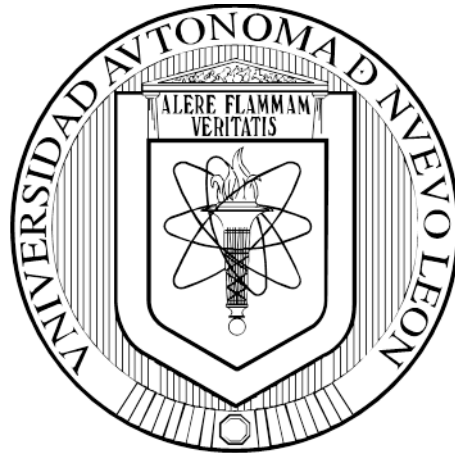


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**PERFIL DE MICRORNAS Y CITOCINAS EN PACIENTES ADULTOS CON  
INFECCIÓN RESPIRATORIA VIRAL AGUDA COMO BIOMARCADORES  
DE GRAVEDAD**

**POR**

**Q.C.B. ERICK ROEL ARREDONDO LOZA**

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

**AGOSTO, 2016**

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



**PERFIL DE MICRORNAS Y CITOCINAS EN PACIENTES ADULTOS CON  
INFECCIÓN RESPIRATORIA VIRAL AGUDA COMO BIOMARCADORES  
DE GRAVEDAD**

**POR**

**Q.C.B. ERICK ROEL ARREDONDO LOZA**

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

**AGOSTO, 2016**

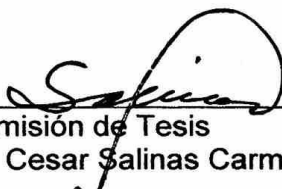
**PERFIL DE MICRORNAS Y CITOCINAS EN PACIENTES ADULTOS CON  
INFECCION RESPIRATORIA VIRAL AGUDA COMO BIOMARCADORES DE  
GRAVEDAD**

Aprobación de la Tesis:




---

Director de Tesis  
Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco



---

Comisión de Tesis  
Dr. C. Mario Cesar Salinas Carmona



---

Comisión de Tesis  
Dr. C. Alma Yolanda Arce Mendoza



---

Dra. Med. Raquel Garza Guajardo  
Subdirectora de Estudios de Postgrado

## **DEDICATORIA**

Primeramente, a Dios, quien permitió la realización de este paso en mi carrera.

A mi familia, que siempre ha estado apoyándome incondicionalmente y quienes son mi motor para seguir superándome. Gracias a mi papá Genaro que ha hecho un tremendo esfuerzo para darnos educación a mí y todos mis hermanos. Gracias a mi mamá Lupita, por siempre escucharme y reconfortarme cuando más lo he necesitado. A mis hermanos por también aconsejarme y animarme en los momentos de flaqueza (Alan, Luigi, Evelyn y Genaro).

## AGRADECIMIENTOS

A mi Comisión de Tesis, especialmente al Dr. Adrián Rosas Taraco a quien considero un excelente tutor ya que me orientó no solo en los aspectos académicos sino también personales, porque siempre tuvo tiempo para sus estudiantes y les da la oportunidad de crecer en el ámbito científico. A la Dra. Alma Yolanda Arce (Dra. AYA con mucho cariño) y al Dr. Mario Cesar Salinas quienes me dieron la oportunidad de superarme y contribuyeron a mi formación. Sinceramente, muchas gracias.

A mis amigos de la facultad: Roberto y Servando. A mis *roomies*: Omar, Erick, Cesar y Diego que siempre que me sentía sin ánimos, estaban allí apoyándome y distrayéndome para relajarme. Especialmente a Omar y mi primo Orlando porque me apoyaron y enseñaron a realizar mapas de calor.

A mi segunda familia durante estos últimos dos años, mis amigos de la Maestría (Roque, Hector, Daniel, Sonia, Claudia, Elda y Yolanda) por que juntos pasamos momentos inolvidables que siempre atesoraré.

A la QCB Azalia Martínez que siempre estuvo dispuesta a ayudarme en la realización de los experimentos y sin ella este proyecto no se hubiera llevado a cabo.

A Stephen y Jorge que en estos últimos seis meses hicieron más amenos los días de arduo trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que me apoyó con la beca para realizar el posgrado, así como por financiar este proyecto CONACYT- SALUD-2013-01- 201871.

Por último, a todas esas personas que de alguna u otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

## RESUMEN

Q.C.B. Erick Roel Arredondo Loza

Fecha de disertación: Agosto, 2016

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título:

**Perfil de microRNAs y citocinas en pacientes adultos con infección respiratoria viral aguda como biomarcadores de gravedad**


Número de páginas:192

**Candidato para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunología Médica.**

### **Área de estudio: Inmunología en Infecciones virales**

**Propósito y Método de Estudio:** Las infecciones respiratorias virales son un problema de salud pública mundial debido a su rápida y fácil transmisión a través de aerosoles respiratorios. Los agentes virales más comunes que causan este tipo de infecciones son: virus de Influenza A, Rinovirus, Parainfluenza, Influenza B, Coronavirus, Virus Sincitial Respiratorio y Metaneumovirus. Los microARNs son ácidos nucleicos de cadena sencilla y pequeña (18-25 nucleótidos) que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional; estos han sido utilizados como biomarcadores en otro tipo de patologías como el cáncer. El propósito de este estudio fue investigar los perfiles de expresión de microARNs y citocinas que se encuentran a nivel de mucosa nasal de pacientes adultos infectados con este tipo de virus, para lograr esto se reclutaron personas mayores de edad con diagnóstico clínico de infección respiratoria aguda a los cuales se les confirmó la etiología de la infección por técnicas moleculares, se evaluó la gravedad de la sintomatología durante siete días además de medir los niveles de expresión de microARNs asociados a inflamación en lavado nasal. Así también, se cuantificaron 26 citocinas tanto en la misma muestra como en plasma.

**Contribuciones y Conclusiones:** Se reclutaron 100 pacientes de los cuales 82 resultaron con infección respiratoria ocasionada por al menos un agente viral. Fueron comunes las infecciones por múltiples virus (co-infecciones). Se obtuvieron los perfiles de expresión de microARNs en lavado nasal de los pacientes dependiendo si contaban con mono infección o co-infecciones virales, así como los perfiles diferenciales de citocinas. Independientemente del agente viral, algunos microARNs (miR-29c, miR-132 y miR-326), así como citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ), ambos en lavado nasal correlacionaron con la gravedad de la sintomatología lo que los hace candidatos a ser biomarcadores de gravedad.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. C. Adrián G. Rosas Taraco  
Director de Tesis

## TABLA DE CONTENIDO

<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	i
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS</b> .....	ix
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 INFECCIONES RESPIRATORIAS: UN PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA .	2
1.1.1 Infecciones respiratorias virales.....	2
1.1.2 Epidemiología de infecciones respiratorias virales .....	13
1.2 RESPUESTA INMUNE ANTIVIRAL.....	21
1.2.1 Epitelio respiratorio .....	21
1.2.2 Familia de RLR's .....	23
1.2.3 Familia de TLR's.....	25
1.2.4 Familia de NLR's .....	29
1.2.5 Interferones.....	29
1.2.6 Células inmunes, citocinas pro-inflamatorias, anti-inflamatorias y quimiocinas.....	33
1.3 MICROARNS .....	35
1.3.1 Definición de microARN.....	35
1.3.2 Descubrimiento de los microARNs .....	36
1.3.3 Biogénesis y mecanismo de acción .....	37
1.3.4 Nomenclatura de microARNs.....	40
1.3.5 microARNs en la respuesta inmune.....	41
1.3.6 microARNs en la infección por virus respiratorios.....	46
<b>ANTECEDENTES</b> .....	48
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	51
<b>HIPÓTESIS</b> .....	53
<b>OBJETIVOS</b> .....	55

<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	57
6.1 MATERIAL .....	58
6.1.1 Equipos utilizados .....	58
6.1.2 Reactivos y materiales de laboratorio utilizados .....	58
6.2 RECLUTAMIENTO DE LOS PACIENTES .....	59
6.2.1 Criterios de muestreo.....	59
6.2.2 Consentimiento informado y encuesta de datos sociodemográficos .....	60
6.3 RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	60
6.3.1 Recolección y preparación de exudado faríngeo .....	60
6.3.2 Recolección y preparación del lavado nasal.....	61
6.3.3 Recolección preparación de muestras de sangre venosa .....	61
6.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS AGENTES VIRALES .....	62
6.4.1 Extracción de ácidos nucleicos .....	62
6.4.2 Cuantificación de ácidos nucleicos (NanoDrop 2000) .....	63
6.4.3 xTAG® Respiratory Viral Panel Fast v2 (Luminex) .....	63
6.5 CUANTIFICACIÓN DE LOS AGENTES VIRALES .....	65
6.6 MEDICIÓN DE LA GRAVEDAD DE LA SINTOMATOLOGÍA .....	66
6.6.1 Evaluación subjetiva de la gravedad de la sintomatología.....	66
6.6.2 Cálculo del área bajo la curva.....	66
6.7 CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS .....	67
6.7.1 Inmunoensayo múltiple (tecnología Luminex) .....	67
6.7.2 ELISA para determinación de TGF- $\beta$ 1 .....	68
6.8 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE MICROARNs 69	
6.8.1 Extracción de microARNs en lavado nasal .....	69
6.8.2 Retrotranscripción de microARNs.....	70
6.8.3 Determinación de niveles de expresión de U6.....	71
6.8.4 Determinación de niveles de expresión de miARNs .....	72
6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	73



6.9.3 Creación de mapas de calor (utilizando el software “R”) .....	73
<b>RESULTADOS</b> .....	75
7.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS DE ESTUDIO .....	76
7.2 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS AGENTES VIRALES EN PACIENTES ADULTOS CON INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA .....	78
7.4 PERFIL DE CITOCINAS EN PLASMA Y LAVADO NASAL DE PACIENTES ADULTOS CON INFECCIÓN RESPIRATORIA VIRAL AGUDA.....	93
7.5 PERFILES DE EXPRESIÓN DE MICROARNS EN LAVADO NASAL DE PACIENTES ADULTOS CON INFECCIÓN RESPIRATORIA VIRAL AGUDA.	123
<b>DISCUSIÓN</b> .....	145
<b>CONCLUSIONES</b> .....	170
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	172
<b>REFERENCIAS</b> .....	174

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1** Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple para detección de agentes virales utilizando el estuche xTAG® Respiratory Viral Panel Fast v2.

**Tabla 2.** Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para cargas virales utilizando estuches de Genesig y QuantiNova

**Tabla 3.** Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para amplificación de U6 utilizando iQ SYBR Green Supermix.

**Tabla 4** Condiciones de reacción para amplificación de microARNs con sondas TaqMan® utilizando iQ Supermix (Bio-Rad).

**Tabla 5.** Características sociodemográficas de los grupos de estudio.

**Tabla 6.** Cantidad de pacientes de acuerdo a las distintas co-infecciones.

## LISTA DE FIGURAS

**Fig. 1** Comparativo de incidencia (tasa por 100,000 habitantes) de infecciones respiratorias agudas, por semana epidemiológica, México 2015 – 2016

**Fig. 2** Vía de señalización dependiente de RIG-I y MDA-5.

**Fig. 3** Vía de señalización dependiente de TLR3

**Fig. 4** Vía de señalización dependiente de TLR7 y TLR9

**Fig. 5** Vía de señalización de IFNAR

**Fig. 6** Biogénesis y mecanismos de acción de microARNs

**Fig. 7** Proporción de pacientes con infección respiratoria viral aguda

**Fig. 8** Frecuencias absolutas de detección de los agentes virales analizados.

**Fig. 9** Proporción de pacientes con uno, dos, tres, cuatro y hasta cinco agentes virales causando infección respiratoria viral aguda.

**Fig. 10** Cargas virales observadas en los pacientes dependiendo del tipo viral.

**Fig. 11** Correlación entre los niveles de logaritmo base 10 de las cargas virales de Influenza B con la edad de los pacientes.

**Fig. 12** Valores de las cargas virales de Metaneumovirus en pacientes adultos con infección respiratoria aguda dependiendo el género.

**Fig. 13** Puntaje de cada uno de los síntomas por día de estudio y género de los pacientes con enfermedad respiratoria aguda.

**Fig. 14** Clasificación de los pacientes de acuerdo a la sumatoria de los puntajes de los síntomas reportados en el día del reclutamiento.

**Fig. 15** Niveles de cargas virales observados en los pacientes adultos con infección respiratoria aguda dependiendo la gravedad en el día del reclutamiento.

**Fig. 16** Área bajo la curva de los síntomas analizados.

**Fig. 17** Correlación entre los niveles de logaritmos base 10 de cargas virales de Influenza B con las áreas bajo la curva del síntoma de la tos.

**Fig. 18** Perfil de citocinas plasmáticas en controles sanos, pacientes Influenza B positivos (monoinfección), Influenza B positivos con co-infección e Influenza B negativos con co-infección.

**Fig. 19** Niveles de IL-12 (p70), IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-28A en lavado nasal de controles sanos, pacientes Influenza B positivos (monoinfección), Influenza B positivos con co-infecciones e Influenza B negativos con co-infecciones.

**Fig. 20** Niveles plasmáticos de GM-CSF, IL-13, IL-1 $\beta$  e IL-17E en controles sanos, pacientes VSR positivos (monoinfección), VSR positivo con co-infecciones y VSR negativo con co-infecciones.

**Fig. 21** Niveles de IL-6 en lavado nasal de controles sanos, pacientes VSR positivos (monoinfección), VSR positivos con co-infecciones y VSR negativos con co-infecciones.

**Fig. 22** Niveles de expresión de algunas citocinas plasmáticas en controles sanos, pacientes Influenza A positivos (monoinfección), Influenza A positivo con co-infecciones e Influenza A negativo con co-infecciones.

**Fig. 23** Niveles de IL-1 $\beta$  e IL-6 en lavado nasal de controles sanos, pacientes Influenza A positivos (monoinfección), Influenza A positivos con co-infecciones e Influenza A negativos con co-infecciones.

**Fig. 24** Niveles de citocinas plasmáticas en controles sanos, pacientes Coronavirus positivo (monoinfección), Coronavirus positivo con co-infecciones y Coronavirus negativo con co-infecciones.

**Fig. 25** Niveles de IL-6 e IL-28A en lavado nasal de controles sanos, pacientes Coronavirus positivo (monoinfección), Coronavirus positivo con co-infecciones y Coronavirus negativo con co-infecciones.

**Fig. 26** Niveles de citocinas plasmáticas en controles sanos, pacientes Parainfluenza positivos con co-infecciones y Parainfluenza negativos con co-infecciones.

**Fig. 27** Niveles de IL-12 (p70), IL-5, IL-6 e IL-28A en lavado nasal de controles sanos, pacientes Parainfluenza positivos y negativos con co-infecciones.

**Fig. 28** Niveles de citocinas plasmáticas en controles sanos, pacientes Rinovirus positivo (monoinfección), Rinovirus positivo con co-infecciones y Rinovirus negativo con co-infecciones.

**Fig. 29** Niveles de IL-4, IL-6 e IL-28A en lavado nasal de controles sanos, pacientes Rinovirus positivo (monoinfección), Rinovirus positivo con co-infecciones y Rinovirus negativo con co-infecciones.

**Fig. 30** Niveles de citocinas plasmáticas en controles sanos, pacientes Metaneumovirus positivo (monoinfección), Metaneumovirus positivo con co-infecciones y Metaneumovirus negativo con co-infecciones.

**Fig. 31** Niveles de concentración de IL-10, CCL20, IL-6 y TGF- $\beta$  en lavado nasal de pacientes adultos con infección respiratoria viral aguda analizados en el día 1 y 7.

**Fig. 32** Mapa de calor que muestra las correlaciones entre los mismos niveles de citocinas plasmáticas o de lavado nasal en pacientes adultos con infección respiratoria viral aguda.

**Fig. 33** Mapa de calor que muestra las correlaciones entre los niveles de cargas virales y citocinas plasmáticas o de lavado nasal en pacientes adultos con infección respiratoria aguda.

**Fig. 34** Mapa de calor que muestra las correlaciones entre los niveles de citocinas en plasma y de lavado nasal con las áreas bajo la curva de los síntomas evaluados en pacientes adultos con infección respiratoria viral aguda.

**Fig. 35** Mapa de calor que muestra las correlaciones entre los mismos valores de citocinas analizadas en lavado nasal de pacientes adultos con infección respiratoria viral aguda.

**Fig. 36** Mapa de calor que muestra las correlaciones entre los niveles de citocinas y las áreas bajo la curva de los síntomas evaluados en pacientes adultos con infección respiratoria viral aguda dependiendo la presencia de Influenza B, Coronavirus, Rinovirus, Parainfluenza e Influenza A con co-infecciones en todos los casos

**Fig. 37** Niveles de expresión de microARNs en controles sanos, pacientes adultos Influenza B positivos con co-infecciones e Influenza B negativos con co-infecciones.

**Fig. 38** Niveles de expresión de miR-26 y miR-146a en controles sanos, pacientes Influenza B positivos (monoinfección), Influenza B positivos con co-infecciones y pacientes Influenza B negativos con co-infecciones.

**Fig. 39** Niveles de expresión de microARNs en controles sanos, pacientes VSR positivos con co-infecciones y VSR negativos con co-infecciones.

**Fig. 40** Niveles de expresión de microARNs en controles sanos, pacientes Rinovirus positivo con co-infecciones y Rinovirus negativo con co-infecciones.

**Fig. 41** Niveles de expresión de miR-16, miR-146a y miR-326 en controles sanos, pacientes Rinovirus positivo (monoinfección), Rinovirus positivo con co-infección y Rinovirus negativo con co-infecciones.

**Fig. 42** Niveles de expresión de microARNs en controles sanos, pacientes Influenza A positivos con co-infecciones e Influenza A negativos con co-infecciones.

**Fig. 43** Niveles de expresión de miR-29c, miR-132 y miR-146a en controles sanos, pacientes Influenza A positivos (monoinfección), Influenza A positivos con co-infecciones e Influenza A negativos con co-infecciones.

**Fig. 44** Niveles de expresión de microARNs en controles sanos, pacientes Coronavirus positivo con co-infecciones y Coronavirus negativo con co-infecciones.

**Fig. 45** Niveles de expresión de microARNs en controles sanos, pacientes Parainfluenza positivo con co-infecciones y Parainfluenza negativo con co-infecciones.

**Fig. 46** Niveles de expresión de microARNs en controles sanos, pacientes Metaneumovirus positivo con co-infecciones y Metaneumovirus negativo con co-infecciones.

**Fig. 47** Niveles de expresión de miR-21 en pacientes adultos con infección respiratoria viral aguda evaluados en el día del reclutamiento (Día 1) y seis días después (Día 7).

**Fig. 48** Niveles de expresión de miR-326 en pacientes adultos con infección respiratoria viral aguda evaluados en el día del reclutamiento (Día 1) y seis días después (Día 7).

**Fig. 49** Mapa de calor que muestra las correlaciones entre los niveles de expresión de microARNs y gravedad de la sintomatología (AUC) en pacientes adultos infectados con al menos un agente viral (infección viral), Influenza B, Coronavirus, Rinovirus, Parainfluenza, Influenza A o Metaneumovirus.



**Fig. 50** Mapa de calor que indica las correlaciones entre los niveles de expresión de microARNs con los de citocinas en lavado nasal dependiendo la presencia del agente viral.

**Fig. 51** Correlación entre los niveles de cargas virales de Rinovirus y de expresión de miR-29c en pacientes adultos con infección respiratoria.

**Fig. 52** Modelo de regulación de la respuesta inmune por microARNs en pacientes infectados con Influenza B con co-infecciones.

**Fig. 53** Modelo de regulación de la respuesta inmune por microARNs en pacientes mono infectados y co-infectados con Rinovirus.

**Fig. 54** Modelo de regulación de la respuesta inmune en pacientes mono infectados con Influenza A.

**Fig. 55** Modelo de regulación de la respuesta inmune en pacientes con Influenza A acompañado de co-infecciones.

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

‰: Por ciento  
°C: Grados Celsius  
µL: Microlitros  
µm: micrómetros  
AND: Ácido desoxirribonucleico  
ARN: Ácido ribonucleico  
ATP: Adenosin Trifosfato  
CDC: Centro de Control de Enfermedades (de *Center for Diseases Control*)  
cDC: Células dendríticas convencionales (de *conventional dendritic cells*)  
HA: Hemaglutinina  
IFN: Interferón  
IRAK1: Quinasa 1 asociada al receptor de IL-1 (de *interleukin 1 receptor associated kinase 1*)  
kb: kilobases  
LPS: Lipopolisacárido  
MDA5: Proteína 5 asociada a diferenciación de melanoma (de *melanoma differentiation-associated protein 5*)  
microARN o miR: microácido ribonucleico  
mL: Mililitros  
NA: Neuraminidasa  
NK: Asesinas naturales (de *Natural killer*)  
PAMP: Patrón molecular asociado a patógeno (de *pathogen-associated molecular pattern*)  
pb: Pares de bases  
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa  
pDC: Células dendríticas plasmacitoides (de *plasmacytoid dendritic cells*)  
pH: Potencial de Hidrógeno  
PRR: Receptor de reconocimiento de patrón (de *pattern recognition receptor*)  
RIG-I: Gen 1 inducible por ácido retinóico (de *Retinoic acid-inducible gene 1*)  
RLR: Receptores tipo RIG (de *RIG-I-like receptor*)  
RPM: Revoluciones por minuto  
TLR: Receptores tipo Toll (de *Toll-like receptor*)  
TNF: Factor de necrosis tumoral (de *tumor necrosis factor*)  
TRAF6: Factor 6 asociado al receptor de TNF (de *TNF receptor-associated factor 6*)  
VSR: Virus Sincitial Respiratorio

# **INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 INFECCIONES RESPIRATORIAS: UN PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA

Las infecciones respiratorias son aquellas que afectan tanto las vías aéreas superiores (cavidades nasales, nasofaringe, faringe y laringe) como inferiores (tráquea, bronquios, bronquiolos y pulmones) y son ocasionadas por algún agente patógeno [1].

