrigerante por debajo de la placa, esto permite una mejor recuperación de células que se adhieren a la placa.

**NOTA:** Se colocó una gasa de algodón en medio de la placa y bolsa refrigerante.

2. Los M $\Phi$  fueron recuperadas con PBS 1x frío estéril y fueron ajustadas a la concentración deseada ( $1.25 \times 10^5$ ) en cada tubo previamente rotulado.

Tubo 1= M $\Phi$  (Control) sin tinción

Tubo 2= M $\Phi$  M1 TNF $\alpha$ -APC

Tubo 3= M $\Phi$  M2a/M2c, IL4-APC/IL10-PerCP.

3. Se centrifugó a 1200 rpm por 8 min a 4 °C.
4. Se eliminó el sobrenadante

5. Se agregó 250µL de solución fixation/permeabilization al botón celular. Se mezcló y se incubó por 20 min a 4°C.
6. Los MΦ fueron lavadas 2 veces con 1 ml de buffer BD Perm/Wash 1X (preparación: 1 ml BD Perm/Wash 10X + 9 ml de agua destilada), se mezcló y se centrifugó a 1200 rpm por 8 min a 4 °C.
7. Después, los MΦ fueron resuspendidas en 50 µL de buffer BD Perm/Wash 1X, el cual contiene la concentración de anticuerpos deseada.
8. Se agregó 50 µL a cada tubo, se mezcló y se incubó a 30 min a 4 °C en oscuridad.
9. Posteriormente, los MΦ fueron lavados dos veces con 1 ml de buffer BD Perm/Wash 1X, se mezcló y se centrifugó a 1200 rpm por 8 min a 4 °C.
10. El botón celular obtenido se resuspendió en 200 µL buffer de tinción (PBS 1X estéril + BSA).
11. Los tubos fueron almacenados a 4 °C en oscuridad antes de sus análisis.
12. La citometría de flujo se realizó en el equipo BD FACS Canto II y los datos fueron analizados con ayuda del software BD FACSDiva 8.0.2.

#### **7.4.3. Cuantificación de los niveles de TNFα en macrófagos**

Para la determinación de TNFα se utilizó el kit de ELISA Human TNF Alpha Uncoated ELISA (# catalogo: 88-7346, Invitrogen).

1. Se agregó 100 µL de anticuerpo de captura previamente diluido en Coating Buffer, se selló y se incubó toda la noche a 4 °C.

2. Se aspiró cada pozo y se lavó 3 veces con >250  $\mu\text{L}$ /pozo de Wash Buffer. Se dejó 1 minuto durante cada paso de lavado ya que aumenta la efectividad de los lavados. Se seco la placa sobre papel absorbente para eliminar cualquier residuo del Buffer.
3. Se bloqueo con 200  $\mu\text{L}$ /pozo con ELISA / ELISPOT Diluent (1X). Se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora.
4. Se realizaron diluciones seriadas del estándar más alto para hacer la curva estándar para un total de 8 puntos. Se agregó 100  $\mu\text{L}$  de cada dilución a los pocillos apropiados.
5. Se agregó 100  $\mu\text{L}$ /pozo de cada muestra a los pocillos apropiados.
6. Se agregó 100  $\mu\text{L}$  de ELISA / ELISPOT Diluent (1X) al pozo del blanco.
7. Se sello la placa y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 2 horas.
8. Se preparó el anticuerpo de detección conforme a las instrucciones del fabricante.
9. Se aspiró cada pozo y se lavó conforme al pazo 2. Se repito para un total de 3-5 lavados. Se dejó 1 minuto durante cada paso de lavado ya que aumenta la efectividad de los lavados. Se seco la placa sobre papel absorbente para eliminar cualquier residuo del Buffer.
10. Se agregó 100  $\mu\text{L}$ /pozo de anticuerpo de detección previamente diluido en ELISA/ELISPOT (1X) Diluent.
11. Se sello la placa y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 1 hora.
12. Se preparó la Avidin-HRP conforme a las instrucciones del fabricante.
13. Se aspiró cada pozo y se lavó conforme al pazo 2. Se repito para un total de 3-5 lavados. Se dejó 1 minuto durante cada paso de lavado ya que aumenta la

efectividad de los lavados. Se seco la placa sobre papel absorbente para eliminar cualquier residuo del Buffer.

14. Se agregó 100  $\mu\text{L}$ /pozo de Avidin-HRP previamente diluido en ELISA/ELISPOT (1X) Diluent.
15. Se selló la placa y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos.
16. Se aspiró cada pozo y se lavó conforme al paso 2. En este paso de lavado, se dejó en Wash Buffer durante 1 a 2 minutos antes de la aspiración. Se repitió para un total de 5-7 lavados.
17. Se agregó 100  $\mu\text{L}$ /pozo de Solución TMB 1X a cada pocillo.
18. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 15 minutos.
19. Se agregó 50  $\mu\text{L}$  de solución de parada a cada pocillo.
20. Se leyó la placa a 450 nm en lector de placa de ELISA.

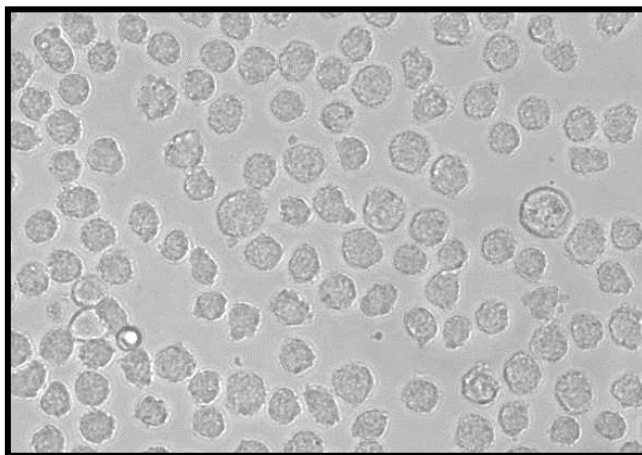
### **7.5. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se realizaron pruebas de ANOVA de una vía y análisis de comparación múltiple de Tukey o pruebas de t de student no pareadas utilizando el software GraphPad 7.0. Se consideró como significativo todo resultado con una  $P < 0.05$ .

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Desarrollo del modelo de diferenciación en línea THP-1.

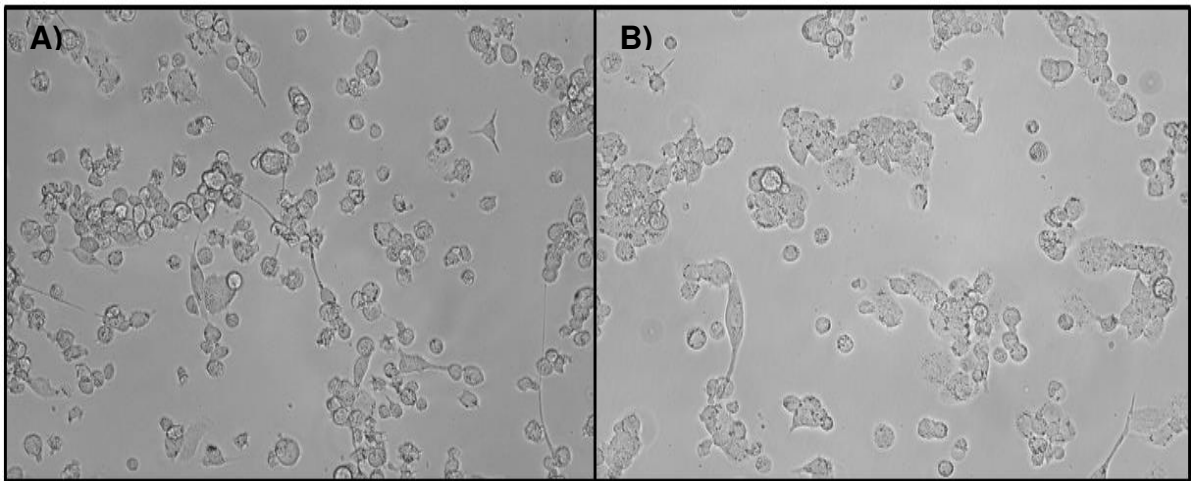
La línea celular THP-1 son monocitos que poseen una morfología redonda, un tamaño homogéneo y su crecimiento en medio de cultivo es en suspensión (Figura 4). Para el estudio de M $\Phi$ , THP-1 tienen que llevar un proceso de diferenciación celular, para este fin se eligió el forbol miristato acetato (PMA), el cual es ampliamente utilizado para la diferenciación de monocitos a M $\Phi$ . La transformación de los monocitos a M $\Phi$  se evaluó tomando en cuenta los cambios morfológicos.