Se pueden clasificar como infecciones del tracto respiratorio superior, las cuales pueden ocasionar el resfriado común, laringitis, faringitis, rinitis aguda, rinosinusitis aguda y/u otitis. Por otro lado, las del tracto respiratorio inferior dan origen a traqueítis, bronquitis, bronquiolitis y/o neumonía [2].

El modo de transmisión de este tipo de infecciones puede ser de varias formas [3]: 1) contacto directo entre persona-persona, es decir, los agentes patógenos son transferidos desde la piel contaminada de una persona infectada a otra sana, 2) contacto indirecto a través de fómites como celulares, manijas de puertas entre otras estructuras que hayan sido contaminadas y 3) aerosoles respiratorios los cuales pueden ser partículas grandes ( $>5 \mu\text{m}$ ) o pequeñas ( $<5 \mu\text{m}$ ) [4]. En todos los casos es necesaria la inoculación de los agentes en la mucosa nasal u oftálmica [3].

#### 1.1.1 Infecciones respiratorias virales

Los agentes patógenos causantes de este tipo de infecciones pueden ser desde hongos, parásitos, bacterias (*Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Coxiella burnetti*, *Legionella pneumophila*) y virus siendo los últimos dos tipos los más comunes.

Entre los virus causantes de infecciones respiratorias agudas se encuentra:

## **Virus de Influenza**

Pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Las diferencias antigénicas en su nucleoproteína (NP) y proteína de matriz (M1) permiten clasificar a los virus de Influenza en los tipos A, B o C [5]. Todos ellos tienen un genoma de ARN segmentado (ocho moléculas separadas) de cadena sencilla y sentido negativo, su cápside es helicoidal con envoltura [6].

El virus de Influenza A se encuentra envuelto por una membrana que deriva de la célula infectada. Los ocho fragmentos codifican al menos once marcos de lectura abiertos. Se encuentran cubiertos por tres proteínas: hemaglutinina (HA), matriz 2 (M2) y neuraminidasa (NA). HA es una proteína de membrana integral tipo I que se encuentra glicosilada y cuya función es de proteína de unión al receptor, así como de fusión [7]. La proteína pequeña M2 funciona como canal de protones el cual es necesario para la replicación viral [8]. Por otro lado, la proteína NA es una glicoproteína de membrana integral tipo II con actividad enzimática de sialidasa la cual es necesaria para la hidrólisis del ácido siálico de las células hospederas permitiendo la liberación de nuevos viriones, así como de glicoproteínas propias del virus para evitar la agregación de los mismos [9].

El virus de Influenza A puede ser subclasificado de acuerdo a la antigenicidad de la HA y NA. Actualmente, 18 HA (H1 – H18) y 11 NA (N1 – N11) subtipos han sido identificados [10]. Es un patógeno zoonótico que infecta un amplio rango de especies mamíferas y aves [11]. Los hospederos naturales del virus de Influenza A son aves acuáticas como patos, gansos y gaviotas [12]. Los tipos H1N1, H2N2 y

H3N2 han causado pandemias en los humanos [13]. Se han reportado casos de transmisiones desde cerdos y aves a humanos [14]

El virus de Influenza B fue identificado por primera vez en 1940 [15]. A diferencia del virus de Influenza A, este no se subclasifica de acuerdo a las moléculas de HA y NA, sin embargo, se han caracterizado antigénica- y genéticamente dos linajes: B/Victoria/2/87 (linaje Victoria) y B/Yamagata/16/88 (linaje Yamagata) [16]. No cuenta con un hospedero natural; a pesar de haber un reporte de aislamiento en focas, este no mostró adaptación y además fueron iguales a los aislados en humanos [17].

El virus de influenza B y A comparten muchas características, sin embargo, la capacidad de evolución del primero es muy reducida en comparación con el segundo. Se habla de aproximadamente un rango de  $1 \times 10^{-3}$  a  $8 \times 10^{-3}$  sustituciones por sitio por año en el genoma del virus de Influenza A [18], por lo que se consideran evolutivamente dinámicos con altas tasas de mutación. No existe recombinación entre ambos virus por lo que es casi improbable que el virus de Influenza B pueda causar una pandemia [19].

En el caso de Influenza A, cuando las mutaciones ocasionan un cambio en la cadena de aminoácidos que conforman los determinantes antigénicos de las glicoproteínas de superficie HA y NA, pueden dar lugar a ventajas selectivas para las cepas virales por lo que les permite evadir la respuesta inmune de memoria. A este fenómeno se le denomina “deriva antigénica” y provoca brotes de gripe relativamente leves cada uno a tres años. Por otro lado, el “cambio antigénico”, causado por el reordenamiento o la mezcla del genoma viral segmentado durante

una co-infección en animales no humanos, genera variaciones antigénicas importantes y periódicamente produce pandemias [6].

Los virus de influenza tienen como blanco principal las células epiteliales de la mucosa respiratoria. El sitio de unión a receptor de la HA viral es necesario para la unión a la galactosa del ácido siálico presente en la superficie de las células del hospedero [20]. Una vez dada la interacción virus-receptor, el complejo es endocitado, se acidifica el endosoma tardío por importación de protones lo cual ocurre de forma fisiológica. Posteriormente, la HA viral sufre un cambio conformacional el cual permite acercar aún más la membrana viral y endosomal hasta su fusión. Para la liberación del ARN viral en el citoplasma, el canal iónico M2 viral transporta protones que se encuentran dentro del endosoma al interior del virión. Como resultado de esto, el ARN se disocia de la proteína M1 mediante la interrupción de la interacción con ribonucleoproteínas la cual es sensible al pH. El ARN viral es entonces transportado dentro del núcleo en un proceso dependiente de ATP para iniciar la transcripción y traducción [21]. Posterior a la síntesis del ARNm a partir del molde del genoma viral, son sintetizadas las proteínas en el citosol. La nucleoproteína (NP) junto con la RNA polimerasa interactúa con el ARN viral para formar ribonucleoproteínas. La proteína M1 interactúa con el dominio C-terminal de HA y NA en la membrana plasmática formando “parches” de estas proteínas debido a que las agrupa. Después, las ribonucleoproteínas sintetizadas *de novo* interactúan con M1 y ocurre un proceso de brotación formando nuevos viriones. Esto sucede preferencialmente en la membrana apical en caso de ser células epiteliales con membranas diferenciadas [22].

## **Virus de Parainfluenza**

Estos virus fueron descubiertos a finales de la década de los 50's, cuando demostraron que tres diferentes virus aislados de niños con infección respiratoria del tracto inferior, eran únicos y diferentes al virus de influenza, con los cuales tenían algunas similitudes. Esta nueva familia de virus respiratorios crecía pobremente en huevos embrionados y compartían muy pocos determinantes antigénicos con los virus de la familia *Orthomyxoviridae*. Posteriormente, en 1959 fue descubierto un cuarto tipo de virus con las mismas características a los tres anteriores, por lo que se creó un nuevo grupo taxonómico denominado "virus de Parainfluenza" [23].

Los virus de Parainfluenza humanos se encuentran genética- y antigénicamente divididos en tipos: 1, 2, 3 y 4. Otros subtipos principales de Parainfluenza tipo 4 (A y B) [24], así como subgrupos/genotipos del tipo 1 y 3 se han descrito [25, 26]. Al microscopio electrónico se observan envueltos por una membrana lipídica y pleomorfos, miden entre 150 – 250 nm pero se han reportado agregados de viriones [27]. Las partículas virales usualmente contienen ARN de cadena sencilla y polaridad negativa. El genoma está comprendido por aproximadamente 15,000 nucleótidos [28] y se encuentra organizado para codificar al menos seis proteínas estructurales comunes: N (proteína de nucleocápside), P (fosfoproteína), M (proteína de membrana), F (proteína de fusión), HN (hemaglutinina-neuraminidasa) y L (proteína de nucleocápside larga).

El proceso de replicación viral es muy parecido al de los virus de Influenza, inicia con la fusión de las membranas lipídicas tanto del virus como de la célula hospedera. Posteriormente, la nucleocápside es expulsada al citoplasma donde se



lleva a cabo la transcripción por parte de la proteína L (ARN polimerasa dependiente de ARN). Después, la maquinaria ribosomal de la célula del hospedero traduce los ARNm en proteínas virales. Estas dirigen la replicación del genoma del virus, primero en una cadena de ARN en sentido positivo y luego en una hebra negativa. Una vez producidos, estas cadenas sencillas de ARN en sentido negativo son encerrados dentro de la cápside con la proteína NP y puede tener dos destinos: 1) ser usado en futuras rondas de transcripción y replicación o 2) ser empaquetado para ser expulsado como un nuevo virión [23].

### **Coronavirus**

Los Coronavirus son un grupo grande de virus pertenecientes al orden *Nidovirales* el cual incluye a las familias: *Coronaviridae*, *Arteriviridae* y *Roniviridae*. La subfamilia *Coronavirinae* junto con *Torovirinae* son miembros de la familia *Coronaviridae*. La primer subfamilia anteriormente mencionada se divide en cuatro grupos: alfa, beta, gamma y delta [29]. Dentro de los Coronavirus humanos se encuentran dos alfas: HCoV-229E y HCoV-NL63; y dos betas: HCoV-OC43 y HCoV-HKU1. Los subtipos 229E y OC43 fueron aislados en 1967 [30, 31] mientras que NL63 y HKU1 se identificaron recientemente a raíz de la epidemia del síndrome respiratorio agudo por Coronavirus (SARS-CoV) [32, 33]. Dos casos especiales son SARS-CoV y MERS-CoV, ambos son Coronavirus del tipo beta que han causado epidemias importantes recientemente.

Los coronavirus son virus envueltos en una membrana lipídica, su genoma es de ARN de cadena sencilla, polaridad positiva y no segmentado, además cuenta

con el genoma más grande de todos los virus de ARN conocidos, comprendiendo aproximadamente 30 kilobases. En el extremo 5' y 3' de la molécula de ARN se encuentra una caperuza y una cola de poli-adenosinas, respectivamente, permitiendo actuar como un ARNm para ser traducido [34].

La estructura del virus es esférica con un diámetro de 125 nm aproximadamente. La característica morfológica más importante de los Coronavirus son las proyecciones en forma de espinas que emanan de la superficie del virión dándoles un aspecto de corona solar, y debido a estas características se les nombró de tal forma [35].

Las partículas virales contienen cuatro proteínas estructurales principales: pico (S de "spike"), de membrana (M), de envoltura (E) y de nucleocápside (N), todas ellas codificadas en el tramo final del extremo 3' del genoma viral. Los homotrímeros de la proteína S conforman la estructura de pico característica en la superficie del virus [36], además es una glicoproteína de fusión clase I que media la unión del virus al receptor del hospedero [37]. La proteína M es la más abundante de las proteínas estructurales, contiene tres dominios transmembranales y se piensa le da la forma al virión. La proteína E se encuentra en cantidades pequeñas dentro del virión y tiene actividad de canal iónico facilitando el ensamble y liberación del virus durante la replicación. La proteína N es la única que se encuentra en la nucleocápside y se une al ARN viral, es la encargada de encapsidar el genoma antes de que el virus sea liberado de la célula hospedera.

La unión del virión a la célula hospedera inicia con la interacción entre la proteína S con su receptor, esta es determinante para que ocurra la infección y

además, determina el tropismo por ciertos tejidos. Muchos Coronavirus utilizan peptidasas como receptores celulares, sin embargo, no se sabe porque cuando las proteínas receptoras carecen del dominio que otorga la actividad de peptidasa, el virus tiene capacidad de entrar a la célula. Una vez dentro del endosoma, este se acidifica y una catepsina hidroliza la proteína S permitiendo la liberación de un péptido el cual se inserta en la membrana del endosoma y fusiona la membrana viral lo que permite la liberación del genoma en el citoplasma.

Una vez en el citoplasma, es necesaria la traducción del ARNm que codifica para la proteína replicasa, encargada de crear copias del genoma viral, y proteínas S, E y M que posteriormente ingresan en el retículo endoplásmico y siguen la vía secretora, los genomas virales son encapsidados por la proteína N formando viriones maduros en el compartimento intermedio entre el retículo endoplásmico-complejo de Golgi, [38]. Una vez completado el ensamble, los viriones son transportados en vesículas hacia la membrana celular donde son exocitados.

## **Rinovirus**

Los Rinovirus fueron descubiertos en la década de los 50's en un esfuerzo para identificar el agente etiológico del resfriado común. Son miembros de la familia *Picornaviridae* y del género *Enterovirus*. Su genoma es de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 7,200 pb (pares de bases) y está estructurado en un solo gen del cual se pueden originar 11 proteínas tras un proceso de hidrólisis por proteasas virales [39]. El virión tiene forma icosaédrica, mide 27 nm de diámetro aproximadamente y no está envuelto por una membrana lipídica a

diferencia de otros virus. Cuatro proteínas (VP1 – VP4) conforman la cápside viral que contiene el ARN, mientras otras proteínas consideradas no estructurales se encuentran involucradas en los procesos de ensamblaje y replicación del virus.

Se han descrito alrededor de 100 serotipos los cuales a través de técnicas de secuenciación de las regiones codificantes de la cápside viral, así como otras no codificantes permitió clasificar a los Rinovirus en dos tipos: 74 serotipos en HRV-A (“Human Rhinovirus-A”) y 25 serotipos en HRV-B (“Human Rhinovirus B”). El desarrollo de técnicas moleculares altamente sensibles permitió una mejor clasificación dando lugar en el 2009 a un nuevo tipo: HRV-C [40].

Dependiendo del tipo de receptor (ICAM-1 o LDL-R) el virus ingresa dentro de la célula hospedera por endocitosis dependiente o independiente de clatrina o bien por macropinocitosis [41]. Una vez en el endosoma, los viriones sufren cambios conformacionales que provocan el desnudamiento en un proceso mediado por ICAM-1 y/o el ambiente ácido dentro de la vesícula [41, 42]. Se piensa que el genoma viral cruza la membrana del endosoma hacia el citosol a través de un poro formado por proteínas virales o bien por la ruptura de la membrana. Una vez en el citoplasma, el complejo ribosomal del hospedero traduce el ARN viral dando origen a una poliproteína que después es hidrolizada en 11 péptidos. Posteriormente, el virus es ensamblado y liberado al exterior [43].

### **Virus Sincitial Respiratorio**

El Virus Sincitial Respiratorio Humano (VSR) fue aislado por primera vez de chimpancés en 1956 [44] y posteriormente de niños con enfermedad respiratoria

grave del tracto respiratorio inferior [45]. Pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, género *Pneumovirus*, subfamilia *Pneumovirinae*.

VSR es un virus envuelto por una membrana lipídica con genoma de ARN no segmentado de cadena sencilla y polaridad negativa, contiene 10 genes que codifican para 11 proteínas y dado que dos marcos de lectura abiertos se empalman en el ARNm de M2, este puede dar origen a dos proteínas de matriz distintas: M2-1 y M2-2. Nueve de las once proteínas son estructurales y las dos restantes dirigen el proceso de replicación viral una vez el virus infecta la célula hospedera [46].

La membrana viral del VSR contiene tres proteínas: 1) glicoproteína G, la cual funciona en la unión al receptor en la célula hospedera; 2) glicoproteína de fusión (F), la cual se encarga de la fusión de la membrana celular con la viral; y 3) proteína hidrofóbica SH la cual no participa en ninguno de los procesos anteriormente mencionados. El virus comprende además otras cinco proteínas estructurales: proteína grande (L), de nucleocápside (N), fosfoproteína (P), de matriz (M) y M2-1; y dos no estructurales: NS1 y NS2

El VSR muestra una mínima heterogeneidad antigénica. Sin embargo, dos grupos principales: VSR-A y VSR-B, con diferencias antigénicas en las proteínas G, F, N y P han sido bien caracterizados. La proteína G es la más variable con solo 53% de homología en la secuencia de aminoácidos entre los grupos A y B. Por otro lado, las proteínas F y N cuentan con un grado alto de homología genética y antigénica [47].

La replicación viral inicia desde la unión de la membrana lipídica del virus con la del hospedero. Después, la envoltura viral se fusiona con la del endosoma en un

proceso mediado por la proteína F y de esta forma la nucleocápside es liberada en el citoplasma. El ARN viral en sentido negativo sirve como molde para el ARNm el cual es traducido dando origen a las distintas proteínas virales. Posteriormente, los viriones son ensamblados y son liberados por la destrucción de la célula [47, 48]

### **Metaneumovirus**

Fue descubierto en Holanda en el 2001 cuando se aisló de pacientes pediátricos que padecían síntomas similares a los causados por la infección del VSR. El Metaneumovirus pertenece al orden *Mononegavirales* dentro de la familia y subfamilia *Paramyxoviridae* y *Pneumovirinae*, respectivamente [49].

De forma similar al VSR, este se clasifica en dos genotipos: A y B. Basándose en la secuenciación de la glicoproteína de unión (G) y de fusión (F) que se encuentran en la superficie, estos dos genotipos son subdivididos en: A1, A2, B1 y B2. El subgrupo A2 se vuelve a subdividir en A2a y A2b [50].

El genoma del Metaneumovirus está conformado por ARN no segmentado de cadena sencilla y polaridad negativa donde se encuentran ocho genes que codifican para nueve proteínas: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glicoproteína de fusión (F), factor de transcripción putativo (M2-1), factor regulador de síntesis de ARN (M2-2), glicoproteína pequeña hidrofóbica (SH), glicoproteína de unión (G) y polimerasa viral (L) [51]. La envoltura contiene tres glicoproteínas de superficie (F, SH y G), dentro se encuentra la nucleocápside donde está el ARN asociado con las proteínas P, N, L, M2-1 y M2-2.

El ciclo de replicación del Metaneumovirus inicia con la unión del virus a la célula del hospedero, la cual está dirigida por la proteína G que se asocia con los receptores heparan-sulfato. La proteína de fusión (F) sufre un hidrólisis por proteasas liberando un dominio que actúa fusionando la membrana viral con la celular, de esta forma el complejo de ribonucleoproteína viral que contiene el genoma viral se libera en el citoplasma. Este último, sirve como molde para la síntesis de ARNm y complementario (antigenoma). Luego de la traducción, las proteínas M y complejos de ribonucleoproteínas virales son transportados a la membrana celular, por otro lado, las glicoproteínas F, G y SH son transportadas desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi y después a la membrana plasmática. Finalmente, los nuevos viriones son ensamblados y liberados de la membrana plasmática en un proceso de brotación [52, 53].

### **1.1.2 Epidemiología de infecciones respiratorias virales**

Debido a la fácil forma de transmisión en comparación con otros agentes patógenos, las infecciones respiratorias virales cursan con gran incidencia y morbimortalidad en todo el mundo. La World Lung Foundation reportó que la cantidad de muertes por año en el mundo debido a infecciones respiratorias agudas es de 4.5 millones de casos. La tasa de muerte por neumonía es 215 veces más alta en los países en vías de desarrollo en comparación con aquellos de ingresos altos, además entre tres y cinco millones de personas en el mundo contraen infecciones graves de la gripe cada año.

En conjunto, las infecciones respiratorias agudas causan al menos 6% de discapacidad y muerte en el mundo. Estas muertes se producen mayoritariamente

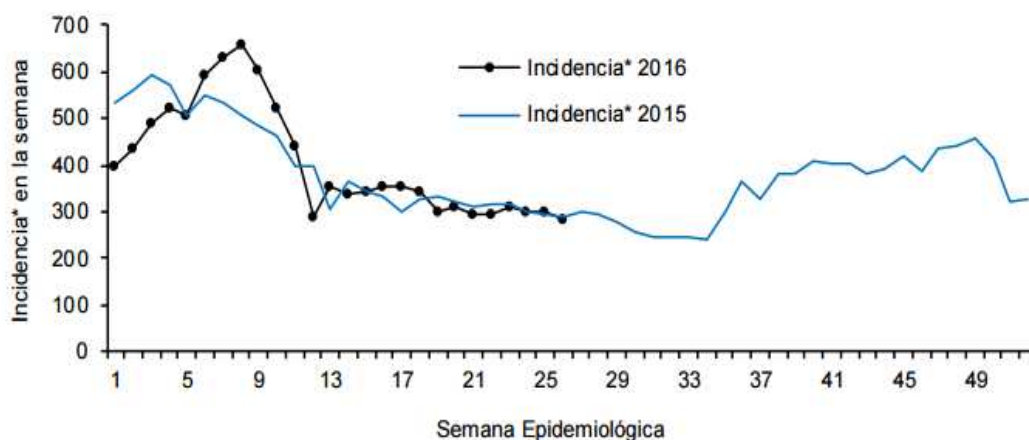
en los países más pobres del mundo, donde los factores más frecuentes asociados a este tipo de infecciones incluyen la malnutrición, contaminación, hacinamiento y consumo de tabaco.

Un estudio realizado donde se evaluaron 188 países, reportaron 18.8 y 15.0 billones de casos de infecciones del tracto respiratorio superior e inferior, respectivamente en el 2013 [54]. En Estados Unidos de América las infecciones respiratorias del tracto superior son las más comunes en la población general, además son una de las principales causas de ausentismo laboral y escolar [55].

En México, durante el 2015 la Secretaria de Salud a través de la Dirección General de Epidemiología reportó una disminución en la tasa de incidencia de infecciones respiratorias agudas (sin considerar Influenza) desde los grupos de edad: 60 - 64 años (tasa por 100,000 habitantes: 20228.21) a 45 - 49 años (16511.62) luego >65 años (16414.60) después 50 – 59 años (15786.37) seguido de 20 – 24 años (12262.91 y por último 25-44 (11384.00) [56]. En estos mismos grupos de edad, la principal causa de muerte se debió a este tipo de infecciones durante el mismo año [57-62].



Los meses con mayor incidencia en nuestro país son durante finales de otoño, todo el invierno e inicios de primavera con una baja durante el verano (**Fig. 1**) [63].



**Fig. 1** Comparativo de incidencia (tasa por 100,000 habitantes) de infecciones respiratorias agudas, por semana epidemiológica, México 2015 – 2016 [63].

### Virus de Influenza

Los virus de Influenza, normalmente circulan en mayor cantidad durante los meses de invierno, iniciando desde el mes de octubre con picos en diciembre, enero y febrero pudiéndose extender hasta el mes de marzo [64].

Conduce a la hospitalización de más de 200,000 personas al año y da como resultado 36,000 muertes por la gripe o complicaciones relacionadas en los Estados Unidos de América, afectando especialmente a grupos de edad avanzada y pacientes pediátricos [65]. Durante el mes de Octubre 2015 a Febrero 2016, se reportaron 896 casos de hospitalizaciones que resultaron positivos para virus de Influenza en este mismo país, donde las personas mayores de 65 años fueron los que tuvieron la mayor tasa de ingreso a unidades de salud [66].

Las epidemias causadas por el virus de Influenza B se notaron, ocurrían cada dos a cuatro años y eran generalmente bien definidas y discretas. El requerimiento de tratamiento médico, visitas a clínicas o hospitalizaciones eran comunes en grupos de todas las edades [67].

En distintos estudios de población adulta y adolescentes donde reportan la frecuencia de detección del virus de influenza B muestran gran variabilidad. En seis, realizados en Estados Unidos van desde 0 – 40.6% [68-73], en Europa de 1.6 – 24.4% [74, 75], y en cuatro estudios con datos de ambas regiones anteriormente mencionadas van desde 9 – 43.2% [76-78]. Estudios en Australia y Brasil reportaron tasas de frecuencia de detección entre 1 – 48% en poblaciones adultas [79-83].

En México a diferencia de las infecciones respiratorias, las tasas de incidencia de Influenza durante el 2015 fueron aumentando conforme la edad de los pacientes: 20 – 24 años (tasa por 100,000 habitantes: 13.95), 25 – 44 años (15.97), 45 – 49 años (18.39), 50 – 59 años (19.05), 60 – 64 años (22.25) y por último, mayores de 65 años (40.14) [84].

En lo que va del 2016, el virus con mayor frecuencia de detección ha sido el de Influenza B. Las entidades con mayor número de casos confirmados de Influenza son: Tabasco, Yucatán, Veracruz, Tamaulipas y Nuevo León; que en conjunto sumaron el 57.1% del total de casos confirmados [85].

### **Parainfluenza**

Los virus de Parainfluenza son comúnmente adquiridos en la comunidad sin distinción de etnia, posición social o geográfica, género o edad. Muchos factores de

riesgo para contraer este virus han sido descritos: desnutrición, hacinamiento, deficiencia de vitamina A, falta de amamantamiento del seno materno, así como exposición a smog y toxinas ambientales [23].

En general, la detección de Parainfluenza aumenta cuando el verano termina e inicia el otoño y nuevamente a inicios de invierno. Se ha reportado diferencia en la estacionalidad dependiendo el tipo de virus, mientras que los tipos 2 y 4 se detectan principalmente entre finales de invierno e inicios de primavera, el tipo 1 y 3 lo hacen como inicialmente se describió [86].

Un estudio que comprendió varios países de América Latina realizado entre 2006 y 2010, reportó que la frecuencia de detección del virus de Parainfluenza en pacientes pediátricos y adultos fue del 3.2% [87]. Mientras que, en China, un análisis realizado en 2009-2011 donde evaluaron, de igual forma, pacientes de un gran rango de edad (1 día – 91 años de edad) encontraron que el 51.3% de las muestras fueron positivas para este virus.[86] .

### **Coronavirus**

Los Coronavirus 229E, OC43, NL63 y HKU1 normalmente circulan en la población humana y causan síntomas leves a moderados de enfermedades respiratorias típicas en individuos inmunocompetentes [31, 88, 89]. Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos y de la tercera edad pueden causar enfermedad grave [90]. Se reportó que en Francia estos Coronavirus son responsables de entre 5-10% de las infecciones del tracto respiratorio superior e inferior, siendo el tipo 229E y HKU1 los más comunes con 33.80% y 32.39% de frecuencia de detección, respectivamente [91].

Dos tipos de Coronavirus han cruzado la barrera inter-especie y causado enfermedades graves e incluso muertes en humanos. SARS-CoV y MERS-CoV aparecieron en el 2002 y 2012, respectivamente [92, 93]. A diferencia de los Coronavirus circulantes comunes, estos eran responsables de una mortalidad elevada cerca del 10% (SARS-CoV) y 20-50% (MERS-CoV) [94, 95].

### **Rinovirus**

El Rinovirus causa enfermedades en todo el mundo durante todo el año. A partir de la década de los 60's, los estudios de las características epidemiológicas y clínicas de la infección por este virus en climas templados llegaron a la conclusión que el pico de incidencia es en otoño con un pico más pequeño durante primavera [96]. Estudios prospectivos más recientes que emplean métodos de detección molecular han replicado estos hallazgos [97]. En general, este virus es el agente causal más común de enfermedad respiratoria viral durante primavera, verano y otoño, a diferencia del virus de Influenza y VSR que predominan en invierno.

Después de la identificación del genotipo tipo C, diversos estudios han tratado de caracterizar la epidemiología molecular del Rinovirus e identificar las características clínicas distintivas según el tipo. Sin embargo, todos los tipos de este virus se han encontrado a lo largo de todos los meses, en climas templados, tropicales, subtropicales y semiáridos [98-100].

Se ha reportado que el Rinovirus es capaz de infectar a las personas de forma asintomática. En adultos de mediana y avanzada edad se ha estudiado poco en comparación con los infantes, sin embargo, dos estudios [101, 102] reportaron

haber detectado este virus en 0% y 2% de adultos asintomáticos aunque las tasas fueron mayores en adultos que eran contactos de niños infectados [103].

Estudios con técnicas moleculares, así como cultivos virales demostraron que el Rinovirus es el agente causal del 50 – 66% del total de casos de resfriado común [104]. Esta es una enfermedad auto-limitada en pacientes inmunocompetentes, con un periodo de incubación promedio de 2 días [105] y afecta a los pacientes durante 7 a 14 días [106, 107]. Los síntomas comunes pueden incluir rinorrea, congestión nasal, dolor de garganta, tos, dolor de cabeza, fiebre, odinofagia y malestar general. Comparado con la gravedad y duración de los síntomas reportados por pacientes con resfriado común asociado con Coronavirus, no hubo diferencias [108]. A pesar de la gravedad relativamente baja, los costos en salud son considerables. En una encuesta realizada a 4,051 hogares en Estados Unidos de América, el impacto económico de las infecciones respiratorias virales (excluyendo al virus de influenza) se estimó en 40 mil millones de dólares anuales tanto en costos directos como indirectos [109].

### **Virus Sincitial Respiratorio**

Los resultados de análisis moleculares muestran que varios genotipos de VSR pueden estar presentes simultáneamente en cualquier temporada independientemente la región [110]. En las regiones templadas, las infecciones por

VSR muestran una estacionalidad con aparición a finales de otoño o principios de invierno, un pico entre mediados de diciembre y principios de febrero y una baja para finales de primavera. En cambio, en los países tropicales, los patrones son menos predecibles y pueden incluir dos picos anuales en primavera y otoño o bien mostrar una tasa de infección constante a lo largo de todo el año. Los seres humanos son el único hospedero conocido del VSR.

La primoinfección por este virus ocurre en la infancia, pero puede haber reinfecciones a lo largo de toda la vida. A diferencia de infantes, en niños mayores y adultos los síntomas están generalmente ausentes o limitados al tracto respiratorio superior, solo en el 25% de los casos sintomáticos es donde puede haber afección del tracto respiratorio inferior (traqueo-bronquitis, bronquitis y/o sibilancias) [111]. Por otro lado, los pacientes inmunocomprometidos, con enfermedad cardiopulmonar crónica o ancianos también son grupos de riesgo por el VSR el cual constituye una causa importante de morbimortalidad en estas poblaciones, incluso se estima que entre 11 – 17 mil personas mueren anualmente debido a infección por VSR en Estados Unidos de América [112-114].

### **Metaneumovirus**

Desde la primera descripción del Metaneumovirus en el 2001, se han descrito casos de infección sin importar situación económica. Las infecciones pueden ocurrir a lo largo de todo el año, sin embargo, algunos estudios han descrito estacionalidad

donde la mayoría de los casos ocurren entre uno a dos meses después de la observada para epidemias del VSR [115].

El Metaneumovirus humano tipo A se asocia con enfermedad clínica más grave [116, 117], sin embargo, otros grupos de investigación relacionan mayor gravedad con el tipo B [118, 119] o concluyen que no hay una asociación [120, 121].

Las infecciones por Metaneumovirus se observan en grupos de todas las edades, pero tienen una alta prevalencia en pacientes pediátricos en primer lugar, seguidos de adultos de la tercera edad quienes sufren de infecciones graves a pesar de las altas tasas de seroprevalencia y son independientes de la inmunosenescencia [122, 123]. Estudios de seroprevalencia indican que a la edad de 25 años, todos los adultos han sido infectados con Metaneumovirus durante al menos una vez a lo largo de su vida, empezando desde los cinco años con altas tasas de seroprevalencia [124, 125].

Las infecciones en adultos por Metaneumovirus, están probablemente subdiagnosticadas debido a la falta de pruebas diagnósticas para detectar este virus en este grupo de pacientes en la mayoría de los hospitales en el mundo.

Un estudio realizado en Suecia donde en grupos de personas hasta los 91 años de edad, reportó una incidencia del 2.8% (n = 4,989) siendo el tipo A el más común [126]. Por otro lado, en Australia se encontró una incidencia del 18.8% (n = 16) en pacientes de 64 – 102 años [127].

## **1.2 RESPUESTA INMUNE ANTIVIRAL**

### **1.2.1 Epitelio respiratorio**

El epitelio respiratorio sirve como interfase entre el cuerpo humano y el ambiente inhalado y compone una barrera fisicoquímica compleja complementada con el moco para funcionar como la primera línea de defensa contra patógenos inhalados.

Las células epiteliales, las cuales cubren toda la superficie de la mucosa en contacto con el aire, son el componente central de esta barrera. Están unidas fuertemente entre ellas mediante uniones célula - célula entre las que se encuentran: estrechas, adherentes, tipo “gap” y desmosomas [128]. Estas actúan impidiendo la entrada del virus y la difusión en la submucosa del epitelio, además dificultan el acceso de los virus a los receptores dentro de la membrana basolateral de la célula, la cual es un sitio alternativo importante de entrada para varios virus [129, 130].

El moco que recubre el epitelio respiratorio, provee una segunda barrera ya que es impermeable para la mayoría de los patógenos, sin embargo, es semipermeable a nutrientes, agua y gases. Los cilios de las células expulsan el moco hacia el exterior del hospedero, se habla que aproximadamente el 90% de las partículas inhaladas, incluyendo los virus, son transportados con el moco desde los bronquiolos a la tráquea [131]. Además contiene cerca de 200 proteínas entre las cuales se han identificado sustancias antimicrobianas, citocinas y antioxidantes [132].

Además de su rol como barrera física, las células epiteliales tienen la capacidad de reconocer patógenos a través de receptores de reconocimiento de



patrón (PRR's de pattern recognition receptors) como los tipo RIG (RLR's de RIG-I like receptors) y tipo Toll (TLR's de Toll-like receptors) [133].

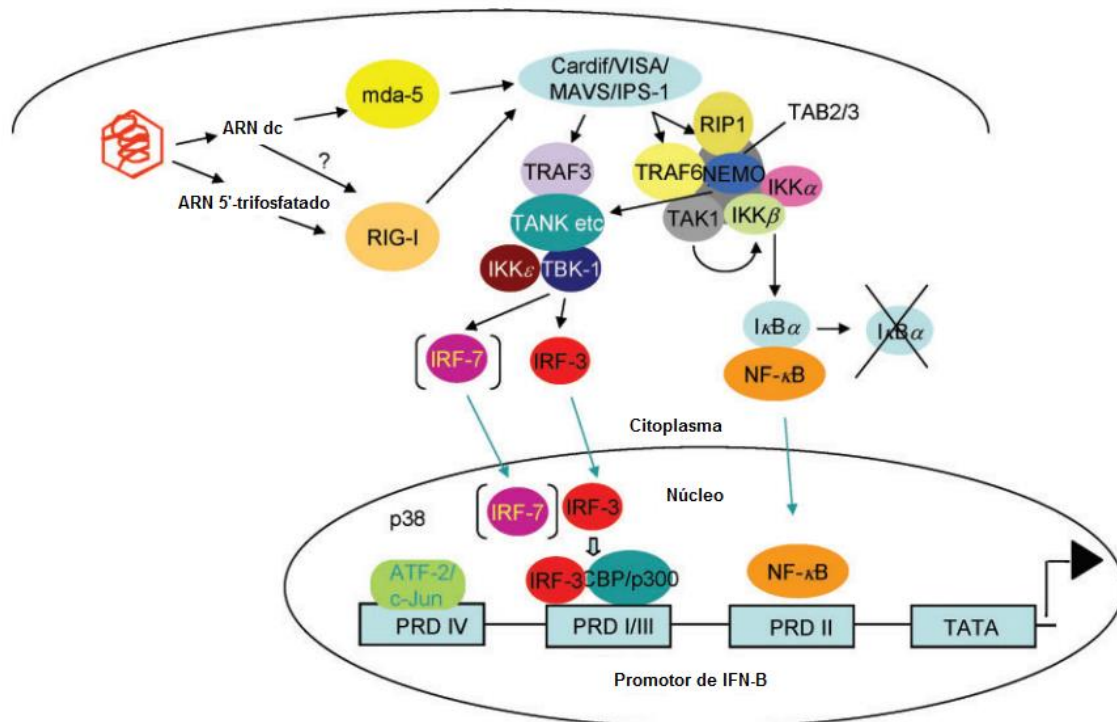
### 1.2.2 Familia de RLR's

El ARN viral es un patrón molecular asociado a patógeno (PAMP de pathogen-associated molecular pattern) detectado en el citoplasma de las células por la familia de helicasas de RNA tipo RIG-I (RLR's): proteína del gen de diferenciación asociado a melanoma 5 (MDA5), proteína del gen inducible por ácido retinoico I (RIG-I) y proteína de laboratorio de genética y fisiología 2 (LGP2) [134-136]

RIG-I y MDA5 contienen dos dominios de reclutamiento de caspasas (CARD) en el extremo N-terminal, uno de helicasa de ARN DExD/H y un dominio represor (RD) en el extremo C-terminal. Mientras que LGP2 carece de CARDs. Cuando los virus infectan las células, producen ARN de doble cadena o trifosfatado en el extremo 5'. En las células del hospedero, normalmente no hay presencia de ARN de doble cadena tan largos y generalmente se encuentran protegidos por una caperuza en el extremo 5'. El dominio de helicasa y de represión son importantes en el reconocimiento de los ARN's virales, mientras que los CARD son esenciales para activar la cascada de señalización [137]. La cascada de señalización de los RLR's se detalla en la **Fig. 2**.

RIG-I y MDA5 reconocen ARN de cadena sencilla y doble que se encuentra en el citoplasma como anteriormente se mencionó, sin embargo, existen diferencias entre estos receptores. Por un lado, MDA5 es capaz de detectar el ARN de virus pequeños como rinovirus y es vital en la regulación de la transcripción de genes de

IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$  y citocinas pro-inflamatorias, mientras que RIG-I es capaz de detectar el ARN de cadena sencilla y polaridad negativa que se encuentran trifosfatados en el extremo 5' de virus como influenza y VSR [138].



**Fig. 2 Vía de señalización dependiente de RIG-I y MDA-5.** El ARN viral presente en el citoplasma, consecuencia del desnudamiento, transcripción o replicación del genoma viral, activa las helicasas de ARN: RIG-I y MDA-5. Una vez activados, reclutan la proteína mitocondrial CARDIF/VISA/MAVS/IPS-1 la cual puede seguir dos destinos: 1) la vía de IRF inicia con el reclutamiento de TRAF3 el cual se une a TANK y después a TBK-1 y/o IKK $\epsilon$ . Este complejo actúa como quinasa fosforilando a IRF-3 y/o IRF-7 los cuales forman heterodímeros o homodímeros que se translocan al núcleo y se unen al promotor de IFN tipo I. 2) la vía de NF- $\kappa$ B inicia con el reclutamiento de TRAF6 y RIP1, al formar este complejo TRAF6 sufre un cambio conformacional liberando un dominio de ubiquitin-ligasa resultando en la ubiquitinación de TRAF6 y RIP1. Ahora es reconocido por TAB2 y TAB3 y reclutan a TAK1, luego NEMO (subunidad  $\gamma$  del complejo IKK) reconoce a RIP1 ubiquitinado y el inhibidor IKK es reclutado, después TAK1 fosforila a IKK facilitando su

ubiquitinación y eliminación por proteosoma y liberando a NF- $\kappa$ B el cual se transloca al núcleo y se une a distintos promotores. IRF-3, IRF-7 y NF- $\kappa$ B reclutan cofactores como ATF-2/c-Jun y CBP/p300 los cuales en conjunto inician el proceso de transcripción. Modificado de [139].

La unión de ARN viral al dominio helicasa de estos receptores, induce un cambio conformacional en la proteína permitiendo la interacción de los CARD con proteínas adaptadoras como estimulador 1 del promotor de IFN- $\beta$  (IPS-1), también conocido como proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS), adaptador de señalización inducido por virus (VISA) o adaptador de CARD para inducir IFN- $\beta$  (CARDIF) [140]. Esta proteína que se encuentran en la membrana exterior de la mitocondria, media el reclutamiento y activación de quinasas las cuales fosforilan factores de transcripción como el factor regulador de interferón 3 (IRF-3), este último se transloca al núcleo e induce la transcripción de genes de interferón tipo I y III [141]. Sin embargo, también puede activar la vía de NF- $\kappa$ B para la producción de citocinas pro-inflamatorias [137].

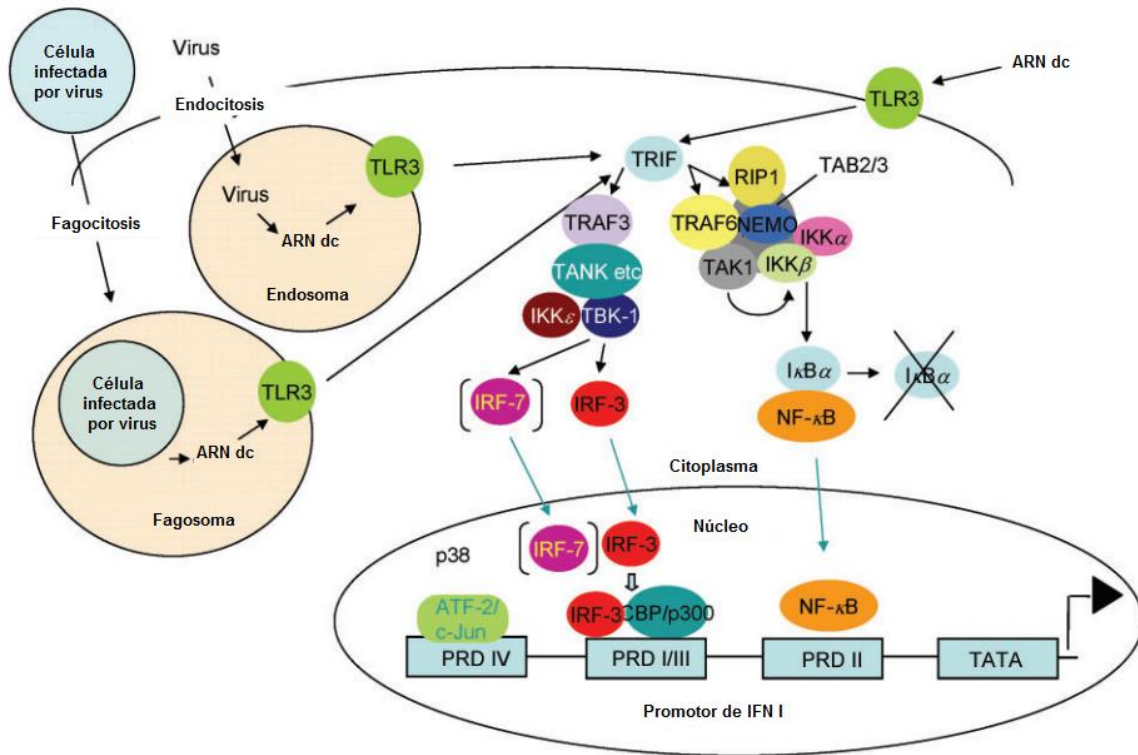
En células del epitelio respiratorio, la inducción de respuesta antiviral vía RIG-I/MDA5 por parte de virus respiratorios ha sido descrita. Por ejemplo, la replicación del VSR induce la activación del promotor del gen de IFN- $\beta$  vía señalización por RIG-I [142].