**Figura 4.** Línea celular monocítica THP-1 (ATCC TIB 202).

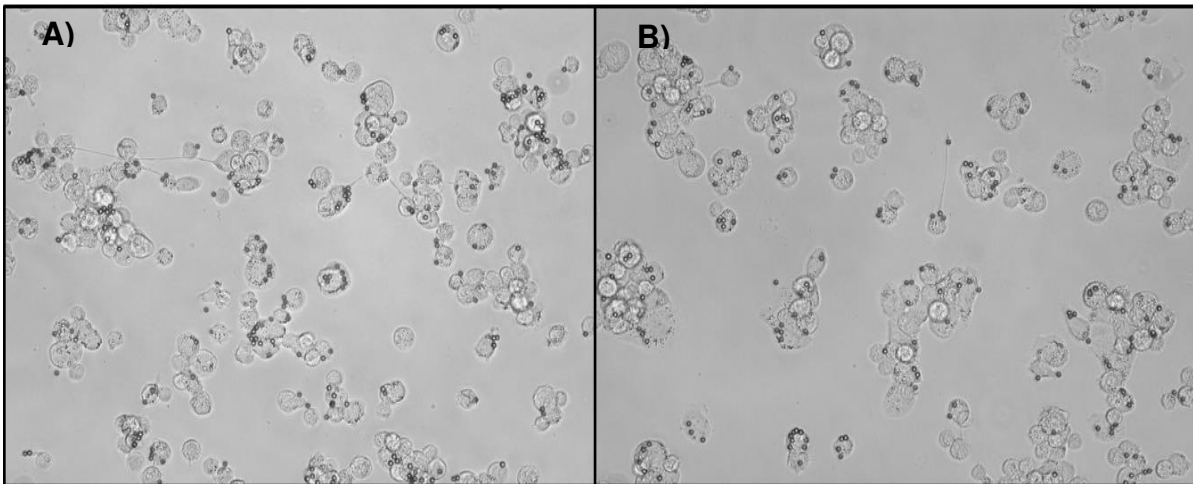
Existe una gran variedad de protocolos utilizados para la diferenciación de M $\Phi$ , estos varían en la concentración de PMA utilizada, el tiempo con el estímulo, así como el tiempo de reposo (sin PMA). Se utilizaron concentraciones de 20 nM y 40 nM de PMA, un tiempo de 48 horas con el estímulo y un tiempo de reposo de 24 horas.

Después de un tiempo reposo de 24 horas las células presentaron prolongaciones celulares asemejando una morfología de fibroblastos, además, incrementaron su tamaño y se volvieron células adherentes a la placa, características distintivas de MΦ derivados de THP-1. En las dos concentraciones utilizadas se observaron estas mismas características morfológicas (Figura 5).



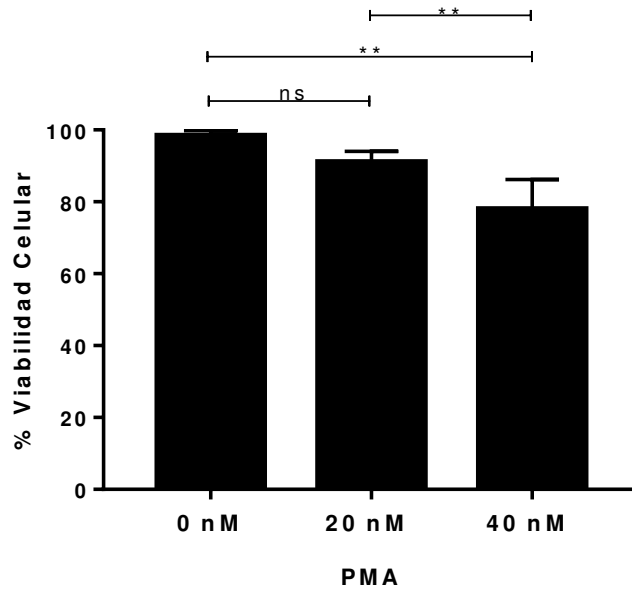
**Figura 5.** Morfología de MΦ THP-1 diferenciados con PMA. A) 20 y B) 40 nM PMA.

Una característica distintiva de los MΦ es su fuerte capacidad fagocítica, debido a esto MΦ THP-1 fueron incubados con perlas de látex (relación 1:10) para observar, de manera cualitativa, si estas células poseían propiedades fagocíticas. Independiente de la concentración utilizada, los MΦ mostraron la capacidad de fagocitar las perlas de látex al tiempo evaluado (Figura 6).



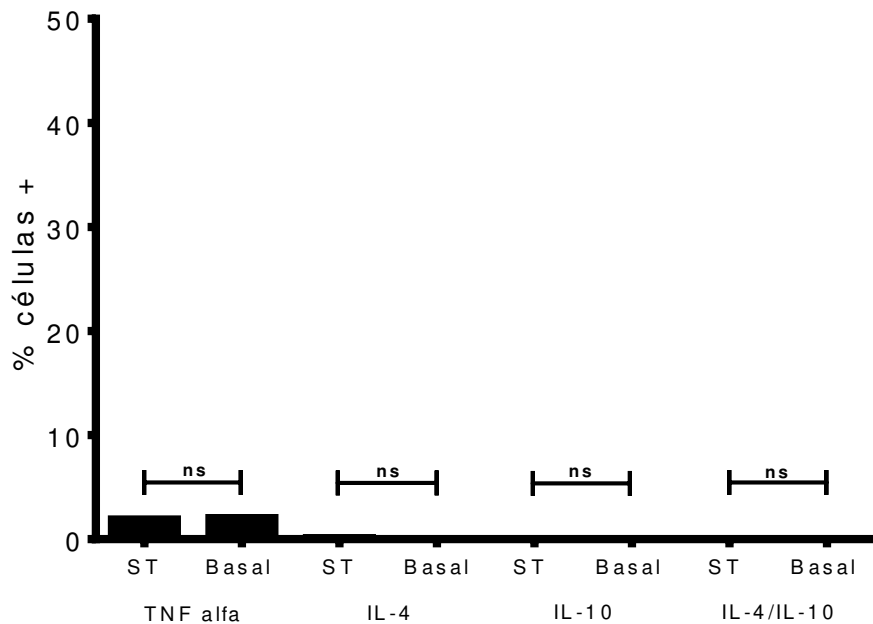
**Figura 6.** Capacidad fagocítica de MΦ THP-1 diferenciados con PMA. A) 20 y B) 40 nM PMA.

Para determinar si las diferentes concentraciones de PMA empleadas presentaban un efecto citotóxico, se evaluó el % de viabilidad celular utilizando azul de tripano. El azul de tripano es un colorante que se utiliza para ensayos de viabilidad ya que permite distinguir entre células viva y muertas. Como podemos observar en la siguiente figura las células presentaron una mayor viabilidad al utilizar la concentración de 20 nM comparado con la concentración de 40 nM de PMA ( $P < 0.01$ ) (Figura 7). Además, no se observó diferencia significativa entre la concentración de 20 nM utilizada y el control.



**Figura 7.** Porcentaje de viabilidad celular de MΦ THP-1 diferenciados con PMA. ANOVA de una vía  $P < 0.01$ . Prueba de comparación múltiple de Tukey,  $n = 5$ . \*\* $P < 0.01$ , ns = no significativo.

Finalmente, después de elegir la concentración de 20 nM de PMA para la diferenciación de los monocitos a MΦ, se evaluó si dicha concentración elegida podía tener un efecto en la polarización de MΦ, por lo que se midió la producción intracelular de  $TNF\alpha$ , IL-4, IL-10 e IL-4/IL-10 por medio de citometría de flujo. Como podemos observar en la siguiente grafica la concentración de 20 nM de PMA no afectó significativamente la producción de las citocinas evaluadas cuando se comparó cada una con su control sin tinción (Figura 8).

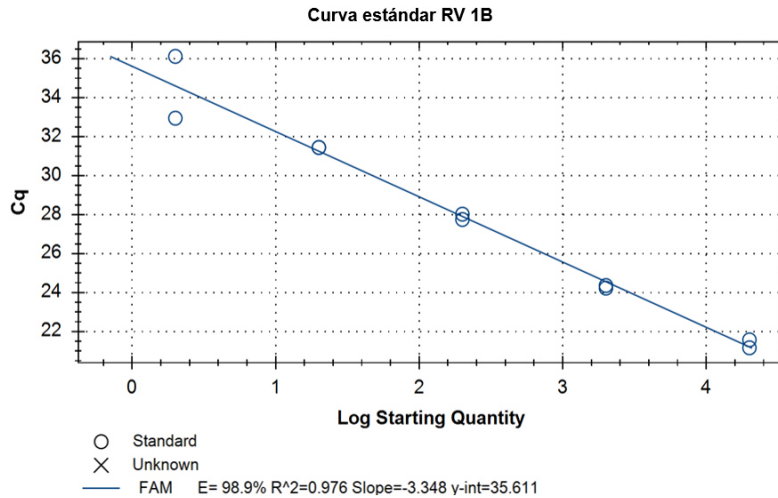


**Figura 8.** Porcentaje de células TNF $\alpha$ +, IL-4+, IL-10+ e IL-4+/IL-10+ en M $\Phi$  THP-1 diferenciados con 20 nM de PMA. Prueba de t no pareada. ns= no significativo. ST: sin tinción.

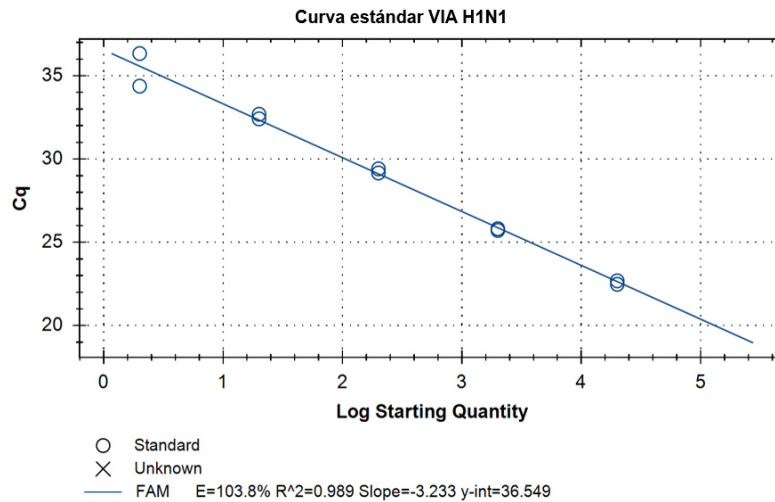
Debido a los resultados anteriores se eligió trabajar con la concentración de 20 nM para los posteriores experimentos.