### **1.2.3 Familia de TLR's**

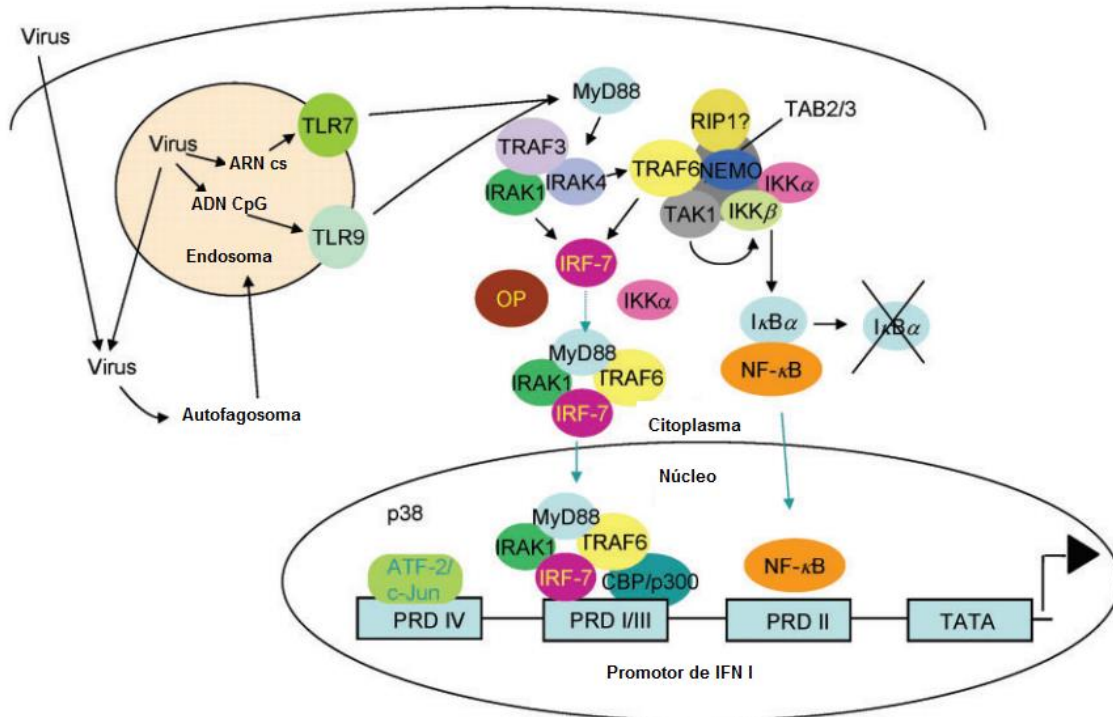
Los TLR's son glicoproteínas integrales tipo I que reconocen PAMP's [143]. Se han descrito 13 TLR's en mamíferos [144], sin embargo células humanas del epitelio respiratorio derivadas de cultivos primarios o líneas celulares expresan del tipo 1-10 [145] debido a que la distribución de estos receptores depende del tipo y

localización de las células. Estos tipos de receptores juegan un papel importante en el montaje de la respuesta inmune innata en la mucosa respiratoria, ya que activan predominantemente la vía de las MAP-quinasas o de algunos factores de transcripción importantes como NF- $\kappa$ B, IRF-3 e IRF-7 los cuales inducen la producción de citocinas pro-inflamatorias así como interferones tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) y III (IFN- $\lambda$ ) [146, 147].

Los TLR's se distribuyen de forma diferencial a lo largo de la morfología celular, dado que los virus tienden a infectar de forma intracelular, los receptores especializados en sensor los PAMP's virales se encuentran en los endosomas. Esta subfamilia comprende a TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 los cuales reconocen ácidos nucleicos virales e inducen la producción de interferones tipo I [147]. TLR3 es capaz de reconocer distintos virus como el de influenza [148], rinovirus [149] y VSR [150]. Por otro lado, TLR7, TLR8 y TLR9 reconocen ARN de cadena doble, sencilla así como ADN con CpG, respectivamente [151]. TLR7 y TLR9 utilizan esencialmente la proteína adaptadora MyD88 para la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B e IRF-7, los cuales inducen la producción de citocinas pro-inflamatorias [152] e interferones tipo I [153], respectivamente. La cascada de señalización de TLR3, así como TLR7/9 se detalla en las **Fig. 3 y 4**, respectivamente.



**Fig. 3 Vía de señalización dependiente de TLR3.** El ARN de doble cadena (ARN dc) presente fuera de la célula, en endosomas por desnudamiento del genoma viral o en fagosomas producto de la fagocitosis de una célula infectada por un virus, se une a TLR3. El producto de esta interacción es la activación de TLR3 y la iniciación de la cascada de señalización predominantemente por vía de NF-κB y en menor medida por IRF-3/7 los cuales se translocan al núcleo y facilitan la transcripción de genes que codifican para citocinas pro-inflamatorias o IFN's tipo I. La señalización es igual a la descrita en la figura 2. Modificado de [139].



**Fig. 4 Vía de señalización dependiente de TLR7 y TLR9.** El ARN de cadena sencilla (ARN cs) o ADN CpG interactúan con TLR7 o TLR9, respectivamente, en los endosomas donde el genoma viral es liberado o por degradación de células apoptóticas que son fagocitadas. TLR7 además puede ser estimulado por PAMP's virales que se encuentran en endosomas resultado de autofagia. Los TLR's activados reclutan la proteína MyD88 que a su vez recluta a IRAK-4 e IRAK-1. Este complejo proteico actúa como andamio central para el reclutamiento de proteínas adaptadoras que pueden seguir la vía de IRF-7 o NF- $\kappa$ B. 1) MyD88 recluta a IRF-7 tras la ubiquitinación de TRAF6, luego IRAK-1 fosforila a IRF-7 y el complejo IRF-7/MyD88/TRAF6/IRAK1 se transloca al núcleo y se une a promotores de genes como el que codifica para interferones tipo I. 2) NF- $\kappa$ B sigue la misma vía de señalización descrita en la figura 2. Modificado de [139]

A pesar que los TLR's endosómicos son los principales actores en el montaje de la respuesta inmune innata antiviral, otros que se encuentran en la superficie celular parecen jugar un papel secundario pero presente. TLR4 es capaz de reconocer la proteína de fusión (F) del VSR conduciendo a la señalización a través de MyD88 para inducir la respuesta en células del epitelio respiratorio [154-156].

También, el virus de Influenza A induce la sobreexpresión de TLR2 en neutrófilos humanos de forma *in vitro* [157] mientras en monocitos y células dendríticas del torrente sanguíneo se ve disminuido de forma *in vivo* [158]. Además, el VSR induce la producción de citocinas a través de este mismo TLR [159].

#### **1.2.4 Familia de NLR's**

Los receptores tipo de dominio de oligomerización por unión de nucleótidos (NOD-like receptor o NLR's) son un tipo de PRR's capaces de reconocer PAMP's o patrones moleculares asociados a daño (DAMP's) como son metabolitos de purinas (ATP o adenosina), ADN o ARN en citoplasma o la proteína de grupo de alta movilidad 1 (HMGB1) [160].

Si bien la producción de IL-1 $\beta$  está regulada por la síntesis de su ARNm, también puede ser producida por la hidrólisis de pro-IL-1 $\beta$  mediada por un gran complejo proteico conocido como inflammasoma que contiene caspasa 1, un NLR y la proteína ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) [161]. Mientras que NOD1 y NOD2, los primeros NLR's identificados, están involucrados principalmente en el reconocimiento de PAMP's bacterianos, el NLRP3 es importante para la respuesta inmune contra virus respiratorios como Influenza A [162, 163].

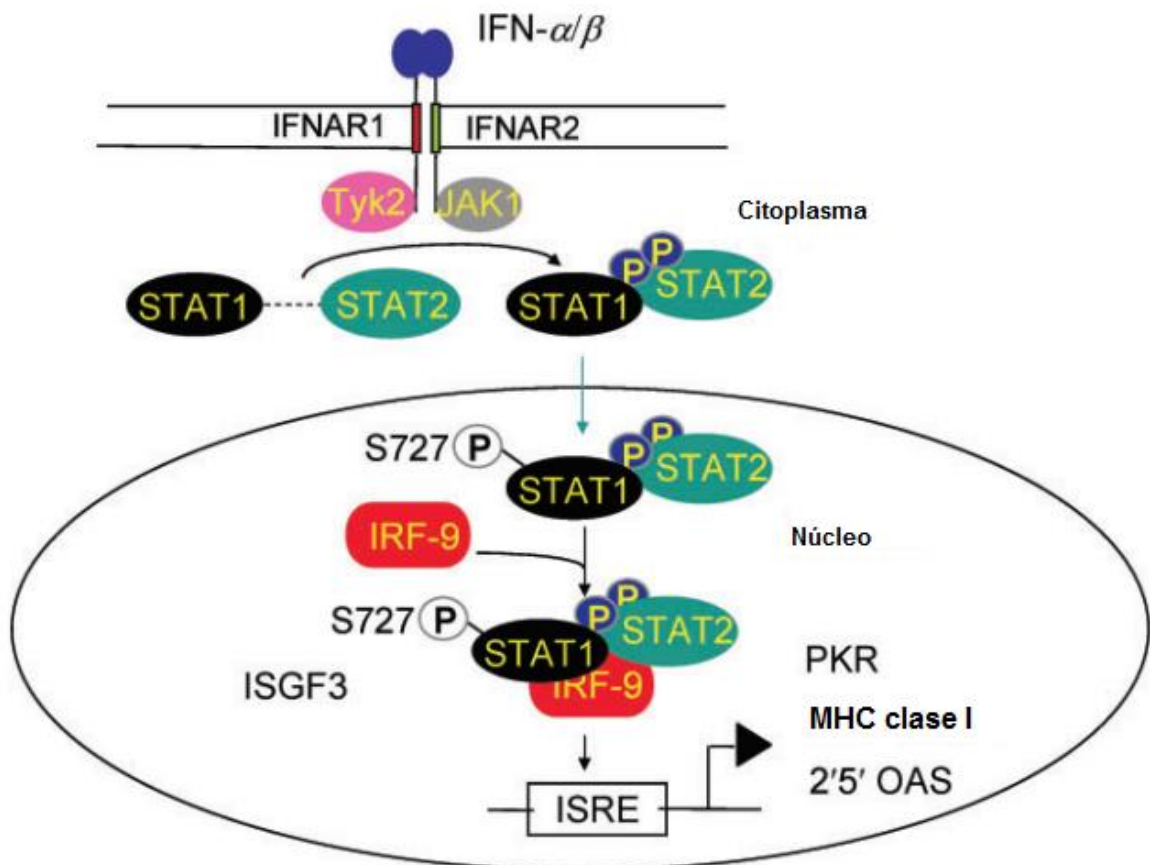
#### **1.2.5 Interferones**

Los interferones son proteínas que se han clasificado en tres familias. Los tipos I son una familia de citocinas cuyos genes codifican 13 subtipos parcialmente homólogos de IFN- $\alpha$  en humanos, uno solo para IFN- $\beta$  y otros más que no han sido muy bien caracterizados (IFN- $\epsilon$ , IFN- $\tau$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\delta$  e IFN- $\zeta$ ) [164]. La familia

de interferones tipo II comprende un solo gen cuyo producto es el IFN- $\gamma$ , el cual es principalmente producido por células asesinas naturales (células NK) y linfocitos T [165]. La familia de interferones tipo III comprende tres tipos: IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 y IFN- $\lambda$ 3 también conocidos como IL-29, IL-28A e IL-28B, respectivamente [166].

Casi todas las células del organismo son capaces de producir IFN- $\alpha/\beta$  en respuesta a la inducción por el reconocimiento de PAMP's por parte de PRR's como anteriormente se describió. Estos interferones actúan de manera autocrina y paracrina para inducir a la propia célula y a las circundantes en un estado antiviral. Para lograr esto, se necesita el receptor IFNAR (receptor de IFN  $\alpha/\beta$ ) el cual está compuesto por dos subunidades: IFNAR1 e IFNAR2 [167]. Estas dos subunidades se encuentran separadas e inmersas en la membrana plasmática; cuando se unen a su ligando, se propicia la unión de ambas. Dentro de las proteínas inducidas por IFNAR se encuentran proteinquinasa R (PKR), moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC clase I) y 2'-5'-oligoadenilato sintasa (2'5' OAS). La cascada de señalización de IFNAR se detalla en la **Fig. 5**.





**Fig. 5 Vía de señalización de IFNAR.** Por un lado, IFNAR1 está asociada con TYK2 mientras que IFNAR2 con JAK1. La proteína STAT2 también está asociada con IFNAR2 previo a la inducción por la unión de IFN-  $\alpha/\beta$  pero en este estado, se encuentra pobremente asociado. La dimerización de estas subunidades por parte del ligando causa un cambio conformacional que causa la fosforilación de IFNAR1 por parte de TYK2, creando un dominio de afinidad al cual se une STAT2. TYK2 y JAK1 fosforilAN a STAT2 y STAT1, respectivamente. Ambos STAT1/2 en su estado fosforilado forman un heterodímero muy estable. Este complejo es translocado al núcleo y retenido allí hasta que son desfosforilados, además, se asocian con un monómero de IRF-9 para formar el heterotrímero ISGF3 el cual se une a los elementos de respuesta estimulados por interferón (ISRE), estos últimos se encuentran en los promotores por lo que potencian la transcripción de muchos genes de respuesta a interferón como proteinquinasa R (PKR), moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC clase I) y 2'-5'-oligoadenilato sintasa (2'5' OAS). Modificado de [139].

La PKR fosforila proteínas celulares, incluyendo el factor de iniciación de la traducción (eIF-2), esto ocasiona una inhibición de la traducción tanto de ARNm del hospedero como virales [168]. Además, la activación de PKR puede también causar apoptosis a través de la vía dependiente de Fas [169]. Por otro lado, el aumento de las moléculas de MHC clase I propicia la presentación de antígenos endógenos para que puedan ser destruidas por células NK o linfocitos T citotóxicos. La proteína 2'5'-OAS induce la degradación de ARN de doble cadena, justamente el tipo de genoma de algunos agentes virales [169].

El IFN- $\gamma$  es un importante elemento en la respuesta inmune adaptativa, sin embargo, las células NK también lo producen por lo que juegan un papel importante en la respuesta inmune innata antiviral. De forma general, actúa en la polarización de linfocitos vírgenes, que han sido activados, a un fenotipo Th1. También aumentan la expresión de MHC-I y MHC-II facilitando la presentación de antígeno, inhibe el ciclo celular para impedir la mitosis y puede inducir la apoptosis, además, al igual que los IFN- $\alpha/\beta$ , induce la producción de PKR entre otros muchos efectos [170].

En cuanto a los interferones tipo III, prácticamente inducen los mismos efectos en las células, sin embargo, a diferencia de IFN- $\alpha/\beta$ , principalmente actúan a nivel de mucosas por lo que se esperaría estos actúen primero en la cinética de la respuesta inmune [171].

### **1.2.6 Células inmunes, citocinas pro-inflamatorias, anti-inflamatorias y quimiocinas**

Las citocinas y quimiocinas secretadas por el epitelio respiratorio en un proceso inducido por virus, promueven el reclutamiento y activación de células del sistema inmune como neutrófilos, eosinófilos, células NK, macrófagos, células dendríticas convencionales (cDC) y plasmacitoides (pDC) entre otras, desde el torrente sanguíneo al tejido infectado [140]. Estas proteínas de bajo peso molecular, son producidas bajo la regulación de varios factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, AP-1 y STAT1/2, siendo el primero de ellos el de mayor contribución [172].

Citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-18 y TNF- $\alpha$  son producidas en las fases tempranas de la infección, inducen gran cantidad de efectos en gran diversidad de células. Esas citocinas son conocidas como pirógenos endógenos por sus efectos sobre el centro termorregulador del hipotálamo. Activan neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, fibroblastos y células epiteliales e inducen la expresión de quimiocinas para atraer más células al sitio de infección [173]

El reclutamiento de neutrófilos principalmente esta inducido por IL-8 (CXCL8), CXCL1 y CXCL5. Mientras que IL-5, GM-CSF, CCL11 (eotaxina 1), CCL24 (eotaxina 2) y CCL5 (RANTES) promueven la migración de eosinófilos al pulmón. Por otro lado, CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) se encarga de reclutar células NK y macrófagos además de CCL2 (MCP-1) y TNF- $\alpha$ . Una quimiocina importante es CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ) la cual es una fuerte inductora en la migración de cDC [174]. Todas las citocinas y quimiocinas anteriormente mencionadas pueden ser producidas por el epitelio respiratorio infectado por virus [175].

Las células NK juegan un papel importante en la respuesta inmune innata frente a virus, su principal función es la citotoxicidad celular por ligando de Fas o bien por perforinas y granzimas además de ser una fuente importante de IFN- $\gamma$ . Se encargan de eliminar células infectadas por virus, inducir un estado antiviral y propiciar el montaje de una respuesta inmune adaptativa [176].

Los macrófagos por su parte, pueden fagocitar células infectadas y presentar antígenos virales a los linfocitos. El IFN- $\gamma$  activa a estas células con aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO), además pueden secretar IL-12 para inducir una polarización a Th1 en linfocitos vírgenes [140].

Las pDC son una gran fuente de IFN- $\alpha/\beta$  e IL-12, pueden viajar a ganglios linfáticos donde se realiza la activación de linfocitos vírgenes por parte de cDC y propiciar una polarización hacia un fenotipo Th1. Expresan grandes cantidades de TLR7/9 reconociendo PAMP's virales como ARN de cadena sencilla y ADN CpG [177, 178].

Las cDC, a diferencia de pDC, expresan principalmente TLR2 y TLR4 las cuales reconocen PAMP's virales como la proteína F de los Paramyxovirus [179]. Constantemente están migrando a los pulmones dado que expresan el receptor (CCR6) de la quimiocina CCL20 [180]. Se encargan de sensar el exterior del epitelio respiratorio y una vez reconocen un antígeno, son activadas lo que ocasiona un aumento en la expresión de CCR7 y disminución de CCR6 haciendo que estas migren a los ganglios linfáticos más cercanos donde se diferencian en células

presentadoras de antígeno (APC). Estas últimas, expresan CD80, CD86, MHC-I y MHC-II permitiendo activar a los linfocitos T CD8+ y CD4+ vírgenes [181]

Los linfocitos T CD4+ vírgenes específicos, se activan e inician la producción de IL-2 que actúa de forma autocrina y paracrina estimulando la proliferación celular. Dependiendo el ambiente de citocinas en el ganglio linfático, puede favorecer la polarización a un fenotipo Th1, Th2, Th17 y/o Treg [140].

El fenotipo Th1 se induce por acción de IL-12 e IFN- $\gamma$  favoreciendo la expresión del factor de transcripción maestro T-bet, el cual regula la expresión de distintos genes, entre ellos los que codifican para IFN- $\gamma$  y TNF. Por otro lado, en presencia de IL-4 se induce la expresión del factor GATA-3 favoreciendo la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13, característico de un linfocito Th2. Mientras, IL-6 y TGF- $\beta$  inducen la expresión del factor ROR- $\gamma$ t que induce la transcripción de los genes que codifican para IL-17A, IL-17F e IL-22 estableciéndose un fenotipo Th17. Por último, los linfocitos T reguladores son diferenciados por acción de IL-2, TGF- $\beta$  e/o IL-10 e inducen el factor FOXP3, este fenotipo se encarga de regular la respuesta inmune de forma negativa y entre los distintos mecanismos que utiliza se encuentra el producir IL-10 y/o TGF- $\beta$ , citocinas anti-inflamatorias [182].

### **1.3 MICROARNS**

#### **1.3.1 Definición de microARN**

Los microARNs (microRNAs o miRNAs en inglés) son ácidos nucleicos endógenos no codificantes de cadena sencilla y corta (18-25 nucleótidos) que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional teniendo como blancos los

ARNm que codifican distintas proteínas ya sea inhibiendo su traducción o favoreciendo su degradación [183-185].

### 1.3.2 Descubrimiento de los microARNs

En 1993 se descubrió que un gen denominado *lin-4* conocido por regular el ritmo de desarrollo de larvas de *C. elegans*, no codificaba para proteínas si no que producía un par de ARNs pequeños [186] que solo se expresan en cierto periodo del crecimiento de la larva; por esto se les llamo ARNs temporales pequeños (small temporary RNA o stRNA en inglés). Además, estos eran complementarios para múltiples sitios en la región 3'-UTR del ARNm del gen *lin-14* [186, 187] el cual codifica para la proteína LIN-14 cuya actividad es necesaria para regular el ritmo de división en distintos grupos de células durante el desarrollo post-embriónico pero que en etapas tardías o de adulto del gusano ya no se expresa [188]. También se observó que en presencia de los ARNs pequeños temporales, los niveles de LIN-14 disminuían sin alterar los niveles de expresión del ARNm de esta proteína [187]. Estos hallazgos apoyaron un modelo en el que los ARNs pequeños inhiben de forma específica la traducción de los ARNm por unión a la región 3'-UTR.

Siete años después se descubre un nuevo ARN pequeño de ~22 nt denominado *let-7* de igual forma en *C. elegans* [189]. Homólogos de este gen fueron detectados en el genoma e incluso el ARN de *let-7* en humanos, *Drosophila melanogaster* y otros 11 animales [190]. Un año después en el 2001, se reportó el hallazgo de genes codificantes para ARNs pequeños no codificantes en *Drosophila*, humanos y gusanos [191]. Estos se parecían mucho en cuanto a que eran ARNs pequeños (~22 nt) expresados de forma endógena pero a diferencia de *lin-4* y *let-*

7, no se expresaban en distintos estadios de maduración celular si no en tipos celulares concretos; de esta forma el término microARN o miARN (microRNA o miRNA en inglés) fue empleado para referirse a los ARNs temporales pequeños y otros ARNs pequeños con características similares pero de función desconocida [191]. Posteriormente se creó un registro para facilitar el nombramiento de los nuevos genes identificados que codifican para miARNs [192].