## 8.2. Establecimiento del modelo de mono infección y co-infección viral

Antes de determinar la carga viral de RVh y VIA de los grupos experimentales establecidos, se construyeron curvas estándares haciendo diluciones seriadas de un control positivo que fue provisto por cada kit, las diluciones se realizaron de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Enseguida se muestran las curvas de cada virus (Figura 9 y 10).



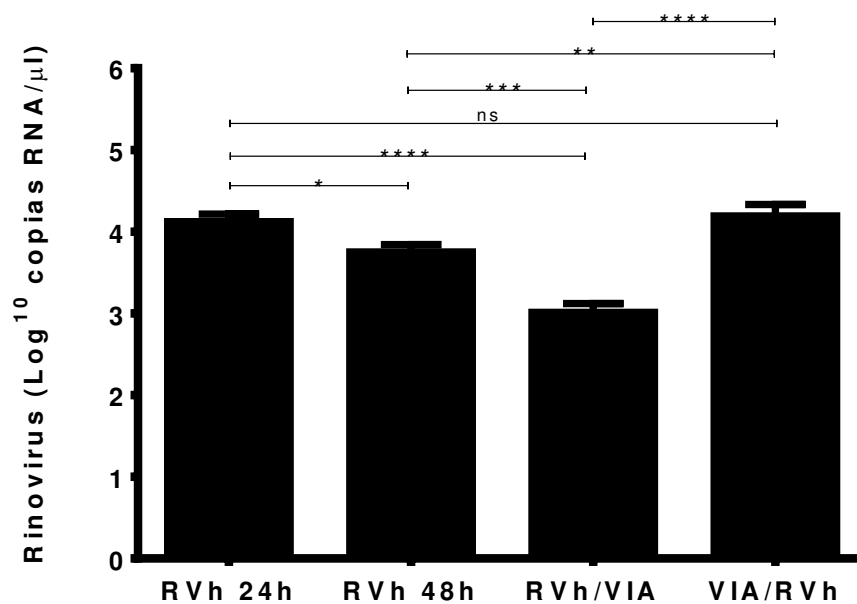
**Figura 9.** Curva estándar empleando el control positivo para el RVh.



**Figura 10.** Curva estándar empleando el control positivo para el VIA.

Los MΦ de todos los grupos experimentales fueron recuperados a los tiempos de infección programados para la extracción del ARN viral. Posteriormente, se utilizaron primers y sondas específicas para la realización de qRT-PCR.

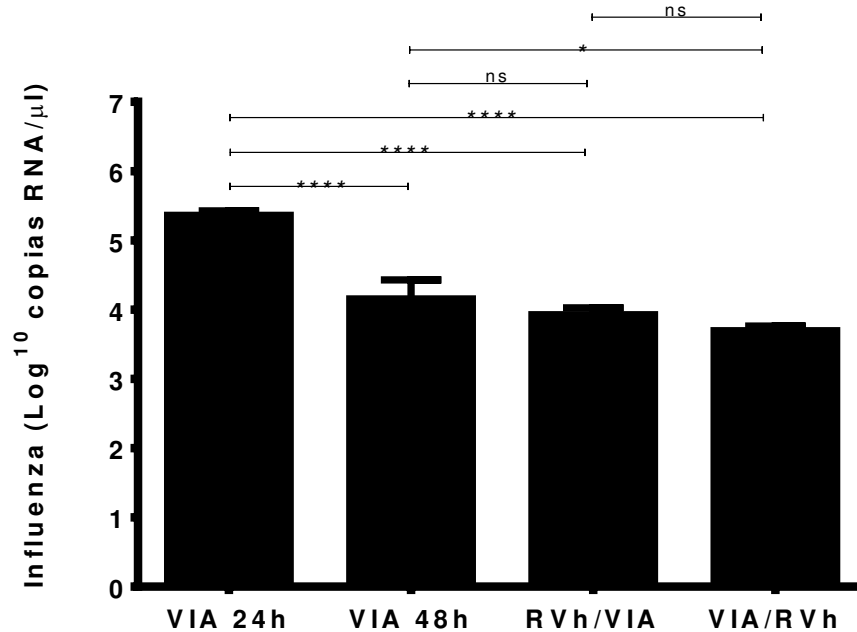
Como podemos observar en la siguiente figura, en todos grupos experimentales se logró establecer la infección con el RVh, siendo a las 24 horas el pico más grande de copias de ARN detectado, sin embargo, esta disminuyó significativamente a las 48 horas ( $P<0.05$ ). En los grupos experimentales de co-infección se logró detectar mayores copias de material genético viral cuando se infectó previamente con VIA y posteriormente con el RVh en comparación con RVh/VIA ( $P<0.0001$ ) (Figura 11).



**Figura 11.** Cuantificación del número de copias de ARN/μL del RVh por qRT-PCR. ANOVA de una vía  $P<0.0001$ . Prueba de comparación múltiple de Tukey,  $n=3$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ , ns= no significativo.

Similarmente, se logró observar el establecimiento de la infección con el VIA en todos los grupos experimentales, detectándose las mayores cantidades de copias de ARN viral a las 24 horas comparado con el grupo de las 48 horas ( $P<0.0001$ ). En los grupos experimentales de co-infección se logró detectar mayores copias de material genético

viral cuando se infectó en un principio con RVh y posteriormente con el VIA sin embargo no fue un resultado significativo (Figura 12).



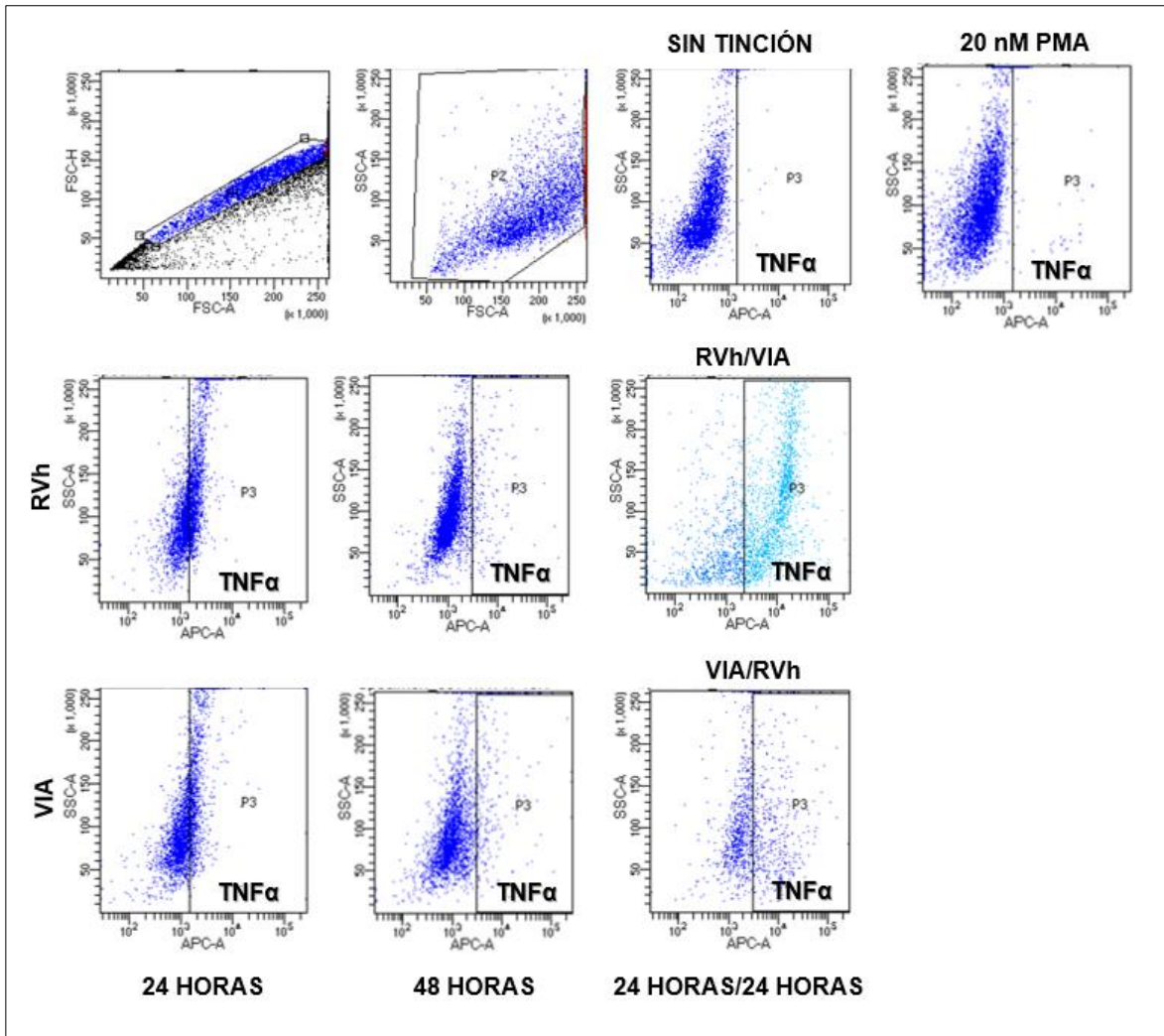
**Figura 12.** Cuantificación del número de copias de ARN/μL del VIA por qRT-PCR. ANOVA de una vía  $P < 0.0001$ . Prueba de comparación múltiple de Tukey,  $n=3$ . \* $P < 0.05$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , ns= no significativo.

### 8.3. Efecto en la polarización de macrófagos

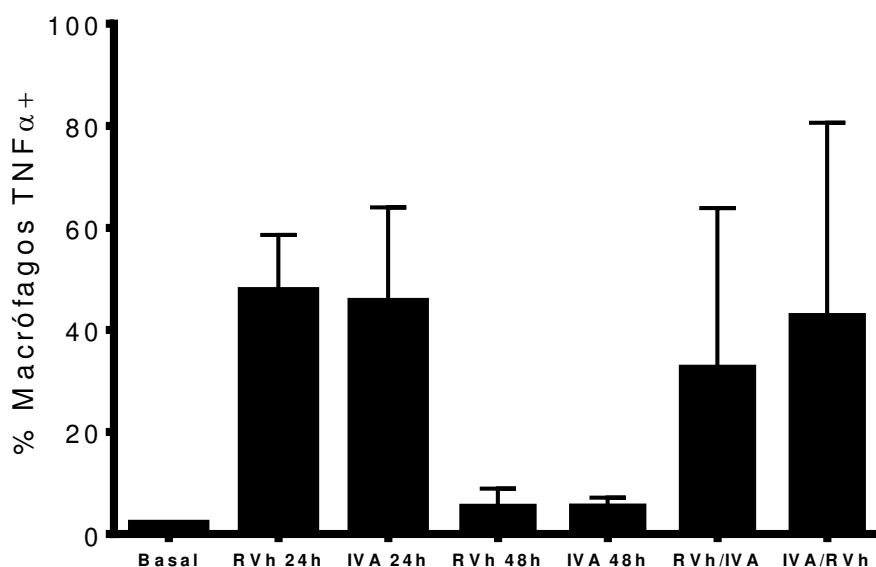
Una vez establecido los modelos de monoinfección y co-infección en MΦ THP-1 y verificado por qRT-PCR, se evaluó el efecto de la infección del RVh y/o VIA sobre polarización de los MΦ. Las células fueron recuperadas para determinar los niveles intracelulares de citocinas relacionados con MΦ M1 (TNFα), M2a (IL-4) y M2c (IL-10) por citometría de flujo.

Primero y para una mejor comprensión del análisis de citometría de flujo se empezó creando *gates* o gráficos de dot plot los cuales nos permiten ir seleccionar nuestra población de interés y así hacer un análisis más preciso. Como primer paso se eliminaron los dobletes y tripletes celulares los cuales pueden guiar a un inadecuado análisis, por ello el primer *gate* que se utilizó fue FSC-A vs FSC-H para excluirlos. Posteriormente, se utilizó el *gate* FSC-A vs SSC-A, los cuales son comúnmente usados para identificar células en base a su tamaño y complejidad respectivamente. Por último, para establecer nuestra población negativa y positiva para cada citocina se usaron controles sin tinción.

La primera subpoblación de interés que se evaluó fueron los M $\Phi$  M1, utilizando como marcador distintivo TNF $\alpha$ . Como podemos ver en la siguiente figura se observó un incremento en el % de M $\Phi$  TNF $\alpha$  + a las 24 horas en los grupos infectados con RVh y VIA al ser comparados con el control basal, sin embargo, este efecto disminuyó drásticamente a las 48 horas en ambos grupos. De manera similar, se observó un incremento en el % de M $\Phi$  TNF $\alpha$  + en los grupos experimentales RVh/VIA y VIA/RVh, aunque este fue menor que los grupos de monoinfección (Figura 13 y 14).



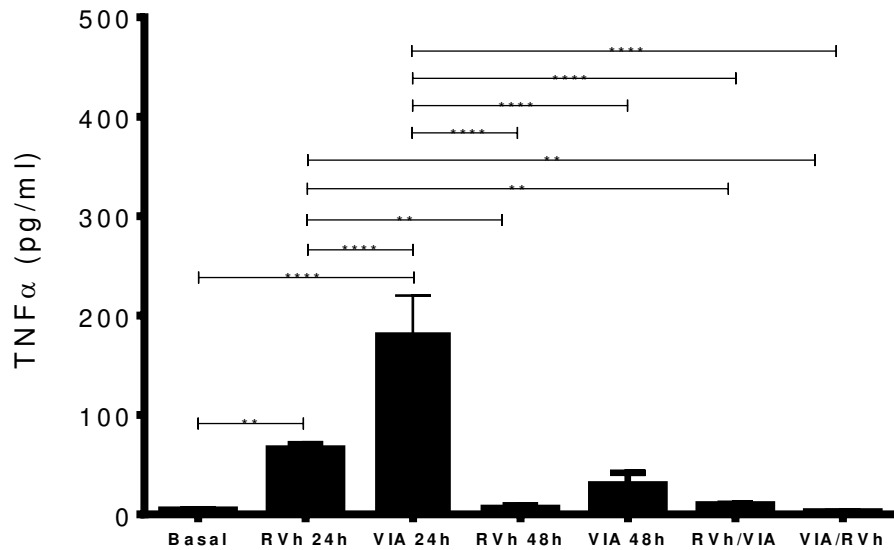
**Figura 13.** Análisis de la expresión de TNF $\alpha$  en M $\Phi$  mono infectados y co-infectados con RVh y VIA por citometría de flujo.



**Figura 14.** Expresión de TNF $\alpha$  en M $\Phi$  monoinfectados y co-infectados con RVh y VIA. ANOVA de una vía  $P<0.05$ . Prueba de comparación múltiple de Tukey,  $n=3$ . ns.

Para complementar los resultados de citometría de TNF $\alpha$  se decidió medir los niveles de esta citocina en lo sobrenadantes de todos los grupos experimentales evaluados. Como podemos observar a continuación (Figura 15), M $\Phi$  secretan grandes cantidades de TNF $\alpha$  cuando son infectados con el RVh ( $P<0.01$ ) y VIA ( $P<0.0001$ ) a las 24 horas comparado cada uno con el control basal, siendo el VIA el que más induce la producción de TNF $\alpha$  en comparación con los M $\Phi$  infectados con RVh a las 24 horas ( $P<0.0001$ ). Pese a esto, a las 48 horas se observó que la secreción de TNF $\alpha$  disminuye drásticamente en el grupo de RVh comparado con RVh a las 24 horas ( $P<0.01$ ) y en el grupo de VIA comparado con VIA a las 24 horas ( $P<0.0001$ ).

En los grupos de co-infección no se logró observar un aumento en la producción de esta citocina.

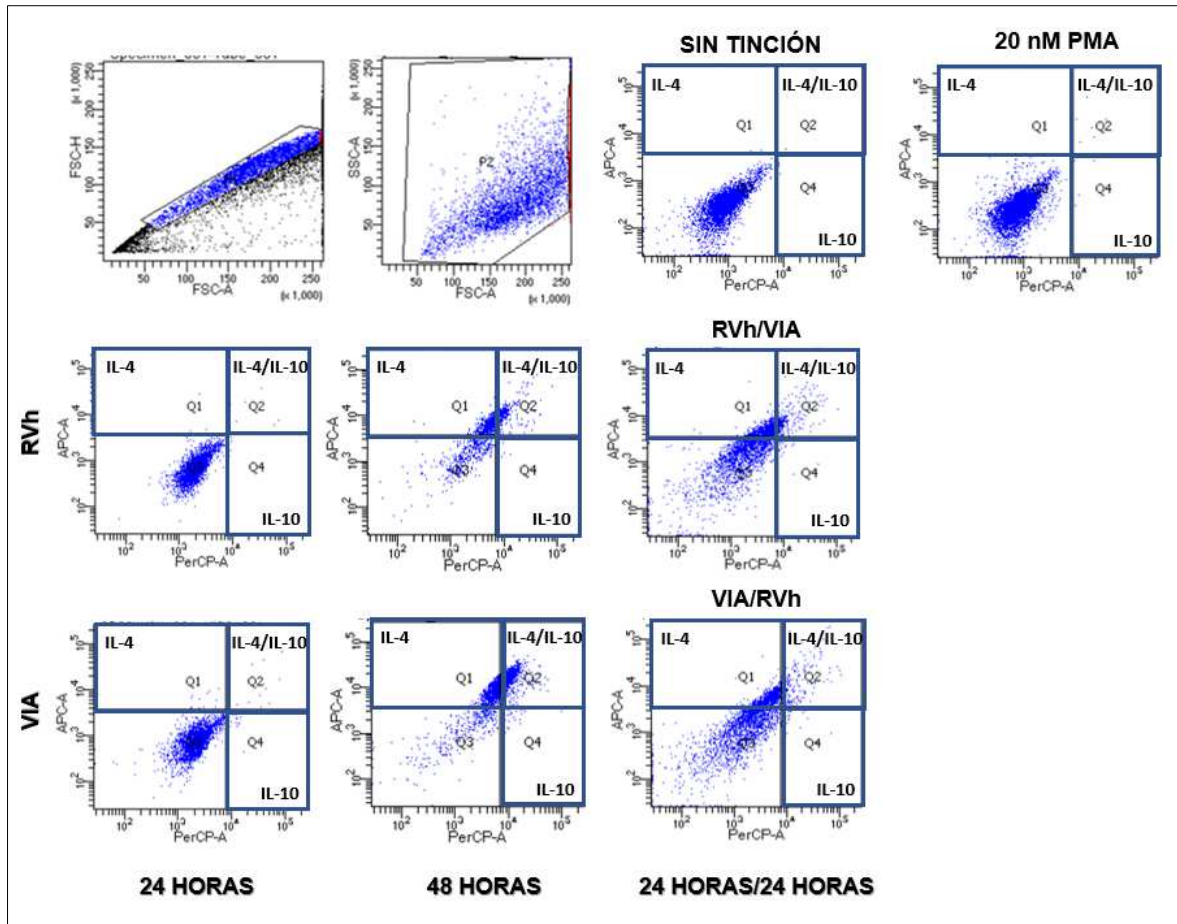


**Figura 15.** Producción de TNF $\alpha$  en M $\Phi$  mono infectados y co-infectados con RVh y VIA. ANOVA de una vía  $P < 0.0001$ . Prueba de comparación múltiple de Tukey,  $n = 3$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