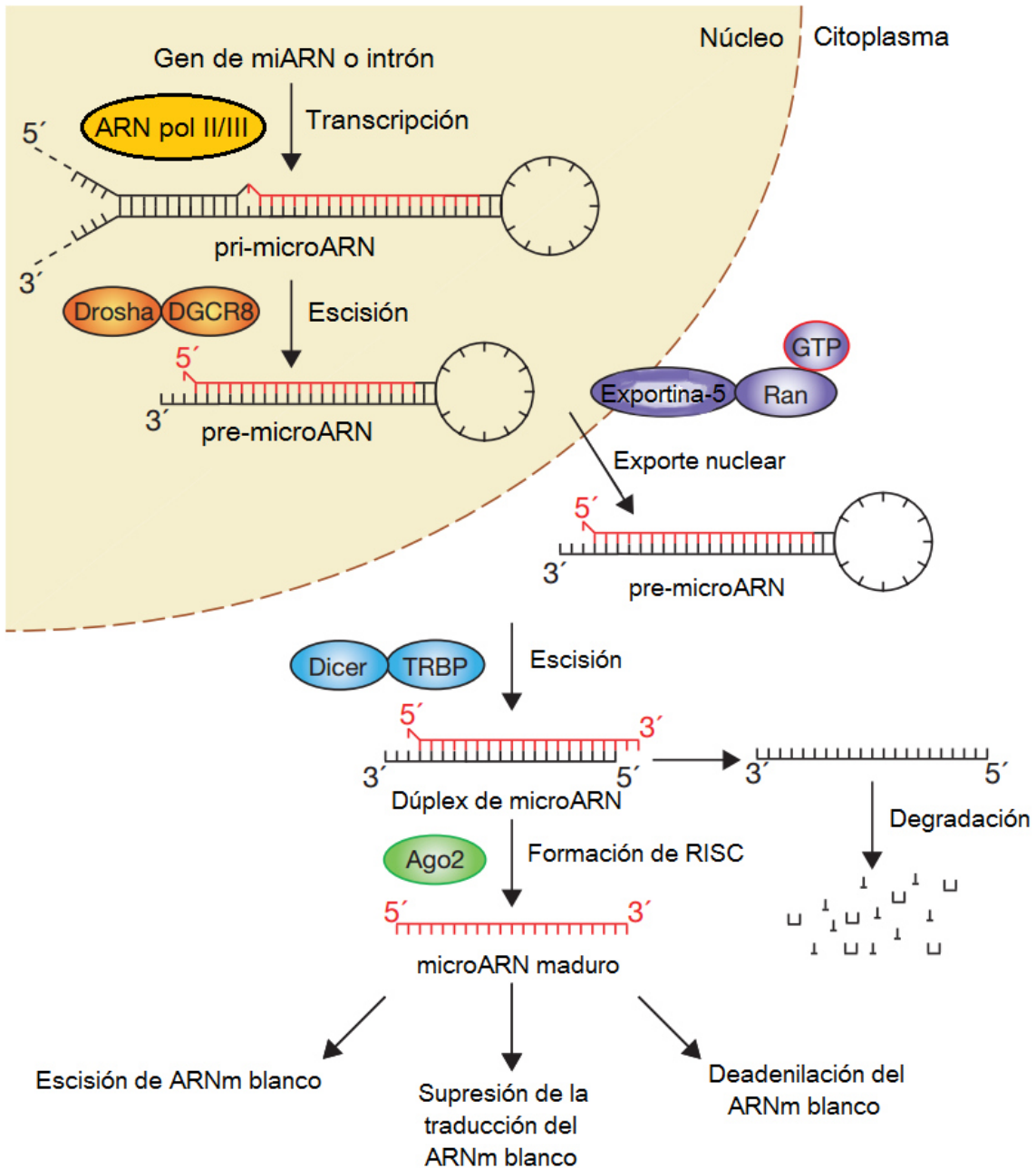
### **1.3.3 Biogénesis y mecanismo de acción**

La transcripción de los genes que codifican los miARNs se lleva a cabo por la ARN polimerasa II (Pol II) y el transcrito primario resultante se denomina pri-microARN [183]. Este último típicamente está comprendido por 1 kb y contiene una estructura de tallo de entre 33-35 pb donde se encuentran las secuencias de los miARNs maduros y un bucle terminal en la parte superior, además unos segmentos de cadena sencilla tanto en el extremo 5' como 3'. La enzima nuclear RNasa III Drosha reconoce las colas de cadena sencilla de ARN, el tallo de aproximadamente 35 pb de longitud y el bucle terminal del pri-miARN para posteriormente medir aproximadamente 11 pb y 22 pb desde la unión basal y apical respectivamente [193], en esta posición inicia el proceso de maduración realizando una escisión con la consecuente generación de un pre-miARN de aproximadamente 65 nucleótidos de largo [194].

Una vez formado el pre-miARN, este es exportado al citoplasma por el sistema exportina-5 dependiente de RAN-GTP [195], donde se da origen a un dúplex pequeño de ARN por una escisión cerca del bucle por la enzima Dicer [196]. Una de las proteínas: Argonauta 1 (Ago 1), Ago 2, Ago 3 o Ago 4 se une al dúplex

formando el pre-complejo de silenciamiento inducido por ARN (pre-RNA-induced silencing complex o pre-RISC en inglés) [197] separando rápidamente una cadena de la otra pero conservando una de ellas (cadena guía) asociada a la proteína y conformando el complejo maduro de silenciamiento inducido por ARN mientras que la otra (cadena pasajera) puede ser degradada o funcionar como miRNA. Todo lo anterior se representa gráficamente en la **Fig. 6**.





**Fig. 6 Biogénesis y mecanismos de acción de microARNs.** Ver el texto para la descripción

### 1.3.4 Nomenclatura de microARNs

Los microARNs maduros son nombrados utilizando el prefijo *miR* y un número de identificación (por ejemplo, miR-1 o miR-2). La numeración es simplemente secuencial en cuanto se descubren nuevos miARNs, sin embargo, cuando en una especie se descubre un miARN idéntico al previamente reportado en otra, suele tener el mismo número. Usualmente también se especifica el organismo del cual proviene el miARN con tres letras antes del nombre (por ejemplo, hsa-miR-121 y cel-miR-121 se refiere al miR-121 de *H. sapiens* y *C. elegans*, respectivamente).

Los genes que codifican para un miARN así como los transcritos primarios de tales se denominan con el prefijo *mir* y un número de identificación (por ejemplo, hsa-mir-121). Distintas secuencias precursoras, así como loci genómicos que expresan en última instancia secuencias de miARNs maduras idénticas se nombran de la forma hsa-mir-121-1 y hsa-mir-121-2. Por otro lado, letras como sufijos denotan secuencias maduras muy parecidas, por ejemplo, hsa-miR-121a y hsa-miR-121b difieren en un solo nucleótido.

Los estudios de clonación de genes potenciales que codifican miARNs en ocasiones identifican dos secuencias que se originan del mismo precursor. Cuando las abundancias relativas indican cuál de los dos se expresa de forma predominante, las secuencias maduras se escriben de la forma miR-56 (el producto predominante) y miR-56\* (del brazo opuesto del precursor y por lo tanto el menos predominante). Cuando la información no es suficiente para determinar los dos casos anteriores, nombres como miR-142-5p (del brazo del extremo 5') y miR-142-3p (del brazo del extremo 3') son utilizados.

Los miARNs let-7 y lin-4 son excepciones a las normas convencionales y estos nombres fueron conservados por razones históricas, sin embargo, los homólogos de estos miARNs que se descubran en nuevas especies adquirirán estos nombres [198].

Lo anteriormente descrito actualmente se utiliza de forma mundial, sin embargo, un nuevo sistema de nomenclatura fue propuesto, este fue creado pensando en las debilidades del anterior pero aún no es tan popular [199].

### **1.3.5 microARNs en la respuesta inmune**

Se ha descrito la regulación por parte de microARNs en múltiples niveles de la respuesta inmune, desde el desarrollo y diferenciación de distintas células, hasta el impedimento de la expresión de mediadores moleculares.

#### **miR-16**

Este microARN es requerido para degradar rápidamente los ARNm que contienen elementos ricos en AU en la región 3' no traducida y que codifican para proteínas como TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-6 [200]. Se encuentra elevado en diversas células de muchos tejidos incluso en aquellos que se relacionan con el proceso inflamatorio como monocitos, neutrófilos, linfocitos B y T [201].

#### **miR-21**

Ha sido estudiado en ratones donde se le atribuye un papel regulador en la polarización de linfocitos T CD4+ ya que uno de los blancos de inhibición es el

ARNm que codifica para IL-12 (p35) [202], esta citocina es importante para la polarización hacia un fenotipo Th1 debido a que junto con la subunidad IL-12 (p40) conforma el heterodímero IL-12 (p70) que es la proteína activa [203]. Se ha descrito como en lavados bronquioalveolares de ratones deficientes de este microARN presentan niveles elevados de IFN- $\gamma$  y CXCL9 (una quimiocina inducida por IFN- $\gamma$ ) así como cantidades disminuidas de citocinas Th2 (IL-4 y CCL17) en comparación con la cepa normal [204].

También se ha descrito como miR-21 es inducido por LPS en monocitos de ratón [205] y regula la proteína supresora de tumor PDCD4 la cual tiene efectos pro-inflamatorios por inducir la transcripción de NF- $\kappa$ B y suprimir la producción de IL-10, además, esta proteína se induce bajo la regulación de la vía de TLR4. El efecto anti-inflamatorio de este microARN se debe a que uno de los blancos de inhibición es justamente el ARNm que codifica para PDCD4, sin embargo, se ha reportado que miR-21 puede ser reconocido por TLR7/8 y con esto inducir una respuesta inmune [206].

Por lo tanto, la consecuencia funcional de miR-21 en la regulación positiva de la inflamación pueden ser determinadas por muchos factores, tales como la concentración extracelular local y la cinética de inhibición de los ARNm por este microARN. En los momentos iniciales de la sobreexpresión de miR-21 su posible papel es promover la inflamación mediante la unión a TLR7/8. Sin embargo, la posterior inhibición de PDCD4 puede jugar un papel en la regulación de tal respuesta para mantener así un estado de homeostasis [207].

### **miR-26b**

Se ha descrito que este microARN regula negativamente la expresión de TLR4 tanto a nivel de ARNm como de proteína. Además, los genes bajo la regulación de este receptor también se ven afectados ya que la sobreexpresión de miR-26b disminuye la producción de IFN- $\beta$  y CCL5 [208].

Otro estudio realizado de forma *in vitro* utilizando macrófagos alveolares bovinos, reportó que la estimulación con LPS puede inducir o inhibir la expresión de miR-26b en los tiempos iniciales o tardíos, respectivamente. Además, la sobreexpresión de este microARN potenció la síntesis de los ARNm que codifican para citocinas y quimiocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e IL-10, pero inhibió el de IL-6. El mecanismo detrás de estos efectos se debe a que el blanco de inhibición es la proteína fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa (PTEN) cuyo silenciamiento regula positivamente la vía de NF- $\kappa$ B [209].

En macrófagos de ratón, miR-26b aumenta su expresión tras la activación de TLR3/4/7 y se une directamente a la región 3'-UTR del ARNm que codifica para la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2), inhibiendo su traducción, pero sin cambio en los niveles del ARNm. Esta proteína es clave en la biosíntesis de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos que tienen un efecto pro-inflamatorio. Por lo que, en este caso, el miR-26 podría jugar un papel anti-inflamatorio.

### **miR-29c**

Se ha descrito como los niveles de expresión de este microARN disminuyen tras la activación de pDC vía TLR9. Dos de sus blancos de inhibición son los ARNm

que codifican para las proteínas Mcl-1 y Bcl-2 involucradas en el proceso de regulación negativa de la apoptosis, por lo que una sobreexpresión de miR-29c en pDC de humanos promueve la muerte celular programada [210].

Por otro lado, los ARNm que codifican para IFN- $\gamma$  también son blancos de miR-29c e incluso la sobreexpresión de este microARN reduce los niveles de interferón producidos por linfocitos Th1, por lo que suprime la respuesta inmune frente a patógenos intracelulares [211].

### **miR-132**

Afecta los niveles de gran cantidad de microARNs debido a que uno de sus blancos de inhibición es el ARNm que codifica para la proteína Argonauta 2 [212], la cual es importante para llevar a cabo el proceso de silenciamiento inducido por microARNs como ya se mencionó anteriormente.

En este mismo estudio, se demuestra como los niveles de expresión de miR-146a se ven disminuidos cuando miR-132 se encuentra sobreexpresado. En este sentido, regularía la respuesta inmune de forma positiva. Sin embargo, también se ha descrito un efecto negativo debido a que inhibe el ARNm de la proteína co-activadora de la transcripción p300 y de esta forma no se transcriben los genes estimulados por interferón [213].

### **miR-146a**

Este microARN pertenece a la familia de miR-146, la cual está compuesta por dos: miR-146a y miR-146b. Se ha descrito un incremento en la expresión de estas

moléculas en la línea celular de monocitos humanos THP-1 al ser estimulados con LPS. Por otro lado, la expresión no se ve aumentada tras la activación de TLR3, TLR7 o TLR9 con ácidos nucleicos virales o bacterianos [214]. En este mismo estudio y otro [215] describió los blancos de miR-146a son los ARNm que codifican para las proteínas quinasa 1 asociada al receptor de IL-1 (IRAK1) y factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6). Estas proteínas son moléculas adaptadoras que actúan en las vías de señalización de TLR2, TLR4, TLR5 y el receptor de IL-1 $\beta$ . Además, los niveles de miR-146a pero no los de miR-146b aumentan en células epiteliales alveolares (A549) de forma *in vitro* y regulan de forma negativa la producción de IL-8 y RANTES inducido por IL-1 $\beta$  [216]. Por otro lado, se ha descrito como la sobreexpresión de miR-146a reduce la citotoxicidad mediada por células NK así como la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por disminuir los niveles de STAT1 [217].

Con todo lo anterior, miR-146a es un regulador negativo de la respuesta inmune. Sin embargo, un reporte reciente [218] describe un mecanismo interesante, por un lado, miR-146a se sobreexpresa bajo la inducción de Poli (I:C), un ligando de TLR3, por medio de las vías PI3K, JNK y NF- $\kappa$ B. Además, induce la expresión de proteínas de uniones estrechas como claudina-1, ocludina y JAM-A favoreciendo las funciones de la barrera epitelial, pero disminuye la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-8 y TNF- $\alpha$  por la regulación de TRAF6.

### **miR-326**

Poco se ha estudiado este microARN en el contexto de la respuesta inmune, sin embargo, un estudio indicó que el silenciamiento *in vivo* en los linfocitos propicia

una menor polarización hacia un fenotipo Th17, esto es porque miR-326 se une al ARNm que codifica para la proteína Ets-1, el cual es un potente regulador negativo en dicho proceso de polarización [219].

### **1.3.6 microARNs en la infección por virus respiratorios**

En un estudio *in vivo* realizado en cerdos infectados con el virus de Influenza A mostraron expresiones diferenciales dependiendo el tiempo de análisis de distintos microARNs, por ejemplo, miR-15a y miR-21 se encuentra sobreexpresados en el día tres post-infección, mientras que miR-146a se encuentra disminuido en el día 1 en comparación con el control sano [220].

Se ha descrito como la infección *in vitro* con el virus de Influenza A induce un aumento en la expresión de miR-29c y este se encuentra involucrado en la inhibición de la respuesta inmune innata inducida por este virus debido a la protección del ARNm que codifica para la proteína A20 [221]. Esta última es una enzima desubiquitinasa la cual es esencial para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica ya que se encarga de suprimir la respuesta antiviral por regulación negativa de las vías de NF- $\kappa$ B e IRF's [222].

En cuanto a Metaneumovirus, se ha demostrado en la línea celular A549 infectadas por este virus, sobreexpresan el microARN let-7f a las 6 y 15 horas post-infección. Por otro lado, los niveles de miR-374\* y miR-192 disminuyen a las 15 horas post-infección en comparación con el control [223]. En este mismo estudio demuestran como let-7f inhibe la replicación de Metaneumovirus y como la proteína M2-2 está involucrada en la inducción de la expresión de microARNs. Por otro lado, otro estudio reporta como let-7f también es inducido por la infección de VSR, pero



a diferencia del anterior, potencia la replicación viral [224], además induce la expresión de otros microARNs como miR-26 y mir-337.

El Rinovirus utiliza como vía de entrada el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR) cuyo ARNm es blanco de miR-23 y es uno de los microARNs inducibles bajo la regulación de RLR's. Por lo anterior, se sugiere que la infección de Rinovirus es inhibida por la estimulación de RIG-I y en consecuencia inducirá la expresión de miR-23 y con esto, disminuir el receptor de entrada del virus [225].

## **ANTECEDENTES**

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 ANTECEDENTES DIRECTOS DEL ESTUDIO

Existen pocos reportes de biomarcadores de pronóstico en infecciones respiratorias debido a virus, se ha abordado esta tarea principalmente evaluando el nivel sistémico y muy poco el local:

Los niveles plasmáticos de IL-1RA, IL-6, IL-7 y G-CSF en pacientes infectados con Influenza A/H1N1 con enfermedad grave se encuentran elevados en comparación con aquellos con enfermedad moderada. Por otro lado, IL-6, IL-8, CXCL10 y VEGF se encuentran elevados en pacientes con enfermedad grave en comparación con controles sanos [226].

Una respuesta por citocinas Th17 juegan un papel importante en la resolución de infecciones por el virus de Influenza A [227], sin embargo, se ha descrito que estas, además de citocinas Th1, se encuentran elevadas en plasma de pacientes con enfermedad grave por este virus [228, 229].

Los niveles de MCP-3 e IFN- $\alpha$ 2 en lavado nasal, así como de IL-10 en plasma en el día del reclutamiento permiten predecir la progresión a enfermedad grave [230], estas citocinas, además de IL-6 en lavado nasal, correlacionaron de forma positiva con los síntomas del tracto respiratorio superior. En este estudio, el método para evaluar la sintomatología consistió en una encuesta análoga, es decir, el paciente indicaba de forma subjetiva la gravedad.

Existe un reporte donde se evalúan los niveles de expresión sistémicos de miR-150 de forma *in vivo* e *in vitro* en pacientes con enfermedad grave o moderada por Influenza A H1N1, contactos y controles sanos [226], en este, muestran como miR-150 se encuentra sobreexpresado en pacientes con enfermedad grave en comparación con aquellos de enfermedad moderada o controles sanos. Además, estos niveles correlacionaron de forma positiva con las concentraciones plasmáticas de IL-1 $\beta$ , IL-8, IFN- $\gamma$  y G-CSF.

No se encontró un reporte de expresión de microARNs en lavado nasal de adultos con alguna infección respiratoria viral, sin embargo, en niños infectados con VSR en comparación con controles sanos, se ha descrito una sobreexpresión de miR-155, miR-31, miR-203a, miR-16 y let-7d, mientras que los niveles de miR-34b, miR-34c, miR-125b, miR-29c, miR-125a, miR-429 y miR-27b se encuentran disminuidos [231].

## **JUSTIFICACIÓN**

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones respiratorias ocasionadas por virus son un grave problema de salud pública que ocasiona la muerte de poblaciones susceptibles como lo son pacientes pediátricos y de la tercera edad. Sin embargo, este tipo de infección no se limita a estas dos poblaciones, sino que afecta a personas de todas las edades.

Si bien la tasa de mortalidad es reducida en adultos jóvenes, así como en edad productiva, la sintomatología asociada a la enfermedad es causa de ausentismo escolar y laboral lo que ocasiona grandes pérdidas económicas debido a la baja en la productividad.

En la actualidad, el aumento de infecciones respiratorias por patógenos emergentes como Influenza B es alarmante debido a que anteriormente la gravedad de la enfermedad por este virus era leve y de incidencia baja. Otros agentes como el recientemente descubierto Metaneumovirus se creía afectaba a pacientes pediátricos, sin embargo, se están encontrando casos donde afectan a adultos.

A la fecha existen muy pocos estudios del perfil de expresión de microRNAs y citocinas en pacientes adultos con infecciones respiratorias virales agudas, el entendimiento de estos mecanismos regulatorios permitirá identificar posibles biomarcadores de gravedad y blancos terapéuticos.

## **HIPÓTESIS**

#### **4. HIPÓTESIS**

Los microRNAs y citocinas en mucosa nasal son inducidos diferencialmente por virus respiratorios permitiendo establecer perfiles que funcionan como biomarcadores de gravedad.



## **OBJETIVOS**

## **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el perfil de expresión de microRNAs y citocinas en pacientes adultos con infecciones respiratorias virales agudas.

## **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1 Identificar y cuantificar el (los) agente(s) causal(es) de la infección respiratoria viral aguda en los pacientes adultos.
- 2 Determinar la gravedad de la infección respiratoria aguda
- 3 Cuantificar los niveles de citocinas en plasma y lavado nasal de los pacientes.
- 4 Determinar los niveles de expresión de los microRNAs (9,16, 21, 26b, 29c, 132, 146a y 326) en lavado nasal de los pacientes.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 MATERIAL

#### 6.1.1 Equipos utilizados

- Campana de bioseguridad 1300 Series A2 (Thermo Fisher Scientific)
- NanoDrop 2000 (Termo Scientific)
- Placa de calentamiento AccuBlock (Labnet)
- Termociclador CFX-96 (Bio-Rad)
- Termociclador PTC-200 (MJ Research)
- Bioplex 200 (Biorad)
- Microcentrífugas Legend Micro 21R (Termo Scientific)
- Balanza analítica GR-200 (AND)
- Potenciómetro AB15 (Fisher Scientific)
- Lector de placas de 96 pocillos iMark (Bio-Rad)
- Minicentrífuga “spinner” capacidad 2000 x g (Bio-Rad)
- Sonicador (Branson)
- Estación de lavado de placas de 96 pocillos con base magnética (Bio-Rad)

#### 6.1.2 Reactivos y materiales de laboratorio utilizados

- Pipetas automáticas de 1, 10, 20, 200 y 1000  $\mu\text{L}$ .
- Puntillas para pipetas automáticas de 1, 10, 20, 200 y 1000  $\mu\text{L}$  con filtro y sin filtro, libre de ARNASas y estériles.
- Medio de transporte viral universal (BD)
- Hisopos de rayón estériles
- Aguja “mariposa” estériles (BD)
- Tubos a vacío con EDTA (BD)
- Tubos de polipropileno de 1.5 mL y 0.2 mL libres de ARNASas (Eppendorf).
- Criotubos de polipropileno estériles de 1 mL con tapa de rosca
- Tubos cónicos estériles de 15 y 50 mL con tapa de rosca
- Estuches:
  - QIAamp MinElute Virus Spin (Qiagen)
  - xTAG® Respiratory Viral Panel Fast v2 (Luminex)
  - QuantiNova Probe PCR kit (Qiagen)
  - Human Influenza Type A M2 Advanced (Genesig)
  - Human Influenza Type B Advanced (Genesig)
  - Human Metapneumovirus Advanced (Genesig)
  - Human Rhinovirus All subtypes (generic) Advanced (Genesig)
  - Enterovirus species Advanced (Genesig)
  - Respiratory Syncytial Virus Advanced (Genesig)

- Human TH17 Magnetic Bead Panel - Immunology Multiplex Assay (Milliplex)
- Human TGF-beta 1 DuoSet ELISA (R&D)
- miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen)
- miScript II RT kit (Qiagen)
- Sondas TaqMan (Thermo Fisher Scientific)
  - miR-16, miR-21, miR-26b, miR-29c, miR-132, miR-146a, miR-326
- iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)
- iQ™ Supermix (Bio-Rad)

## 6.2 RECLUTAMIENTO DE LOS PACIENTES

### 6.2.1 Criterios de muestreo

Se reclutaron pacientes voluntarios que acudían a la consulta de Servicios Médicos de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como Medicina Interna del Hospital Universitario “José E. González González” hasta completar una cantidad de 100 los cuales tenían que cumplir con los siguientes criterios:

- Criterios de inclusión:
  - Pacientes mayores de 18 años de edad no importando género.
  - Diagnóstico clínico de infección respiratoria aguda.
- Criterios de exclusión:
  - Paciente trasladado de otro hospital en el que hubiera estado internado por más de 48 horas.
  - Internamiento en los tres meses previos por más de 48 horas por cualquier causa.
  - Episodio de infección respiratoria aguda en los últimos 30 días.
  - Tuberculosis pulmonar activa o sospechada por características de la placa.

- Paciente con cualquier neoplasia y/o que esté recibiendo quimioterapia.
- Paciente con síndrome de inmunodeficiencia adquirida por VIH.
- Uso de esteroides de manera crónica.
- Mujeres embarazadas
- Criterios de eliminación
  - Baja cantidad de muestra.
  - Mala calidad de la muestra.
  - Información incompleta del expediente

### **6.2.2 Consentimiento informado y encuesta de datos sociodemográficos**

Aquellos pacientes que cumplían con el perfil deseado se les informaba acerca del estudio y se les invitaba al mismo, en caso de aceptar se les solicitaba firmaran un consentimiento informado, así como el llenado de una encuesta donde se les preguntaba información sociodemográfica entre otros datos.

## **6.3 RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

### **6.3.1 Recolección y preparación de exudado faríngeo**

Se realizó la toma del exudado faríngeo, posteriormente el hisopo se colocaba en un Medio de Transporte Viral Universal. Se separaba una alícuota de 200  $\mu$ L la cual se colocaba en un criotubo y se congelaba a -80 °C.

### **6.3.2 Recolección y preparación del lavado nasal**

A los pacientes se les daban indicaciones de acostarse en forma decúbito lateral en una camilla. Utilizando una pipeta de plástico "Pasteur" de dos mililitros, se aspiraba tal volumen de solución salina estéril. Posteriormente, se le indicaba al paciente inclinara su cabeza aproximadamente 45° de tal forma que el orificio nasal apuntara hacia la camilla para después colocar un criotubo cerca del orificio. Se introducía la pipeta "Pasteur" aproximadamente 2-3 cm y se expulsaba la solución salina dentro de la nariz, esta se recuperaba con ayuda de la pipeta volviendo a aspirar y/o colectándola en el criotubo; este procedimiento se repetía 3 veces más. Una vez colectado, se separaron en alícuotas de 200 µL, a una de ellas se le añadían 1000 µL de QiAzol Lysis Reagent (incluido en el estuche de miRNeasy Serum/Plasma de Qiagen), se mezclaba en "vortex" y se congelaba junto con las demás alícuotas a -80 °C hasta su uso.

### **6.3.3 Recolección preparación de muestras de sangre venosa**

Las obtenciones de las muestras sanguíneas se realizaron siguiendo la técnica de flebotomía estándar, se emplearon tubos con vacío interno y EDTA. Una vez colectada la muestra de sangre, una alícuota de 1.5 mL se colocaba en un tubo de polipropileno de 1.5 mL el cual se centrifugaba a 1000 x g durante 10 minutos, esto para separar el paquete globular del plasma. Posteriormente con ayuda de una pipeta automática y puntillas se recuperaba el plasma teniendo cuidado de no contaminarlo con los componentes restantes, este se colocaba en un criotubo y se congelaba a -80 °C hasta su uso.

La muestra restante era referida al Servicio de Hematología Especial de la UANL para la realización de una citometría hemática completa con diferencial de blancos.

## **6.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS AGENTES VIRALES**

### **6.4.1 Extracción de ácidos nucleicos (estuche QIAamp MinElute Virus Spin)**

Se etiquetaron el número de tubos de polipropileno de 1.5 mL de acuerdo a la cantidad de muestras a procesar. Se añadió 25 µL de proteasa a cada uno de ellos, 200 µL de muestra (transporte viral) a cada tubo respectivo y 200 µL de acarreador de ARN-AVL previamente preparado. La mezcla se agitó vigorosamente en “vortex” durante 15 segundos e incubó en placa caliente (56 °C) durante 15 minutos. Se bajó el volumen del líquido al fondo del tubo utilizando una minicentrífuga y se adicionó 250 µL de etanol absoluto grado biología molecular. La mezcla fue agitada vigorosamente en “vortex” durante 15 segundos y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se bajó el volumen del líquido al fondo del tubo utilizando una minicentrífuga, se abrieron las columnas “QIAamp MinElute”, se etiquetó apropiadamente y añadió el volumen total de la solución anterior. Las muestras fueron centrifugadas durante 1 minuto a 6,000 x g, se descartó el tubo colector y se colocó la columna en uno nuevo para adicionar 500 µL de solución amortiguadora “AW1”. Las muestras fueron centrifugadas durante 1 minuto a 6,000 x g, se descartó el tubo colector y se colocó la columna en uno nuevo para adicionar 500 µL de solución amortiguadora “AW2”. Las muestras fueron centrifugadas durante 1 minuto



a 6,000 x g. El tubo colector fue descartado y se colocó la columna en uno nuevo, se adicionó 500 µL de etanol absoluto grado biología molecular y las muestras fueron centrifugadas durante 1 minuto a 6,000 x g. El tubo colector fue descartado y se colocó la columna en uno nuevo y centrifugó durante 3 minutos a 20,000 x g. La columna fue incubada a 56 °C durante 3 minutos, posteriormente, el tubo colector fue descartado y la columna fue colocada en un tubo de polipropileno de 1.5 mL. Se adicionó 50 µL de solución amortiguadora “AVE” directamente en la membrana e incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 20,000 x g durante 1 minuto. Finalmente, las muestras fueron almacenadas en congelación (-80 °C) hasta su uso.

#### **6.4.2 Cuantificación de ácidos nucleicos (NanoDrop 2000)**

Las muestras fueron cuantificadas empleando un espectrofotómetro (NanoDrop 200). El equipo se ajustó con un blanco (en este caso es la solución amortiguadora “AVE”) para análisis a una absorbancia de 280/260 nm y con el factor para ARN. Posteriormente, las muestras problema fueron analizadas y las concentraciones y purezas fueron registradas.

#### **6.4.3 xTAG® Respiratory Viral Panel Fast v2 (Luminex)**

Para la mezcla maestra (MM) se llevó a cabo la adición de 1.3 µL de agua libre de ARNasas, 4 µL de solución amortiguadora “OneStep” 5x, 1.1 µL de mezcla de nucleótidos xTAG®, 2 µL de cebadores xTAG®, 1.6 µL de mezcla de enzimas “OneStep”. Luego se agregó 10 µL de MM a cada uno de los tubos previamente etiquetados y 10 µL de ácidos nucleicos extraídos. Se realizaron controles con ADN lambda o agua libre de ARNasas. Los tubos fueron agitados en el “vortex” durante

2-5 segundos y se bajó el líquido al fondo usando una minicentrífuga. Los tubos fueron colocados en el termociclador precalentado (50 °C) y la RT-qPCR multiplex se llevó a cabo siguiendo las condiciones mencionadas en la **Tabla 1**.

**Tabla 1** Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple para detección de agentes virales utilizando el estuche xTAG® Respiratory Viral Panel Fast v2.

Paso		Tiempo	Temperatura (°C)
1	Precalentado	20 min	50
2	Activación de polimerasa	15 min	95
3	Desnaturalización	30 s	95
4	Alineamiento	30 s	59
5	Extensión	30 s	72
6	Ir al paso 3 x 35 veces		
7		2 min	72
8		Infinito	4

La hibridación se llevó a cabo en una microplaca para PCR adicionando 20 µL de microesferas, 2 µL del producto de RT-PCR y 75 µL de SA-PE diluido en solución amortiguadora informante a cada uno de los pocillos. Se mezclaron suavemente por pipeteo y se colocaron en el termociclador previamente precalentado (45 °C) y programado 20 minutos a 45 °C. La adquisición de datos se llevó a cabo en el Bioplex 200 (Biorad) empleando el software xPONENT.

## 6.5 CUANTIFICACIÓN DE LOS AGENTES VIRALES

Este procedimiento aplica para los estuches utilizados para cuantificar Influenza B, Influenza A, Metaneumovirus humano, Rinovirus, Enterovirus y VSR. Las reacciones de cuantificación se llevaron a cabo adicionando, a tubos de PCR, 5  $\mu$ L de 2x “QuantiNova Probe qRT-PCR de Qiagen”, 0.1  $\mu$ L de “QN Probe RT mix”, 0.5  $\mu$ L de 20x mezcla de cebadores/sonda, 1.9  $\mu$ L de agua libre de ARNasas y 2.5  $\mu$ L de la muestra, control positivo o sin templado (curva estándar o agua libre de ARNasas, respectivamente). El termociclador CFX-96 (Bio-Rad) fue configurado como se muestra en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para cargas virales utilizando estuches de Genesig y QuantiNova

Paso		Tiempo	Temperatura (°C)
1	RT	10	45
2	Activación de polimerasa	5	95
3	Desnaturalización	10	95
4	Alineamiento/extensión	30	60
5	Ir al paso 3 x 49		

Una vez terminada la reacción se determinó el umbral de amplificación y se obtuvo la concentración de las muestras problemas con la ecuación obtenida de la curva de calibración.

## **6.6 MEDICIÓN DE LA GRAVEDAD DE LA SINTOMATOLOGÍA**

### **6.6.1 Evaluación subjetiva de la gravedad de la sintomatología**

En el día del reclutamiento de los pacientes se les solicitaba un número telefónico en el cual se les pudiera contactar. Durante los seis días posteriores se mantuvo comunicación por vía telefónica para preguntarles la gravedad de los síntomas relacionados con infección respiratoria aguda (rinorrea, estornudo, odinofagia, tos, cuerpo cortado, cefalea, escalofríos y fiebre). Inicialmente se le indicaba al paciente que los números cero, uno, dos y tres correspondían a un síntoma ausente, leve, moderado o grave, respectivamente. Cada sujeto contaba con un formato donde se anotaba cada día el seguimiento de la sintomatología.

Este tipo de evaluación subjetiva ya ha sido utilizada con los mismos propósitos por otros grupos de investigación [230, 232] que estudiaron la gravedad de la sintomatología en pacientes con infección respiratoria aguda

### **6.6.2 Cálculo del área bajo la curva**

El área bajo la curva se calculó utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 6. Utilizando una tabla de datos con formato "XY" se coloca en la columna de "X" el día de seguimiento, es decir, del 1 al 7, respectivamente. Mientras que en cada columna de "Y" se colocan los siete valores de un síntoma dependiendo el paciente.

## 6.7 CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS

### 6.7.1 Inmunoensayo múltiplex (tecnología Luminex)

El estuche utilizado para el Inmunoensayo fue “Milliplex MAP Kit: Human Th17 Magnetic Bead Panel” de la marca Millipore. Por esta metodología se cuantificaron 25 citocinas: IL-17F, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, CCL20, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IL-22, IL-9, IL-1  $\beta$ , IL-33, IL-2, IL-21, IL-4, IL-23, IL-5, IL-6, IL-17E, IL-27, IL-31, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  e IL-28A. Ambos tipos de muestra se analizaron con este método con ligeras modificaciones dependiendo si se trataba de plasma o lavado nasal.

Antes de iniciar se verificó la calibración y verificación del equipo de detección (Luminex 200). En una placa se colocó 200  $\mu$ L de “Assay Buffer” en cada pocillo, se selló y mezcló en un agitador de placas por 10 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el “Assay Buffer” y la placa se secó golpeando sobre una cama de servilletas absorbentes. Posteriormente, se adicionó 25  $\mu$ L de “Assay Buffer” en el pocillo designado como Blanco, 25  $\mu$ L de cada estándar y control en el pocillo respectivo. Se adicionó 25  $\mu$ L de “Assay Buffer” en cada pocillo donde se colocaron las muestras (en caso de ser muestras de lavado nasal, se omitió este paso). Para los plasmas se adicionó 25  $\mu$ L de matriz de suero a los pocillos designados como Blanco, Estándar y Controles. Se adicionaron 25  $\mu$ L de muestra de plasma a los pocillos respectivos (en caso de ser lavado nasal, se añadieron 100  $\mu$ L). Se adicionó 25  $\mu$ L de la mezcla de microesferas a cada uno de los pocillos, la placa se selló, envolvió con papel plástico y después con papel aluminio. Las muestras fueron incubadas en agitación continua toda la noche (16-18 h) a 4°C con ayuda de un agitador para placas. La placa se colocó en la estación de lavado automático con

base magnética activada. Se dejó reposar durante un minuto y se realizaron dos lavados utilizando 200  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lavado. Se adicionó 25  $\mu\text{L}$  de anticuerpos de detección en cada uno de los pocillos. La placa se selló, se cubrió con papel aluminio e incubó en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C). Se adicionó 25  $\mu\text{L}$  de estreptavidina-ficoeritrina a cada pocillo, la placa se selló y cubrió con aluminio para posteriormente incubar en agitación durante 30 min a temperatura ambiente (20-25°C). Se realizaron dos lavados utilizando 200  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lavado, posteriormente, se adicionó 150  $\mu\text{L}$  de “Sheat Fluid” a todos los pocillos y se mantuvo en agitación por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó la lectura en el Bioplex 200 empleando el software Bio-Plex Manager que arrojo las concentraciones para cada muestra.

#### **6.7.2 Ensayo por Inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) tipo “sándwich” para determinación de TGF- $\beta$ 1**

Se emplearon placas Costar #2592 a las cuales se les adicionó 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo de captura diluido en cada uno de los pocillos. La placa se cubrió con papel plástico e incubó durante toda la noche (16-18 h). Al día siguiente, el líquido se decantó, se realizaron tres lavados con 400  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de lavado. Se adicionó 300  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de bloqueo a cada uno de los pocillos e incubó a temperatura ambiente durante mínimo una hora. Pasado ese tiempo se realizaron tres lavados como se mencionó previamente. Los estándares, blancos y muestras activadas. La placa se cubrió e incubó a temperatura ambiente durante dos horas. Posteriormente, se realizaron lavados como previamente fueron

descritos y se adicionó 100  $\mu\text{L}$  del anticuerpo de detección e incubó a temperatura ambiente durante dos horas. Se repitieron los pasos de lavado previamente descritos. Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de la estreptavidina-peroxidasa a cada uno de los pocillos, la placa se cubrió con papel plástico y después con aluminio e incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se repitieron los pasos de lavado previamente descritos. Se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de solución sustrato-cromógeno a cada uno de los pocillos y se cubrió la placa con papel aluminio e incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se adicionó 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N a cada uno de los pocillos y se analizó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas para ELISA. Se trazó la curva estándar y la ecuación de la recta obtenida fue empleada para el cálculo de las concentraciones en las muestras problemas.

## **6.8 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE MICROARNs**

### **6.8.1 Extracción de microARNs en lavado nasal (estuche miRNeasy serum/plasma)**

Con la finalidad de obtener una mejor calidad del microARN extraído se realizaron pequeñas modificaciones al protocolo indicado por el fabricante. Las muestras de lavado nasal en Qiazol (Qiagen) fueron colocadas en un baño de agua a 37 °C hasta descongelación, el tubo con el lisado se dejó a TA durante 5 min. Posteriormente, se adicionó 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo (grado biología molecular), se mezcló en el “vortex” durante 15 s e incubó por 2-3 min. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 x g durante 15 minutos a una temperatura de 4 °C. La fase

acuosa fue transferida a un tubo de polipropileno de 1.5 mL y se adicionó 900 µL de etanol 96-100% (grado biología molecular) y se mezcló por pipeteo. 700 µL de la muestra fueron transferidos a una columna “RNeasy MinElute spin” y centrifugadas a 8,000 x g durante 15 segundos a TA. La columna del tubo colector fue removida, el filtrado fue desechado y la columna fue colocada nuevamente en el mismo tubo. Se destapó la columna y se adicionó la muestra restante y se centrifugó a 8,000 x g durante 15 segundos a TA. Se descartó el filtrado, se adicionó 350 µL de buffer “RWT” a la columna y se centrifugó a 8,000 x g durante 15 segundos a TA. Se repitió el paso anterior, se desechó el filtrado, se adicionó 250 µL de buffer “RPE” en la columna y se centrifugó a 8,000 x g durante 15 segundos a TA. Se repitió nuevamente el paso anterior, se desechó el filtrado, se adicionó 500 µL de etanol 80% en la columna, se centrifugó a 8,000 x g durante 2 minutos a TA. Se desechó el tubo colector con el filtrado y la columna fue colocada en un nuevo tubo. Las muestras fueron centrifugadas a 20,000 x g durante 5 minutos, se desechó el tubo colector y la columna fue colocada en un tubo de polipropileno de 1.5 mL (incluidos en el estuche). Se adicionó 14 µL de agua libre de ARNasas directamente en la membrana de la columna y las muestras fueron centrifugadas durante 1 minuto a 20,000 x g. La cantidad y pureza del ARN fue obtenida mediante análisis espectrofotométrico. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

### **6.8.2 Retrotranscripción de microARNs (miScript II RT de Qiagen)**

#### **Procedimiento**



La retrotranscripción de miARNs se realizó ajustando a 10 ng la cantidad de ARN total por reacción de 20  $\mu$ L y utilizando el estuche miScript II RT de Qiagen siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se preparó una mezcla considerando que por cada reacción se utilizan 4  $\mu$ L de amortiguador “HiFlex” 5x, 2  $\mu$ L de mezcla de nucleótidos “Nucleics mix”, 2  $\mu$ L de enzima retrotranscriptasa “miScript Reverse Transcriptase mix” 10x. Se adicionó la cantidad de muestra dependiendo los cálculos realizados y lo restante de agua libre de ARNasas. Se mezcló gentilmente y se colocó en termociclador con el siguiente programa 60 minutos a 37 °C y 5 minutos a 95 °C. Las muestras fueron congeladas a -20 °C hasta su uso.

### **6.8.3 Determinación de niveles de expresión de U6 (SYBR Green ®)**

#### **Procedimiento**

Se optimizaron las condiciones necesarias para realizar la reacción en cadena de la polimerasa utilizando SYBR Green como fluorocromo reportero y los siguientes pares de cebadores previamente descritos para U6 [233] Cebador hacia adelante (forward primer) 5'-GCTTCGGCAGCAGCACATATACTAAAAT-3' y Cebador hacia atrás (reverse primer) 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3'.

Se utilizó también, el amortiguador “iQ™ SYBR® Green Supermix” 2x de Bio-Rad con el cual se preparó una mezcla de acuerdo a las siguientes cantidades por cada reacción: 8  $\mu$ L de agua libre de ARNasas, 10  $\mu$ L de iQ™ SYBR® Green Supermix, 0.5  $\mu$ L de cebador “forward”, 0.5  $\mu$ L de cebador “reverse” y un microlitro de ADN complementario (muestra) o agua libre de ARNasas (control sin templado).

La reacción se llevó a cabo en un termociclador CFX-96 (Bio-Rad) con las condiciones descritas en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para amplificación de U6 utilizando iQ SYBR Green Supermix.

<b>Paso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>
1	95	00:10:00
2	95	00:00:15
3	70	00:01:00
4	Ir a paso 2 x 39 veces	

Una vez terminada la reacción, determinar el umbral de amplificación y guardar el archivo, anotar los ciclos de amplificación de cada una de las muestras.

#### **6.8.4 Determinación de niveles de expresión de miARNs (sondas TaqMan®)**

Se adquirieron sondas TaqMan® para analizar los siguientes microARNs: miR-9, miR-16, miR-21, miR-26b, miR-29c, miR-132, miR-146a y miR-326. Se realizaron alícuotas de 50 µL que se colocaron en tubos de polipropileno de 200 µL y se congelaron a -20 °C protegidos de la luz hasta su uso. Se preparó la mezcla de qPCR con 10 µL de 2x “iQ™ Supermix”, 1 µL de mezcla con cebadores/sonda, 8 µL de agua libre de ARNasas y 1 µL de templado (ADN complementario de la retrotranscripción previamente descrita) o agua libre de ARNasas, respectivamente. La reacción se llevó a cabo en un termociclador CFX-96 (Bio-Rad) con las condiciones descritas en la **Tabla 4**.

**Tabla 4** Condiciones de reacción para amplificación de microARNs con sondas TaqMan® utilizando iQ Supermix (Bio-Rad).

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	00:10:00
2	95	00:00:15
3	60	00:01:00
4	Ir a paso 2 x 49 veces	

Una vez terminada la reacción, determinar el umbral de amplificación y guardar el archivo, anotar los ciclos de amplificación de cada una de las muestras.

## 6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizaron los paquetes estadísticos IBM SPSS Statistics 22 así como GraphPad Prism 6 para realizar los análisis estadísticos donde se llevaron a cabo, según el caso, estadística descriptiva, estadística inferencial (prueba de asociación de Chi-cuadrada ( $\chi^2$ ), valor de Phi ( $\phi$ ) y V de Cramer), prueba de correlación de Pearson o Spearman, T de students o U de Mann-Whitney, prueba de correlación de Spearman, ANOVA (una o dos vías) o Kruskal-Wallis. Se consideró significativo una  $P < 0.05$ .

### 6.9.3 Creación de mapas de calor (utilizando el software “R”)

Se descargó el paquete estadístico gratuito “R” de la página de internet “<https://www.r-project.org>”. Además, se utilizó un código para generar los mapas de

calor a partir de una matriz creada en Microsoft Office Excel con formato separado por comas (.csv).