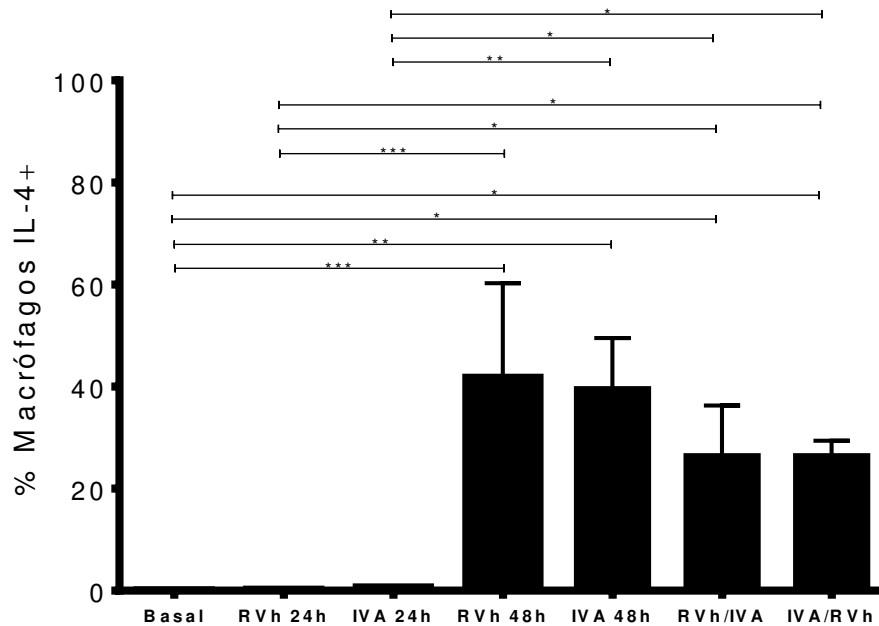
Otras subpoblaciones de M $\Phi$  que se evaluaron en los grupos experimentales descritos previamente fueron los M $\Phi$  M2a y M2c. IL-4 se utilizó como un marcador distintivo de M $\Phi$  M2a. Como podemos observar en el cuadrante superior izquierdo de los gráficos de dot plots no se observó un incremento en el % de M $\Phi$  IL-4+ cuando fueron infectados con RVh y VIA (monoinfección) a las 24 horas. Sin embargo, a las 48 horas se logró observar un aumento en el % M $\Phi$  IL-4+ cuando fueron infectados con RVh con respecto al control ( $P < 0.001$ ) y el grupo de M $\Phi$  infectado con RVh por 24 horas ( $P < 0.001$ ). Similarmente, a las 48 horas se observó un aumento en el % M $\Phi$  IL-4+

cuando fueron infectados con VIA con respecto al control ( $P<0.01$ ) y el grupo de MΦ infectado con VIA por 24 horas ( $P<0.01$ ). Además, no se logró observar diferencia significativa al comparar el % de MΦ IL-4+ de los grupos MΦ infectados con RVh y MΦ infectados VIA a las 48 horas.

Interesantemente, se logró observar que la co-infección viral por estos dos virus incrementaron el % de MΦ IL-4+ (Figura 16 y 17). No obstante, no se observó diferencia significativa en el % de MΦ IL-4+ entre ambos grupos de co-infección.

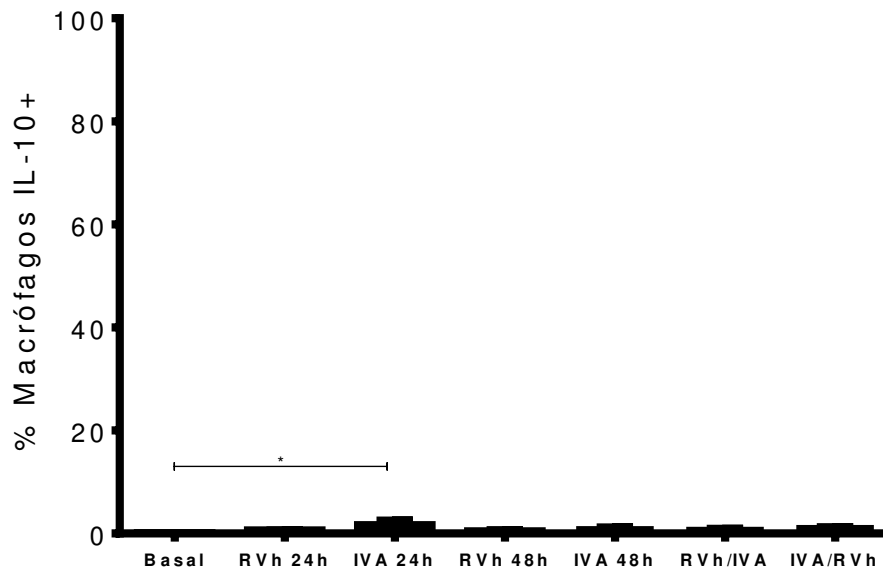


**Figura 16.** Análisis de la expresión de IL-4, IL-10 e IL-4/IL-10 en MΦ mono infectados y co-infectados con RVh y VIA por citometría de flujo.



**Figura 17.** Expresión de IL-4 en MΦ mono infectados y co-infectados con RVh y VIA. ANOVA de una vía  $P < 0.0001$ . Prueba de comparación múltiple de Tukey,  $n=3$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

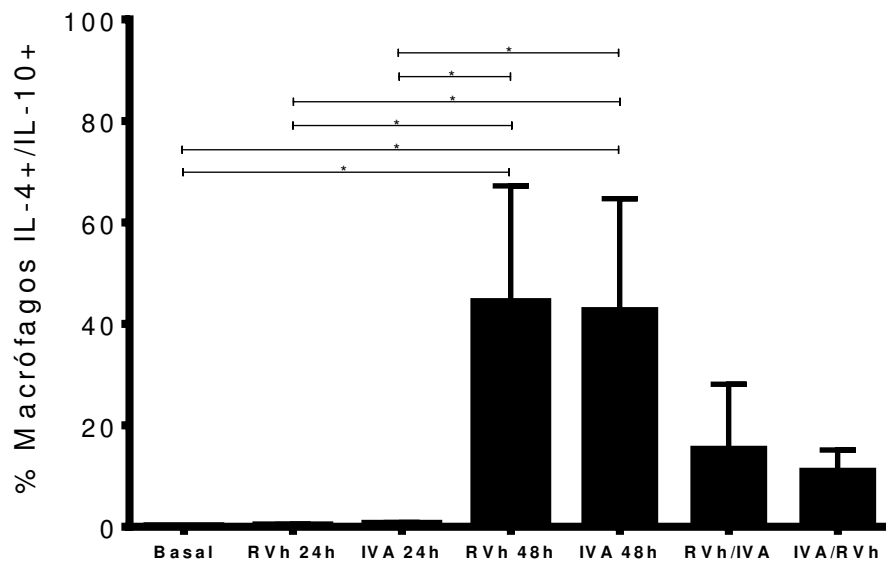
Los MΦ M2c se caracterizan en parte por la producción de IL-10, citocina ampliamente conocida por tener funciones antiinflamatorias. En el cuadrante inferior derecho de cada dot plot se muestra la población positiva para IL-10. La infección de MΦ con RVh y VIA (monoinfección y co-infección) no incrementaron el % de MΦ IL-10+ en ninguno de los grupos experimentales, solo en el grupo de MΦ infectado con VIA se logró apreciar un ligero aumento a las 24 horas ( $P < 0.05$ ) (Figuras 16 y 18).



**Figura 18.** Expresión de IL-10 en MΦ monoinfectados y co-infectados con RVh y VIA. ANOVA de una vía  $P < 0.05$ . Prueba de comparación múltiple de Tukey  $n=3$ . \* $P < 0.05$ .

En el cuadrante superior derecho de cada dot plot se muestra la subpoblación de MΦ IL-4+/IL-10+. Como podemos observar en la siguiente grafica la infección con el RVh incrementó el % de MΦ IL-4+/IL-10+ a las 48 horas en comparación con el grupo control (basal) ( $P < 0.05$ ) y a las 24 horas ( $P < 0.05$ ). Con respecto a la infección de MΦ con VIA se observó un comportamiento similar, VIA incrementó el % de MΦ IL-4+/IL-10+ a las 48 horas post-infección.

En los grupos de co-infección viral también se logró observar esta subpoblación IL-4+, IL-10+, aunque en menor medida (Figuras 16 y 19).



**Figura 19.** Co-expresión de IL-4/IL-10 en MΦ monoinfectados y co-infectados con RVh y VIA. ANOVA de una vía  $P < 0.01$ . Prueba de comparación múltiple de Tukey,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$ .

Interesantemente, se observó que las subpoblaciones de MΦ IL-4+ e IL-4+/IL-10+ aparecieron a las 48 horas post-infección, mismo tiempo que disminuyó la subpoblación de MΦ TNF $\alpha$ +

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1. Modelo de diferenciación celular

Para el estudio de cualquier tipo celular el cultivo primario siempre será la mejor opción, ya que las células conservan las características morfológicas del órgano del cual fueron aisladas. Además, al estar más cercanas a las células que las originaron, se ve reflejado en una mejor actividad y funcionalidad similar a la de su ambiente natural. Sin embargo, en ocasiones no es práctico usar células de cultivo primario para su estudio *ex vivo*, especialmente para el estudio de MΦ humanos debido a su limitado tiempo de vida en cultivo<sup>49</sup>. Otra desventaja es la variabilidad que existe entre los donadores, además en ocasiones el aislamiento de las células requiere de la donación de sangre o la recolección de un tejido específico mediante procedimientos invasivos y el número de células es una limitante en protocolos en donde se requiere grandes cantidades de células<sup>44</sup>.

En nuestro estudio se decidió trabajar con la línea celular THP-1 ya que esta ha representado una buena alternativa y una valiosa herramienta para investigar la estructura y función de monocitos y MΦ<sup>50</sup>. Sin embargo, para el estudio de MΦ estas deben someterse a un proceso de diferenciación celular, en nuestro estudio se utilizó PMA, el cual ha sido ampliamente utilizado para este fin<sup>51,52</sup>. El PMA es un análogo estructural del diacilglicerol que activa directamente la proteína quinasa C o *PKC* tanto *in vivo* como *in vitro*. La activación de la PKC da como resultado su translocación del

citósol a la membrana y la fosforilación de múltiples proteínas sustratos<sup>53</sup>. PKC está implicada en la diferenciación celular, la maduración y la proliferación, por lo cual se ha utilizado para diferenciación de monocitos a M $\Phi$ <sup>54</sup>.

Existe una gran diversidad de concentraciones PMA utilizadas en la literatura, sin embargo, el uso de altas concentraciones se ha reportado que puede aumentar la expresión de algunos genes en M $\Phi$  diferenciados, lo que podría abrumar el aumento de la expresión génica inducida por otros estímulos a estudiar<sup>55</sup>. El uso de altas concentraciones de PMA se ha observado que aumenta los niveles de expresión de genes asociados con la inflamación y aumenta la secreción de citocinas proinflamatorias, en comparación con bajas concentraciones de PMA. Por esta razón se decidió trabajar con bajas concentraciones<sup>49</sup>, en nuestra investigación probamos concentraciones de 20 y 40 nM de PMA por un tiempo de 48 horas con un tiempo de reposo de 24 horas.

Después de un tiempo de reposo de 24 horas las células presentaron características macroscópicas de M $\Phi$ . Además, en ambas concentraciones los M $\Phi$  mostraron similares propiedades fagocíticas, por lo que morfológicamente no se encontró diferencia alguna entre ambas concentraciones. Sin embargo, al utilizar la concentración de 20 nM de PMA, los M $\Phi$  presentaron una mayor viabilidad celular, por lo que se decidió utilizar esta concentración para los posteriores experimentos. Asimismo, se encontró que utilizando la concentración de 20 nM de PMA los M $\Phi$  no

alteraron su producción intracelular de TNF $\alpha$ , IL-4 e IL-10 por citometría de flujo, ya que fueron muy similares en las proporciones de éstas, indicándonos M $\Phi$  cercanos a M0. Lo anterior, es de gran importancia, especialmente para estudios de polarización de M $\Phi$  como fue nuestro objetivo.

## **9.2. Modelo de monoinfección y co-infección: RVh y VIA.**

La mayoría de los estudios que han permitido conocer la respuesta de M $\Phi$  contra el RVh se han realizados en modelos animales<sup>56</sup> y en lavado broncoalveolar de pacientes infectados<sup>57</sup>, esto con el objetivo de estudiar principalmente el rol de RVh en la exacerbación asmática y en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Sin embargo, algunos investigadores han implementado modelo de infección de RVh en M $\Phi$  THP-1. Laza-Stanca *et al*, establecieron un modelo de infección utilizando la línea celular THP-1 empleando similares condiciones a las manejadas en nuestro modelo. M $\Phi$  diferenciados con PMA fueron infectados con el RVh (MOI:1) por una hora, las células fueron lavadas e incubadas por 24 hora para posteriormente ser recuperadas y hacer la extracción del ARN viral. Los niveles intracelulares de RVh se determinaron mediante PCR en tiempo real. En base a estas condiciones ellos lograron observar que el RVh podría infectar eficientemente M $\Phi$  THP-1 mostrándose las cargas virales más elevadas a las 8 horas, sin embargo disminuye progresivamente con el tiempo <sup>58</sup>. En nuestro modelo también pudimos observar un similar comportamiento, M $\Phi$  THP-1 fueron permisivos a la infección con el RVh,

observándose las cargas virales más elevadas a las 24 horas, aunque esta disminuyó significativamente a las 48 horas post-infección. A diferencia de nuestro estudio, ellos trabajaron con el rinovirus serotipo 16 (grupo mayor) el cual utiliza el receptor ICAM-1 para su entrada, en cambio, en nuestro estudio se utilizó el RV1B (grupo menor) el cual utiliza el receptor de LDL para su entrada<sup>59</sup>. En base a estos resultados pudimos comprobar el establecimiento de la monoinfección de RV en la línea celular THP-1. Dentro de las principales razones por la cual la línea celular THP-1 pudiera ser permisiva a dicha infección puede ser debido a la baja producción de interferón  $\alpha$  e interferón  $\beta$ , estos interferones se sabe que juegan un rol muy importante en la respuesta inmune antiviral<sup>60</sup>.

El conocimiento de la respuesta de M $\Phi$  contra VIA, a diferencia del RVh, es más amplio, se han establecido diferentes modelos para su estudio que van desde el cultivo primario, como los M $\Phi$  derivado de monocitos humanos<sup>61</sup> o M $\Phi$  alveolares<sup>62</sup>, uso de diferentes cepas de ratones <sup>63</sup> y el uso de línea celulares monocíticas, como la línea celular THP-1. En nuestra investigación se logró establecer un modelo de monoinfección con el VIA H1N1 (MOI:1) en M $\Phi$  THP-1, observándose grandes cantidades de material viral del VIA a las 24 horas post-infección, aunque, el número de copias disminuye significativamente a las 48 horas ( $P < 0.001$ ).

Como se mencionó en un principio el RVh y el VIA son de los virus más identificados en causar infecciones respiratorias, además varios estudios han reportado que son

detectados causando co-infección en el hospedero. Incluso se ha reportado que el RVh es el virus más frecuentemente encontrado causado co-infección con el VIA<sup>36</sup>.

En nuestro estudio se pudo establecer un modelo de co-infección en MΦ THP-1 utilizando el RV1B (grupo menor) y VIA H1N1 (A/Virginia/ATCC1/2009) empleando una MOI de 1 para cada virus, dicho modelo fue comprobado por medio de qRT-PCR. En base a nuestros resultados pudimos observar que la co-infección entre ambos virus puede co-existir al mismo tiempo en MΦ THP-1, debido a que se detectaron elevadas cantidades de copias de ambos virus en los grupos de co-infección.

Interesantemente se observó que la infección previa con el RVh disminuyó la carga viral del VIA en MΦ THP-1. González *et al.*, establecieron un modelo de co-infección entre el RV1B y VIA H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) en ratones BALB/c, ellos observaron que la infección de ratones con RV1B 2 días antes de la infección con el VIA H1N1 no reduce los títulos virales de este último<sup>64</sup>. A diferencia de nuestros resultados, nosotros logramos observar una disminución significativa ( $P < 0.0001$ ) de la carga viral de VIA cuando fue infectado previamente con el RVh por 24 horas (Figura 12).

De manera contraria, se observó un aumento de la carga viral de RVh cuando fue infectado previamente con el VIA por 24 horas, sin embargo, no fue un resultado significativo (Figura 11).

### 9.3. Efecto de la monoinfección y co-infección con RVh y VIA en la polarización de MΦ

El efecto en la polarización de MΦ por microorganismos ha sido ampliamente estudiado hoy en día. La polarización a M1 de M0 está asociado con la protección durante enfermedades infecciosas agudas<sup>65</sup>. Algunos ejemplos de bacterias como *Listeria monocytogenes*<sup>66</sup>, *Salmonella typhi* y *Mycobacterium tuberculosis*<sup>67</sup> promueven la polarización de MΦ a un fenotipo M1, dentro de los mecanismos de señalización se incluyen la activación de NF-κβ y la estimulación de la vía PI3K. En cambio, otras bacterias son capaces de reprogramar el fenotipo de los MΦ a M2, tal es el caso, de la infección causada por *Brucella abortus*, la cual está asociada con la polarización M2 mediada por IL-10 y esto promueve el desarrollo de la cronicidad en esta infección<sup>68</sup>.