## **RESULTADOS**

## 7. RESULTADOS

### 7.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS DE ESTUDIO

Se reclutaron 100 pacientes durante los meses de invierno de los años 2015-2016 que acudían a la consulta de Servicios Médicos de la UANL, así como a Medicina Interna del Hospital Universitario “José Eleuterio González González” en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México.

El 64% de los pacientes fueron femeninos con edad de  $46 \pm 16$  años (media  $\pm$  error estándar de la media) mientras que el resto fueron masculinos con edad de  $40 \pm 12$  años. Las edades para cada uno de los grupos se distribuyeron de forma normal, según se evaluó con la prueba de Shapiro-Wilk ( $P > 0.05$ ), y mostraron homogeneidad de varianzas mediante evaluación con la prueba de Levene ( $P > 0.05$ ). La edad de los pacientes femeninos y masculinos no mostraron diferencia significativa (T de Student,  $P > 0.05$ ).

El 28% de los pacientes reportaron ser alérgicos a distintos antígenos entre ellos alimentos, medicamentos o alérgenos ambientales. El 10% de los pacientes reclutados fueron fumadores, 14% padecieron diabetes y el 28% reportaron haberse aplicado la vacuna contra el virus de influenza que promueve la Secretaría de Salud en México (**Tabla 5**). El 63% de los pacientes acudieron a la consulta con automedicación previa y reportaron haber ingerido principalmente antibióticos y/o antigripales. Los días de evolución de los pacientes reclutados fueron 3 y 2 días (mediana) para los pacientes femeninos (rango: 0-30 días) y masculinos (rango: 0-9 días), respectivamente.

**Tabla 5.** Características sociodemográficas de los grupos de estudio.

Características	Pacientes		Controles	
	Femeninos	Masculinos	Femeninos	Masculinos
<b>n</b>	64 (64%)	36 (36%)	6 (66.6%)	3 (33.3%)
<b>Edad (años)</b>	46 ± 16	40 ± 18	40 ± 12	38 ± 19
<b>Alérgicos</b>	23 (36%)	5 (13%)	0	0
<b>Fumadores</b>	8 (13%)	2 (6%)	0	0
<b>Diabetes</b>	13 (20%)	1 (2.7%)	0	0
<b>Vacunados contra Influenza</b>	21 (33%)	7 (20%)	2 (33%)	1 (33%)
<b>Medicamentos utilizados</b>	Antibióticos, anti-gripales			
<b>Días de evolución</b>	3 (0-30)	2 (0-9)		

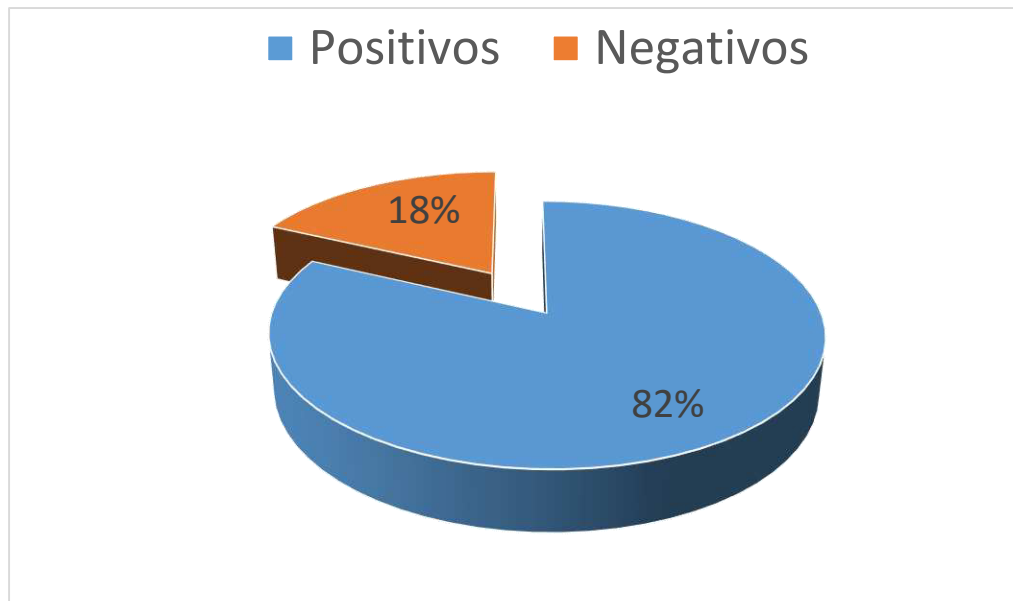
Se incluyeron nueve controles clínicamente sanos y con biometría hemática completa dentro de los valores normales. A la entrevista negaron ser fumadores, padecer alergias o diabetes. Se respetó la proporción de género y edad observada en el grupo de pacientes. Se realizaron pruebas de T de Student para muestras independientes y verificar si existía alguna diferencia significativa en las edades tanto entre controles femeninos y masculinos, así como sus pares en el grupo de pacientes cumpliendo con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas antes mencionados y no encontrándose diferencias ( $P > 0.05$ ), ver **Tabla 5**

## **7.2 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS AGENTES VIRALES EN PACIENTES ADULTOS CON INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA**

De los 100 pacientes reclutados, en 82 de ellos se detectó al menos un agente viral (**Fig. 7**). El virus con mayor frecuencia de detección fue el de Influenza B con 38 casos, seguido de Coronavirus (29 casos), Rinovirus y virus de Parainfluenza (21 casos en ambos), VSR (19 casos) y en último lugar el virus de Influenza A y Metaneumovirus (13 casos en ambos) (**Fig. 8**), ningún paciente fue positivo para Adenovirus o Bocavirus. Se descartó la presencia de Enterovirus por qRT-PCR en los casos que dieron positivos para Enterovirus-Rinovirus por el método de detección múltiple.

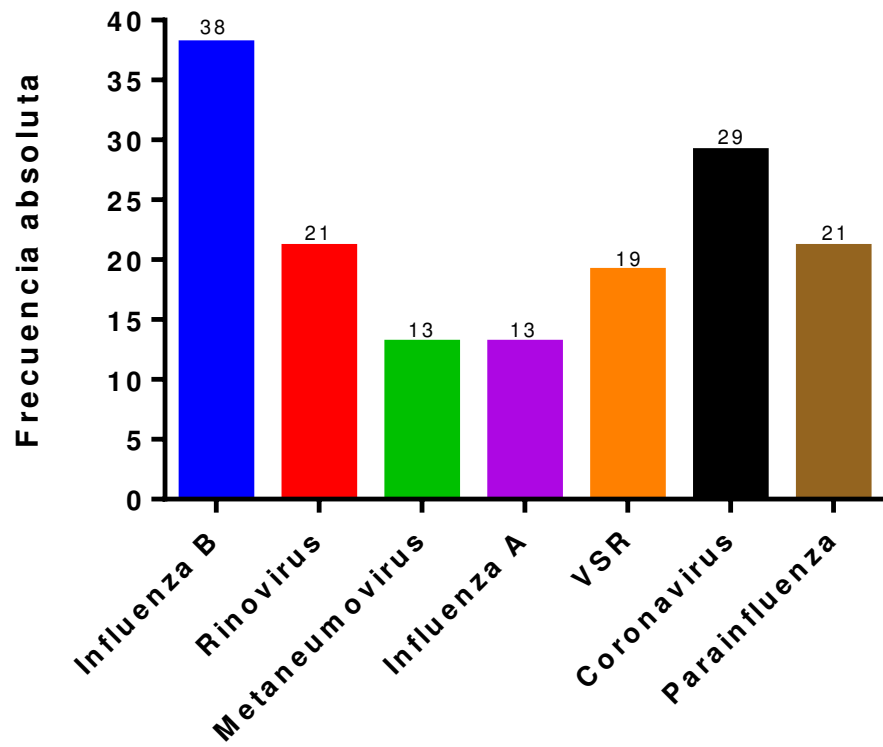


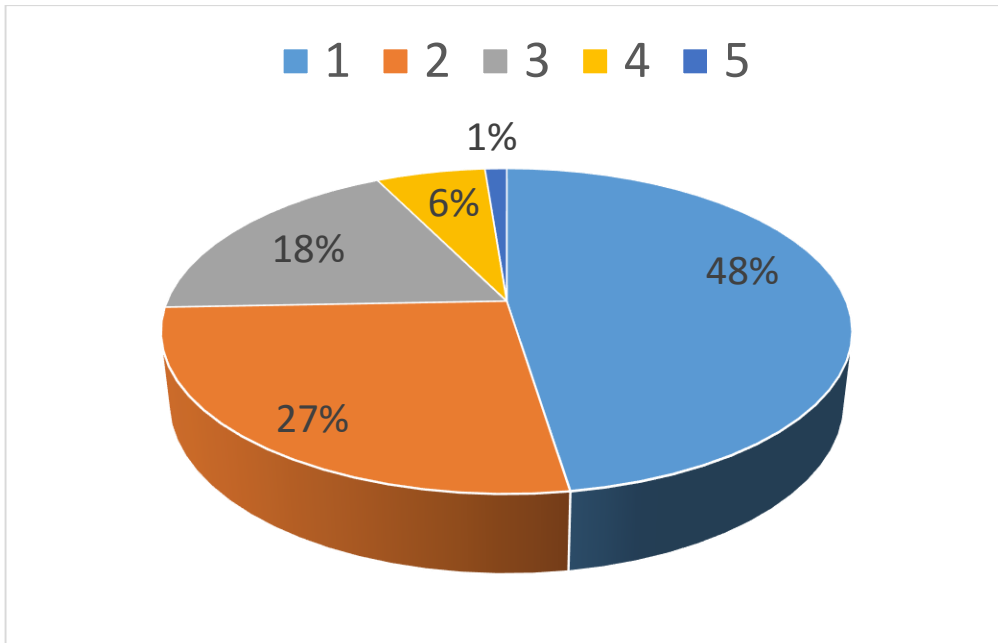
En 39 de los pacientes positivos (48%) se detectó un agente viral, mientras en 22 pacientes (27%) se detectaron dos agentes virales; 15 pacientes (18%) se encontraron infectados con tres virus; en 5 pacientes (6%) se detectaron cuatro y por último un paciente presentó hasta cinco agentes virales (**Fig. 9**).



**Fig. 7** Proporción de pacientes con infección respiratoria viral aguda (n = 100)

**Fig. 8** Frecuencias absolutas de detección de los agentes virales analizados (n=82)





**Fig. 9** Proporción de pacientes con uno, dos, tres, cuatro y hasta cinco agentes virales causando infección respiratoria viral aguda (n = 82)

Las distintas combinaciones, así como la cantidad de pacientes en cada grupo se detallan en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Cantidad de pacientes de acuerdo a las distintas co-infecciones.

No. agentes virales	Grupo	Cantidad
1	Influenza B	7
	VSR	8
	Influenza A	6
	Coronavirus	9
	Rinovirus	6
	Metaneumovirus	3
2	Influenza B/Influenza A	1
	Influenza B/Coronavirus	5
	Influenza B/Rinovirus	3
	Influenza B/Metaneumovirus	2
	Influenza B/Parainfluenza	3
	VSR/Influenza A	3
	VSR/Coronavirus	2
	VSR/Parainfluenza	1
	VSR/Rinovirus	1
	Coronavirus/Parainfluenza	1
3	Influenza B/Coronavirus/Parainfluenza	2
	Influenza B/Coronavirus/Metaneumovirus	1
	Influenza B/Rinovirus/Parainfluenza	4
	Influenza B/Rinovirus/Metaneumovirus	1
	Influenza B/Parainfluenza/Metaneumovirus	2
	VSR/Influenza A/Rinovirus	2
	Coronavirus/Parainfluenza/Metaneumovirus	2
4	Influenza B/VSR/Coronavirus/Parainfluenza	1
	Influenza B/Coronavirus/Rinovirus/Parainfluenza	3
	Influenza B/Coronavirus/Parainfluenza/Metaneumovirus	2
5	Influenza B/VSR/Influenza A/Coronavirus/Rinovirus/Parainfluenza	1
	Total	82

## **Asociaciones entre las infecciones por distintos virus**

Se verificó si la infección por alguno de los agentes virales estudiados se asociaba con padecer co-infecciones mediante la prueba de Chi-cuadrada. Se encontró una asociación moderadamente fuerte y positiva entre el virus de Influenza B ( $P < 0.001$ ;  $\phi = 0.542$ ) y Parainfluenza ( $P < 0.001$ ;  $\phi = 0.573$ ) con padecimiento de co-infecciones.

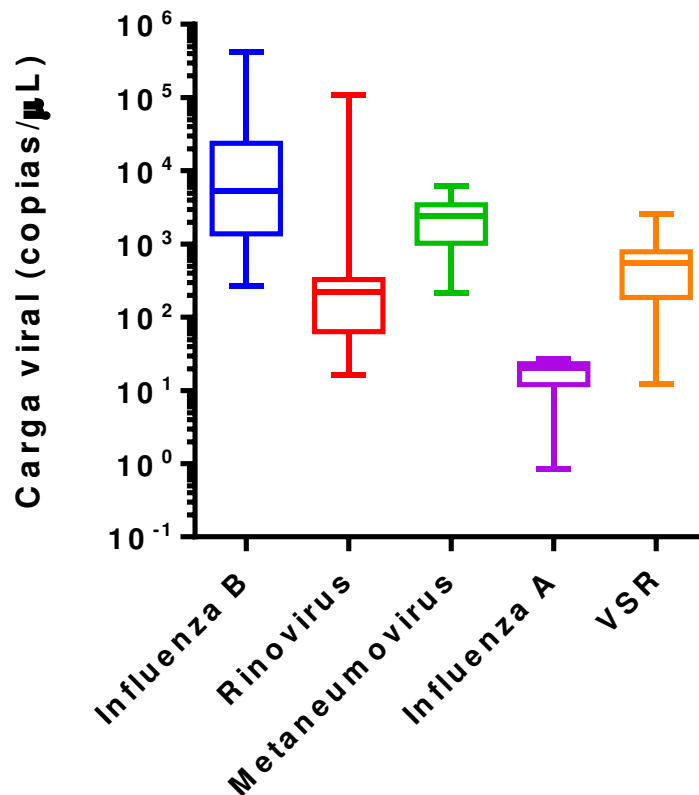
El 81.6% de los pacientes infectados con el virus de Influenza B presentaron co-infecciones, mientras el 72.7% de los pacientes influenza B negativos no presentaron alguna infección por otro virus.

Todos los casos de infección con Parainfluenza cursaron con co-infecciones, mientras el 57.9% de los pacientes negativos para este virus no presentaron alguna otra infección por otro agente viral, indicando que el virus de Parainfluenza tiende a cursar con co-infecciones, sin embargo, los pacientes negativos para este virus pueden o no tener mono-infección.

Se encontró asociación moderadamente fuerte y negativa entre los virus de Influenza B – VSR ( $P < 0.001$ ;  $\phi = -0.423$ ); también, asociación leve y positiva entre el par Influenza B – Parainfluenza ( $P < 0.05$ ;  $\phi = 0.280$ ), por otro lado, entre Coronavirus y Rinovirus se encontró una asociación moderadamente fuerte y negativa ( $P < 0.05$ ,  $\phi = -0.326$ ).

**El virus de influenza B mostró mayores cargas virales en los pacientes comparado con otros agentes etiológicos virales**

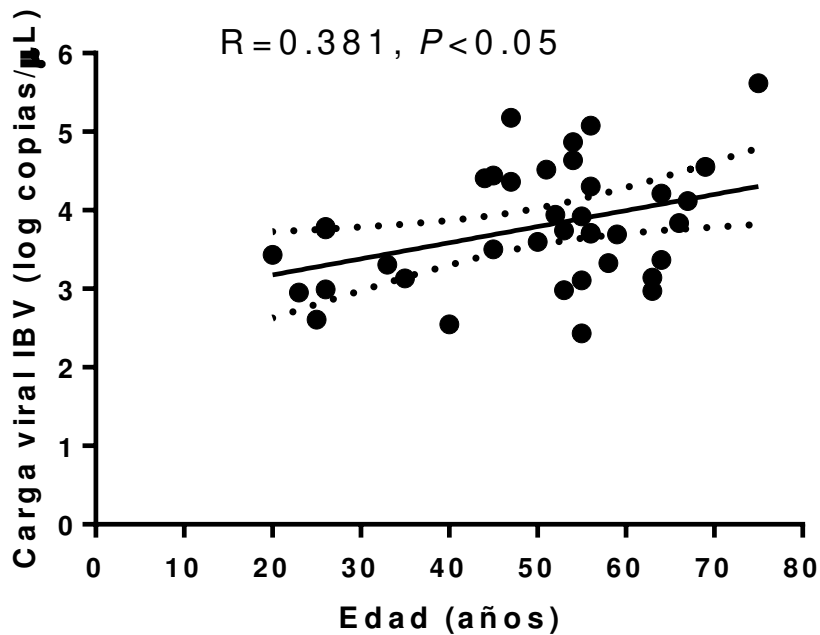
Las cargas virales mayores fueron encontradas en los casos por virus de Influenza B (mediana: 5332 copias/ $\mu$ L), seguido por Metaneumovirus (mediana: 2405.56 copias/ $\mu$ L), VSR (mediana: 553 copias/ $\mu$ L), Rinovirus (mediana: 222.16 copias/ $\mu$ L) y en último lugar el virus de Influenza A (mediana: 20.54 copias/ $\mu$ L) (**Fig. 10**)



**Fig. 10** Cargas virales observadas en los pacientes dependiendo del tipo viral. IBV n = 38, Rinovirus n = 21, Metaneumovirus n = 13, Influenza A n = 13, VSR n = 19. Los datos se representan en diagrama de “cajas y bigotes” donde las cajas representan el 95% de los datos, la línea central dentro de la caja es la mediana y el rango está indicado por los “bigotes”.

### Pacientes jóvenes mostraron menores cargas virales de Influenza B

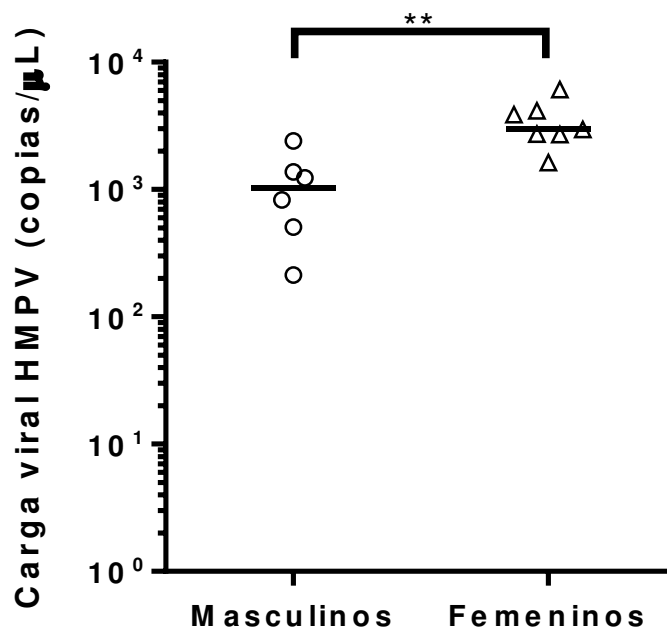
Se realizó una prueba de correlación de Pearson para verificar si existía una relación entre las cargas virales de los distintos virus analizados y la edad de los pacientes con infección respiratoria viral aguda. Se encontró una correlación moderada positiva entre los niveles de carga viral de Influenza B y la edad de los pacientes,  $R = 0.381$ ,  $P < 0.05$  con la edad explicando el 14% de variación en los niveles de carga viral de Influenza B (**Fig. 11**).



**Fig. 11** Correlación entre los niveles de logaritmo base 10 de las cargas virales de Influenza B con la edad de los pacientes. La prueba de correlación de Pearson fue utilizada para determinar una  $P < 0.05$  como significativa. Las líneas punteadas delimitan el intervalo de confianza a 95% de la mejor curva  $n = 38$

### Pacientes femeninos tienen mayor carga viral de Metaneumovirus humano

Únicamente se encontró diferencia en el caso de Metaneumovirus humano donde las distribuciones de las cargas virales para pacientes femeninos y masculinos fueron similares de acuerdo a inspección visual. La mediana fue significativamente mayor en los pacientes femeninos comparadas con los pacientes masculinos (2968 vs 1030 copias/ $\mu$ L),  $P < 0.005$  (Fig. 12).



**Fig. 12** Valores de las cargas virales de Metaneumovirus en pacientes adultos con infección respiratoria aguda dependiendo el género. Prueba U de Mann-Whitney,  $**P < 0.01$ . Pacientes masculinos  $n = 6$ , femeninos  $n = 7$ . La línea horizontal representa la mediana.