Varios estudios han demostrado que las infecciones causadas por virus también pueden afectar el estado de polarización de los MΦ, tal es el caso de la infección por el virus sincitial respiratorio que se ha reportado incrementa la expresión de citocinas proinflamatorias, como TNFα, en líneas celulares de MΦ murinos y MΦ alveolares humanos<sup>69</sup>.

En nuestro estudio se evaluó si la monoinfección del RVh y el VIA podían tener un efecto en la polarización de MΦ, y si esto pudiera promover la co-infección viral. Dentro de nuestro estudio se logró observar que el RVh y VIA inducen un aumento en el % de MΦ TNFα + a las 24 horas de infección por citometría de flujo. Además, estos

resultados fueron corroborados por ELISA para TNF $\alpha$ , donde se observó un aumento en la producción de esta citocina en M $\Phi$  infectados con RVh y VIA a las 24 horas, siendo este último un mayor inductor de citocina. TNF $\alpha$  ha sido ampliamente utilizado como un marcador distintivo de M1<sup>70</sup> por lo que se infiere que a tiempos tempranos de la infección M $\Phi$  muestran un fenotipo M1. En base a estos resultados se observó que RVh estimula la producción de TNF $\alpha$ . Laza-Stanca *et al.*, observaron resultados similares, RV16 aumentó la producción de esta citocina a las 24 horas post-infección en M $\Phi$  THP-1, mostrando los mayores niveles a las 48 y 72 horas. Además, se ha reportado que la producción de TNF $\alpha$  en M $\Phi$  infectados con RVh fue dependiente de NF- $\kappa$ B.<sup>58</sup>

Similarmente a la infección con el RVh, se observó que la infección con el VIA induce la polarización de M $\Phi$  a M1 a las 24 horas, esto se pudo comprobar debido al aumento en el % de M $\Phi$  TNF $\alpha$ + por citometría de flujo y a la alta producción de esta citocina por ELISA. Geiler *et al.*, observaron una alta producción de TNF $\alpha$  en M $\Phi$  derivados de monocitos cuando fueron infectados con distintos subtipos de VIA.<sup>48</sup>

En base a los resultados de citometría de flujo se observó que RVh y VIA (monoinfecciones) inducen la polarización de M $\Phi$  M1 a las 24 horas de infección, sin embargo, a las 48 horas se observó un predominio de M $\Phi$  M2a y M2 (IL-4+ e IL-10), Zhao *et al.*, en base a sus resultados reportaron un comportamiento similar, M $\Phi$  alveolares de ratones C57BL/6 mostraron un incremento de marcadores relacionados con M $\Phi$  M1 en las primeras horas de infección cuando son infectados con diferentes

subtipos del VIA, no obstante, este fenotipo se pierde con el tiempo y MΦ mostraron marcadores de polarización M2 o inmunosupresivos (MΦ IL-10+) en etapas más tardías de la infección<sup>71</sup>. Existen antecedentes que el virus de VIH ha mostrado tener un efecto similar cuando infecta MΦ. Durante las primeras etapas de la infección los MΦ muestran un fenotipo M1 con una alta producción de IFN $\gamma$ , IL-2, IL-12; mientras en etapas posteriores hay un cambio de M1 a M2 con alta producción de IL-4, TGF $\beta$  e IL-10<sup>72</sup>.

La co-infección del RVh y VIA aumento significativamente el % de MΦ IL-4+ y aumento el % de MΦ IL-4+/IL-10, por lo que podemos inferir que hay una mezcla de subpoblaciones a este tiempo.

Estudios clínicos y epidemiológicos sugieren que la co-infección del RVh y el VIA puede reducir la gravedad de la enfermedad y propagación viral de este último<sup>73,74</sup>. González *et al.*, observaron que ratones BALB/c infectados con RV1B y posterior co-infección con el VIA H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) presentan mayor % de sobrevivencia, mejor % de peso y un menor score clínico al utilizar una dosis baja o media del VIA<sup>64</sup>. MΦ M1 se sabe hoy en día que son grandes productores de TNF $\alpha$ , una citocina implicada en la tormenta de citocinas proinflamatorias en pacientes hospitalizados con infecciones graves de influenza. En base a nuestros resultados podemos inferir dicho comportamiento puede deberse en parte a que la co-infección de RVh y VIA promueve la generación de fenotipos de MΦ M2 (MΦ IL-4+ y MΦ IL-

4+/IL-10+) o antiinflamatorios que podría explicar en parte la disminución de la gravedad.

## 10. CONCLUSIÓN

Rinovirus Humano 1B induce la polarización de los M $\Phi$  a M1 en la etapa temprana de la infección y a M2 en la etapa tardía, sin embargo, se establece la co-infección del Virus de la Influenza A H1N1.

## 11. PERSPECTIVAS A FUTURO

- Evaluar otros marcadores de polarización relacionados MΦ M1 y MΦ M2.
- Evaluar la producción de IL-4 e IL-10 por ELISA.
- Evaluar la co-infección a las 48 horas.
- Evaluar la expresión de interferones tipo I
- Evaluar la expresión de los receptores de entrada RVh y VIA en la mono-infección y co-infección.
- Analizar los genes estimulados por interferón (ISG).

## 12. REFERENCIAS

1. WHO | Causes of child mortality. *WHO*  
[http://www.who.int/gho/child\\_health/mortality/causes/en/](http://www.who.int/gho/child_health/mortality/causes/en/).
2. Kouni, S. *et al.* Evaluation of viral co-infections in hospitalized and non-hospitalized children with respiratory infections using microarrays. *Clin. Microbiol. Infect.* **19**, 772–777 (2013).
3. Tregoning, J. S. & Schwarze, J. Respiratory Viral Infections in Infants: Causes, Clinical Symptoms, Virology, and Immunology. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 74–98 (2010).
4. Acute Respiratory Infections in Children - Disease Control Priorities in Developing Countries - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11786/>.
5. Salud, S. de. Informes Semanales para la Vigilancia Epidemiológica de Infecciones Respiratorias Agudas 2017 - Semana Epidemiológica 36. *gob.mx*  
<http://www.gob.mx/salud/documentos/informes-semanales-para-la-vigilancia-epidemiologica-de-infecciones-respiratorias-agudas-2017-semana-epidemiologica-36?idiom=es>.
6. Wong-Chew, R. M. *et al.* Respiratory viruses detected in Mexican children younger than 5 years old with community-acquired pneumonia: a national multicenter study. *Int. J. Infect. Dis.* **62**, 32–38 (2017).
7. 2015 - 2016 Texas Influenza Surveillance Activity Report.  
<https://www.dshs.texas.gov/idcu/disease/influenza/surveillance/2016/>.
8. Epidemiology of viral respiratory infections - The American Journal of Medicine.  
[http://www.amjmed.com/article/S0002-9343\(01\)01058-0/abstract](http://www.amjmed.com/article/S0002-9343(01)01058-0/abstract).
9. Blaas, D. & Fuchs, R. Mechanism of human rhinovirus infections. *Mol. Cell. Pediatr.* **3**, (2016).
10. Greenberg, S. B. Update on Human Rhinovirus and Coronavirus Infections. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **37**, 555–571 (2016).

11. Jacobs, S. E., Lamson, D. M., George, K. S. & Walsh, T. J. Human Rhinoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 135–162 (2013).
12. Stobart, C. C., Nosek, J. M. & Moore, M. L. Rhinovirus Biology, Antigenic Diversity, and Advancements in the Design of a Human Rhinovirus Vaccine. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).
13. Lewis-Rogers, N., Seger, J. & Adler, F. R. Human Rhinovirus Diversity and Evolution: How Strange the Change from Major to Minor. *J. Virol.* **91**, (2017).
14. Transmission of influenza A viruses - ScienceDirect.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682215001452>.
15. Influenza - The Lancet. [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(17\)30129-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(17)30129-0/fulltext).
16. Taubenberger, J. K. & Morens, D. M. The Pathology of Influenza Virus Infections. *Annu. Rev. Pathol.* **3**, 499–522 (2008).
17. Bouvier, N. M. & Palese, P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* **26 Suppl 4**, D49-53 (2008).
18. Influenza | Nature Reviews Disease Primers. <https://www.nature.com/articles/s41572-018-0002-y>.
19. Chen, X. *et al.* Host Immune Response to Influenza A Virus Infection. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
20. Herold, S., Becker, C., Ridge, K. M. & Budinger, G. R. S. Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment. *Eur. Respir. J.* **45**, 1463–1478 (2015).
21. Orthomyxoviridae - ScienceDirect.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123846846000616>.
22. Braciale, T. J. & Hahn, Y. S. Immunity to viruses. *Immunol. Rev.* **255**, 5–12 (2013).

23. Kawai, T. & Akira, S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat. Immunol.* **7**, 131–137 (2006).
24. McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A. & O’Garra, A. Type I interferons in infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 87–103 (2015).
25. Mowat, A. M., Scott, C. L. & Bain, C. C. Barrier-tissue macrophages: functional adaptation to environmental challenges. *Nat. Med.* **23**, 1258–1270 (2017).
26. De Kleer, I., Willems, F., Lambrecht, B. & Goriely, S. Ontogeny of Myeloid Cells. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
27. Ginhoux, F. & Guilliams, M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* **44**, 439–449 (2016).
28. Gordon, S. & Martinez-Pomares, L. Physiological roles of macrophages. *Pflugers Arch.* **469**, 365–374 (2017).
29. Nathan, C. F., Murray, H. W., Wiebe, M. E. & Rubin, B. Y. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* **158**, 670–689 (1983).
30. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* **6**, (2014).
31. Mills, C. D. & Ley, K. M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity. *J. Innate Immun.* **6**, 716–726 (2014).
32. Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **164**, 6166–6173 (2000).
33. Gabhann, J. N. *et al.* Btk Regulates Macrophage Polarization in Response to Lipopolysaccharide. *PLOS ONE* **9**, e85834 (2014).

34. Chen, S., Yang, J., Wei, Y. & Wei, X. Epigenetic regulation of macrophages: from homeostasis maintenance to host defense. *Cell. Mol. Immunol.* (2019) doi:10.1038/s41423-019-0315-0.
35. Novak, M. L. & Koh, T. J. Macrophage phenotypes during tissue repair. *J. Leukoc. Biol.* **93**, 875–881 (2013).
36. Esper, F. P., Spahlinger, T. & Zhou, L. Rate and influence of respiratory virus co-infection on pandemic (H1N1) influenza disease. *J. Infect.* **63**, 260–266 (2011).
37. Bentley, J. K. *et al.* Rhinovirus colocalizes with CD68- and CD11b-positive macrophages following experimental infection in humans. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 758-761.e3 (2013).
38. Dutry, I. *et al.* The Effects of Macrophage Polarity on Influenza Virus Replication and Innate Immune Responses. *J. Clin. Cell. Immunol.* 1–10 (2014) doi:10.4172/2155-9899.1000297.
39. Rhinovirus infection induces distinct transcriptome profiles in polarized human macrophages. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29521598>.
40. Graziano, F., Vicenzi, E. & Poli, G. Plastic restriction of HIV-1 replication in human macrophages derived from M1/M2 polarized monocytes. *J. Leukoc. Biol.* **100**, 1147–1153 (2016).
41. Campbell, G. M. *et al.* Susceptibility of bone marrow-derived macrophages to influenza virus infection is dependent on macrophage phenotype. *J. Gen. Virol.* **96**, 2951–2960 (2015).
42. Nagarkar, D. R. *et al.* Rhinovirus Infection of Allergen-Sensitized and -Challenged Mice Induces Eotaxin Release from Functionally Polarized Macrophages. *J. Immunol.* **185**, 2525–2535 (2010).
43. Chung, Y. *et al.* Rhinovirus infection induces interleukin-13 production from CD11b-positive, M2-polarized exudative macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **52**, 205–216 (2015).
44. El Fiky, A., Perreault, R., McGinnis, G. J. & Rabin, R. L. Attenuated expression of interferon- $\beta$  and interferon- $\lambda$ 1 by human alternatively activated macrophages. *Hum. Immunol.* **74**, 1524–1530 (2013).

45. Sykes, A. *et al.* Rhinovirus 16-induced IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  are deficient in bronchoalveolar lavage cells in asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 1506-1514.e6 (2012).
46. Contoli, M. *et al.* Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations. *Nat. Med.* **12**, 1023–1026 (2006).
47. Zdrengeha, M. T., Makrinioti, H., Muresan, A., Johnston, S. L. & Stanciu, L. A. The role of macrophage IL-10/innate IFN interplay during virus-induced asthma. *Rev. Med. Virol.* **25**, 33–49 (2015).
48. Geiler, J., Michaelis, M., Sithisarn, P. & Cinatl, J. Comparison of pro-inflammatory cytokine expression and cellular signal transduction in human macrophages infected with different influenza A viruses. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **200**, 53–60 (2011).
49. Lund, M. E., To, J., O'Brien, B. A. & Donnelly, S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J. Immunol. Methods* **430**, 64–70 (2016).
50. THP-1 ATCC® TIB-202™. <https://www.atcc.org/products/all/TIB-202.aspx>.
51. Yeung, A. T. Y. *et al.* A Genome-Wide Knockout Screen in Human Macrophages Identified Host Factors Modulating Salmonella Infection. *mBio* **10**, (2019).
52. Madhvi, A., Mishra, H., Leisching, G., Mahlobo, P. & Baker, B. Comparison of human monocyte derived macrophages and THP1-like macrophages as in vitro models for M. tuberculosis infection. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **67**, 101355 (2019).
53. Chang, Z. L. & Beezhold, D. H. Protein kinase C activation in human monocytes: regulation of PKC isoforms. *Immunology* **80**, 360–366 (1993).
54. Aihara, H., Asaoka, Y., Yoshida, K. & Nishizuka, Y. Sustained activation of protein kinase C is essential to HL-60 cell differentiation to macrophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 11062–11066 (1991).

55. Park, E. K. *et al.* Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm. Res.* **56**, 45–50 (2007).
56. Hong, J. Y. *et al.* Macrophage activation state determines the response to rhinovirus infection in a mouse model of allergic asthma. *Respir. Res.* **15**, 63 (2014).
57. Laza-Stanca, V. *et al.* The Role of IL-15 Deficiency in the Pathogenesis of Virus-Induced Asthma Exacerbations. *PLOS Pathog.* **7**, e1002114 (2011).
58. Laza-Stanca, V. *et al.* Rhinovirus Replication in Human Macrophages Induces NF- $\kappa$ B-Dependent Tumor Necrosis Factor Alpha Production. *J. Virol.* **80**, 8248–8258 (2006).
59. Schuler, B. A. *et al.* Major and Minor Group Rhinoviruses Elicit Differential Signaling and Cytokine Responses as a Function of Receptor-Mediated Signal Transduction. *PLoS ONE* **9**, (2014).
60. Lee, A. J. & Ashkar, A. A. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
61. Hoeve, M. A., Nash, A. A., Jackson, D., Randall, R. E. & Dransfield, I. Influenza Virus A Infection of Human Monocyte and Macrophage Subpopulations Reveals Increased Susceptibility Associated with Cell Differentiation. *PLoS ONE* **7**, (2012).
62. Rodgers, B. C. & Mims, C. A. Influenza virus replication in human alveolar macrophages. *J. Med. Virol.* **9**, 177–184 (1982).
63. Londrigan, S. L. *et al.* Infection of Mouse Macrophages by Seasonal Influenza Viruses Can Be Restricted at the Level of Virus Entry and at a Late Stage in the Virus Life Cycle. *J. Virol.* **89**, 12319–12329 (2015).
64. Gonzalez, A. J., Ijezie, E. C., Balemba, O. B. & Miura, T. A. Attenuation of Influenza A Virus Disease Severity by Viral Coinfection in a Mouse Model. *J. Virol.* **92**, (2018).
65. Benoit, M., Desnues, B. & Mege, J.-L. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *J. Immunol.* **181**, 3733–3739 (2008).

66. The role of the activated macrophage in clearing *Listeria monocytogenes* infection. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17127272>.
67. Chacón-Salinas, R. *et al.* Differential pattern of cytokine expression by macrophages infected in vitro with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin. Exp. Immunol.* **140**, 443–449 (2005).
68. Fernandes, D. M., Jiang, X., Jung, J. H. & Baldwin, C. L. Comparison of T cell cytokines in resistant and susceptible mice infected with virulent *Brucella abortus* strain 2308. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **16**, 193–203 (1996).
69. RSV P-protein impairs extrinsic apoptosis pathway in a macrophage-like cell line persistently infected with respiratory syncytial virus. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25937519>.
70. Kroner, A. *et al.* TNF and Increased Intracellular Iron Alter Macrophage Polarization to a Detrimental M1 Phenotype in the Injured Spinal Cord. *Neuron* **83**, 1098–1116 (2014).
71. Zhao, X. *et al.* PI3K/Akt Signaling Pathway Modulates Influenza Virus Induced Mouse Alveolar Macrophage Polarization to M1/M2b. *PLOS ONE* **9**, e104506 (2014).
72. Nikitina, E., Larionova, I., Choinzonov, E. & Kzhyshkowska, J. Monocytes and Macrophages as Viral Targets and Reservoirs. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
73. Greer, R. M. *et al.* Do rhinoviruses reduce the probability of viral co-detection during acute respiratory tract infections? *J. Clin. Virol.* **45**, 10–15 (2009).
74. Casalegno, J. S. *et al.* Rhinoviruses delayed the circulation of the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in France. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**, 326–329 (2010).

## 13. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

### Jaudiel Humberto Salado Gámez

Candidato para el Grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunología Médica

**Título de tesis:** Efecto de la infección del Rinovirus Humano 1B y la co-infección del Virus de la Influenza A H1N1 sobre la polarización de macrófagos.

**Área de estudio:** Ciencias de la Salud.

**Biografía:** Nacido el 17 de diciembre del 1990 en la ciudad de Hermosillo, Sonora. Hijo de Jorge Humberto Salado Islas y Cecilia Gámez Corrales.

**Educación:** Egresado de la Licenciatura de Químico Biólogo Clínico por la Universidad de Sonora, institución de la cual se tituló por Examen General para el Egreso de Licenciatura (EGEL) en Química Clínica, obteniendo un resultado sobresaliente.

Realizó una estancia de investigación en el Laboratorio de Inmunología en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.