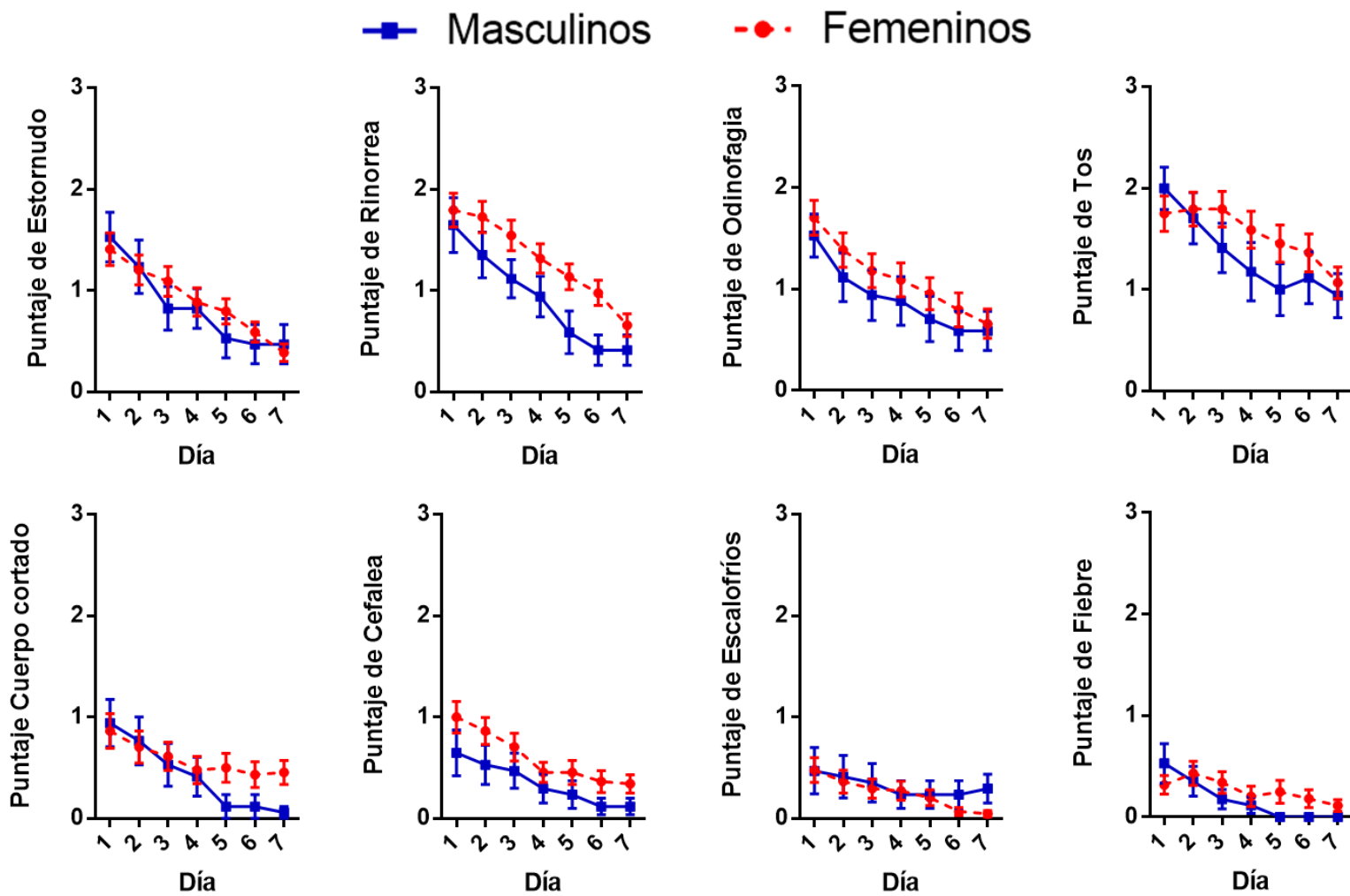


## **Pacientes con mono-infección no muestran diferencias en las cargas virales en comparación con co-infectados.**

Se realizaron pruebas T de Student para verificar si existían diferencias en los logaritmos de las cargas virales entre pacientes infectados con un solo agente viral y aquellos con co-infecciones, sin embargo, no se observó diferencia alguna en ninguno de los agentes virales estudiados ( $P>0.05$ ).

### **7.3 Los pacientes tienden a mejorar su sintomatología a los siete días**

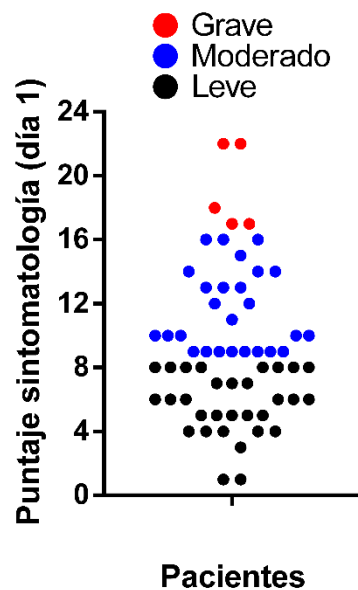
Se realizó una evaluación subjetiva por parte del paciente durante los 6 días posteriores al día del reclutamiento, donde se le indicaba reportara en una escala del 0-3 dependiendo si la sintomatología era ausente, leve, moderada o grave, respectivamente, ver sección correspondiente a esta valoración en material y métodos para mayores detalles. De los 100 pacientes reclutados, se logró obtener en 61 de ellos el seguimiento de la sintomatología durante los siete días. En el día del reclutamiento se observaron los puntajes de mayor gravedad y estos iban disminuyendo con el paso de los días. El síntoma con mayor gravedad reportada fue el de la tos, seguido de aquellos que afectan al tracto respiratorio superior (estornudo, rinorrea y odinofagia) y en menor medida los síntomas sistémicos (cuerpo cortado, cefalea, escalofríos y fiebre). No se encontró diferencia significativa entre pacientes femeninos comparados con los masculinos ( $P<0.05$ ) (**Fig. 13**).



**Fig. 13** Puntaje de cada uno de los síntomas por día de estudio y género de los pacientes con enfermedad respiratoria aguda. Los datos se representan con la media  $\pm$  error estándar de la media; n masculinos = 17, n femeninos = 44.

## La sintomatología leve a moderada fueron las presentes en nuestro grupo de estudio

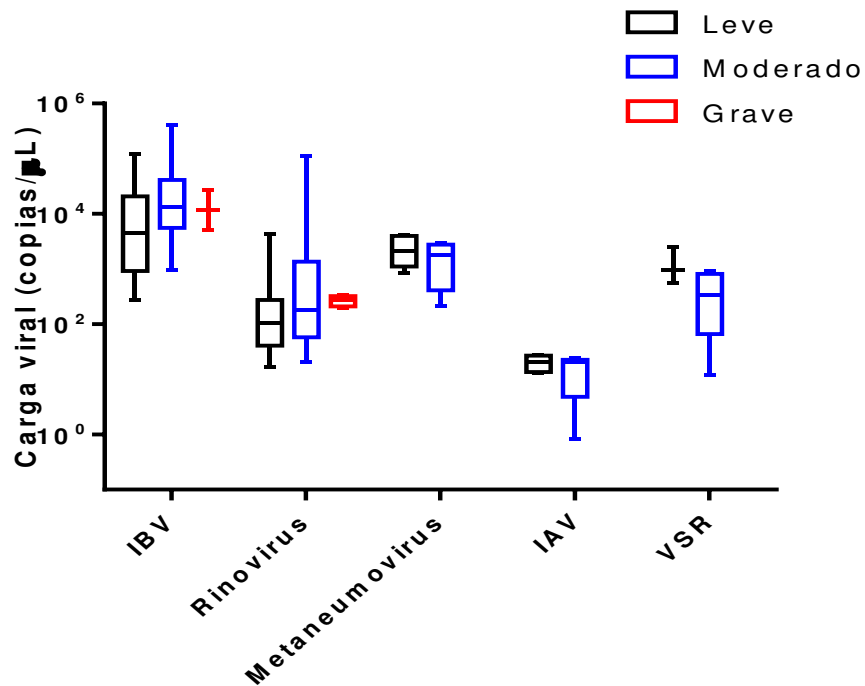
Tomando en cuenta la sumatoria del puntaje de los síntomas evaluados en el día del reclutamiento se clasificaron a los pacientes en tres categorías de gravedad, dado que la suma máxima posible es 24, se decidió considerar a los pacientes con puntajes de 0-7, 8-15 y 16-24 con sintomatología leve (30 pacientes), moderada (26 pacientes) y grave (cinco pacientes), respectivamente (**Fig. 14**).



**Fig. 14** Clasificación de los pacientes de acuerdo a la sumatoria de los puntajes de los síntomas reportados en el día del reclutamiento. n = 61

## La gravedad de la sintomatología no se asocia con las cargas virales

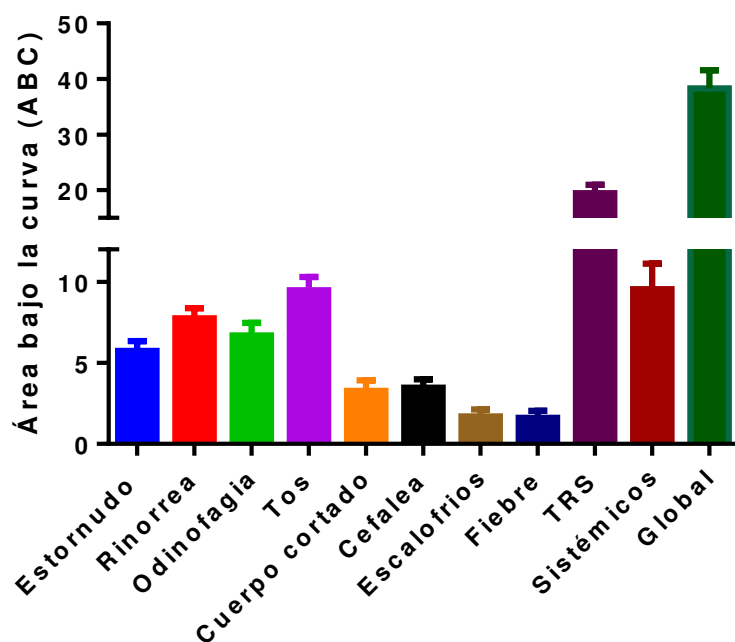
Al comparar las cargas virales de los distintos agentes virales entre pacientes con sintomatología leve, moderada y grave mediante pruebas de U de Mann-Whitney o H de Kruskal-Wallis, no se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) en ninguno de los casos por lo que la gravedad no condiciona los niveles de carga viral en los pacientes (**Fig. 15**).



**Fig. 15** Niveles de cargas virales observados en los pacientes adultos con infección respiratoria aguda dependiendo la gravedad en el día del reclutamiento. IBV leve = 14, IBV moderado = 12, IBV grave = 2, Rinovirus leve = 7, Rinovirus moderado = 6, Rinovirus grave = 4 Metaneumovirus leve = 6, Metaneumovirus moderado = 6 IAV leve = 5, IAV moderado = 8 VSR leve = 3, VSR moderado = 8 Las cajas representan el 95% de los datos, la línea horizontal dentro la caja representa la mediana y los extremos el rango.

## Los síntomas del tracto respiratorio superior mostraron una mayor área bajo la curva (ABC) en pacientes infectados

Otra forma de analizar la gravedad de la sintomatología es calculando el área bajo la curva (ABC) denotada por los puntos de cada uno de los síntomas a través de los siete días de estudio. Por esta metodología se corrobora lo anteriormente observado donde el síntoma de la tos fue el de mayor gravedad reportada, seguido de aquellos síntomas del tracto respiratorio superior (TRS) y en última instancia los síntomas sistémicos (Fig. 16). Cabe mencionar que también se realizó el cálculo englobando a los síntomas del tracto respiratorio superior, sistémicos y otro para todos los síntomas con un puntaje global del área bajo la curva.



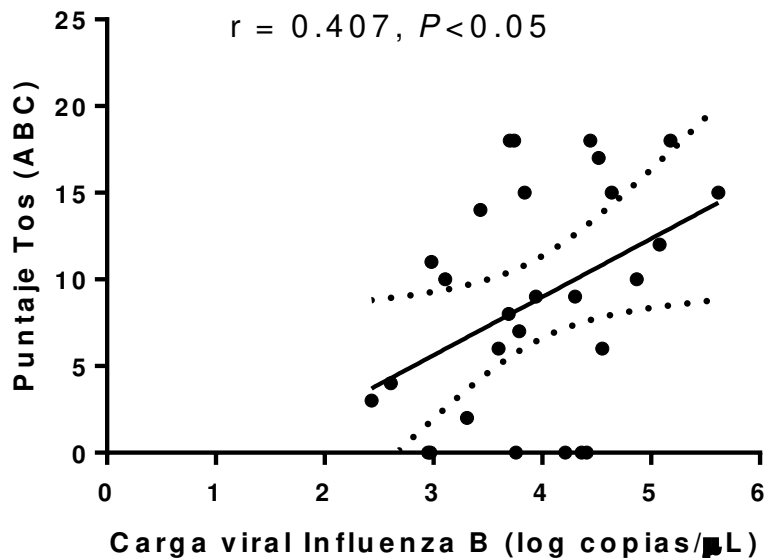
**Fig 16**  
la curva de

síntomas analizados. TRS = tracto respiratorio superior (estornudo, rinorrea y odinofagia); sistémicos = cuerpo cortado, cefalea, escalofríos y fiebre; global = todos los síntomas. Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar de la media. n = 61

Área bajo los

### La carga viral de Influenza B correlaciona positivamente con el ABC de tos

Analizando ahora la gravedad de la infección con el área bajo la curva, se realizaron pruebas de correlación de Spearman para verificar si existía asociación entre las cargas virales de algunos de los agentes patógenos estudiados y la sintomatología. Se encontró una correlación moderadamente positiva entre los niveles de carga viral de Influenza B y área bajo la curva de tos,  $r_s(27) = 0.407$  ( $P < 0.05$ ) (Fig. 17).



**Fig. 17** Correlación entre los niveles de logaritmos base 10 de cargas virales de Influenza B con las áreas bajo la curva del síntoma de la tos. La prueba de correlación de Spearman fue utilizada para determinar una  $P < 0.05$  como significativa. Las líneas punteadas indican el intervalo de confianza a 95% para la mejor línea recta.  $n = 28$ .

#### **7.4 PERFIL DE CITOCINAS EN PLASMA Y LAVADO NASAL DE PACIENTES ADULTOS CON INFECCIÓN RESPIRATORIA VIRAL AGUDA.**

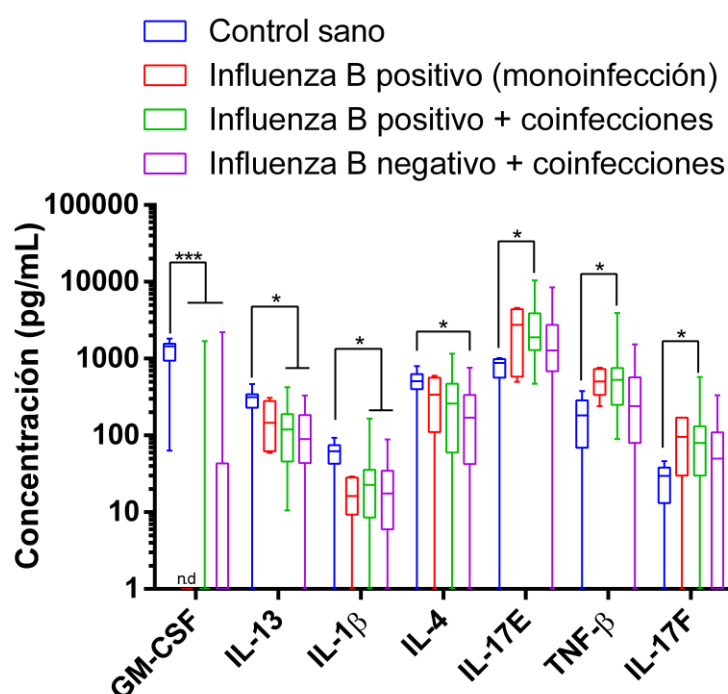
Se cuantificaron 25 citocinas: IL-17F, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, CCL20, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IL-22, IL-9, IL-1  $\beta$ , IL-33, IL-2, IL-21, IL-4, IL-23, IL-5, IL-6, IL-17E, IL-27, IL-31, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  e IL-28A por inmunoensayo multiplex, así como TGF- $\beta$  por ELISA tipo sándwich. Esto tanto en muestras de plasma como en lavado nasal a dos tiempos de análisis: el día del reclutamiento (día 1) y seis días después (día 7).

#### **Influenza B en presencia de co-infecciones induce un perfil de citocinas Th17 en plasma.**

En el caso de las citocinas plasmáticas, los grupos estudiados fueron controles sanos (n = 9), pacientes Influenza B positivos (monoinfección) (n= 6), Influenza B positivos con co-infecciones (n = 27) e Influenza B negativos con co-infecciones (n = 35). Se observó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los rangos de las siguientes citocinas: IL-17F, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , CCL20, IL-13, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-17E y TNF- $\beta$  (**Fig. 18**)

Los niveles plasmáticos (pg/mL) de GM-CSF fueron significativamente mayores en el grupo control en comparación con los tres grupos restantes ( $P < 0.001$ ). IL-1 $\beta$  e IL-13 se encontró en menor concentración en pacientes Influenza B positivo y negativo ambos con co-infecciones, pero no así con aquellos que contaban únicamente con monoinfección comparados con el control ( $P < 0.05$ ). Los niveles de IL-4 fueron significativamente mayores en los controles sanos en comparación con

el de pacientes Influenza B negativo con co-infecciones ( $P<0.05$ ). Los niveles de IL-17E, IL-17F y TNF- $\beta$  observados en el grupo de pacientes Influenza B positivos con co-infecciones fueron significativamente mayores comparados con los encontrados en el de controles sanos ( $P<0.05$ ), (**Fig. 18**).

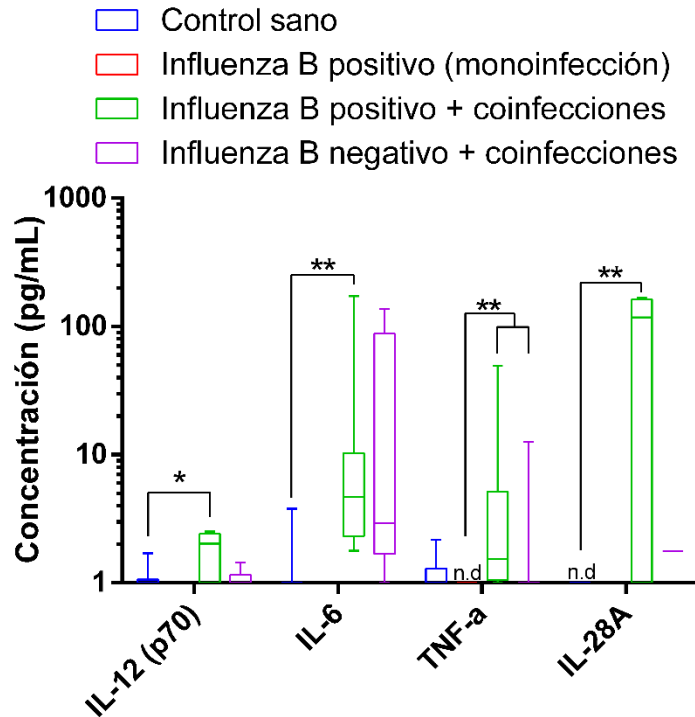


**Fig. 18** Perfil de citocinas plasmáticas en controles sanos ( $n = 9$ ), pacientes Influenza B positivos (monoinfección) ( $n = 6$ ), Influenza B positivos con co-infección ( $n = 27$ ) e Influenza B negativos con co-infección ( $n = 35$ ). Las cajas representan el 95% de los datos, la línea horizontal dentro la caja representa la mediana y los “bigotes” el valor máximo y mínimo. Un valor de (\*)  $P<0.05$  o (\*\*\*)  $P<0.001$  se consideró como significativo por medio de la prueba H de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn. n.d: no detectado



### **Influenza B en presencia de co-infecciones favorece una respuesta inflamatoria local e interferones tipo III**

En el caso de citocinas analizadas en lavado nasal, el número de casos por grupo de estudio variaron debido a que no en todos se pudieron detectar, sin embargo, por medio de la prueba H de Kruskal-Wallis se determinó que los niveles de citocinas con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los grupos de estudio fueron: IL-12 (p70), IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-28A. Los niveles (pg/mL) de IL-12 (p70), IL-6 e IL-28A en lavado nasal fueron significativamente mayores en el grupo de Influenza B positivo con co-infecciones comparados con los de controles sanos ( $P < 0.05$ ). Los niveles (pg/mL) de TNF- $\alpha$  en lavado nasal fueron significativamente menores en el grupo de pacientes infectados únicamente con Influenza B en comparación con los observados en el de Influenza B positivo o negativo ambos con co-infecciones ( $P < 0.05$ ) ver **Fig. 19**.

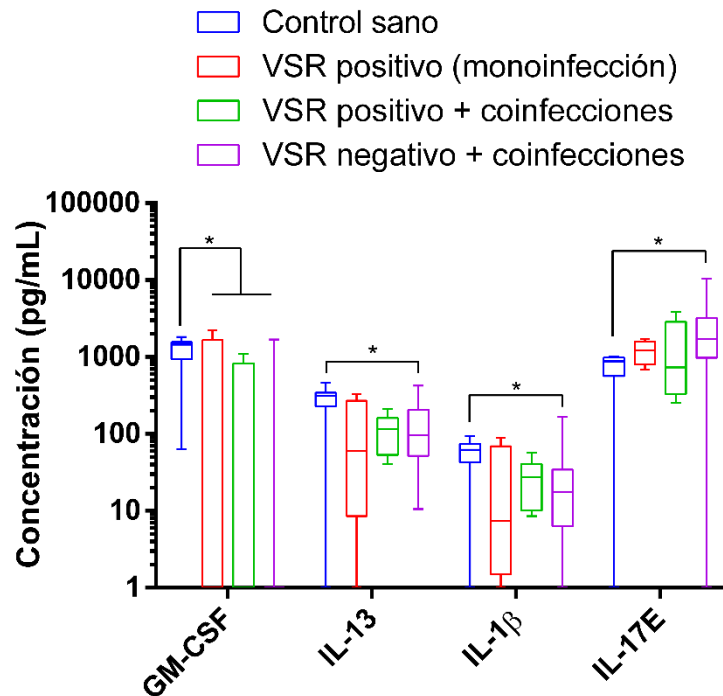


**Fig. 19** Niveles de IL-12 (p70), IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-28A en lavado nasal de controles sanos, pacientes Influenza B positivos (monoinfección), Influenza B positivos con co-infecciones e Influenza B negativos con co-infecciones. Las cajas representan el 95% de los datos, la línea horizontal dentro la caja representa la mediana y los “bigotes” el valor máximo y mínimo. Un valor de (\*)  $P < 0.05$  o (\*\*)  $P < 0.01$  se consideró como significativo por medio de la prueba H de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn. n.d: no detectado

### El VSR regula la producción de citocinas inflamatorias

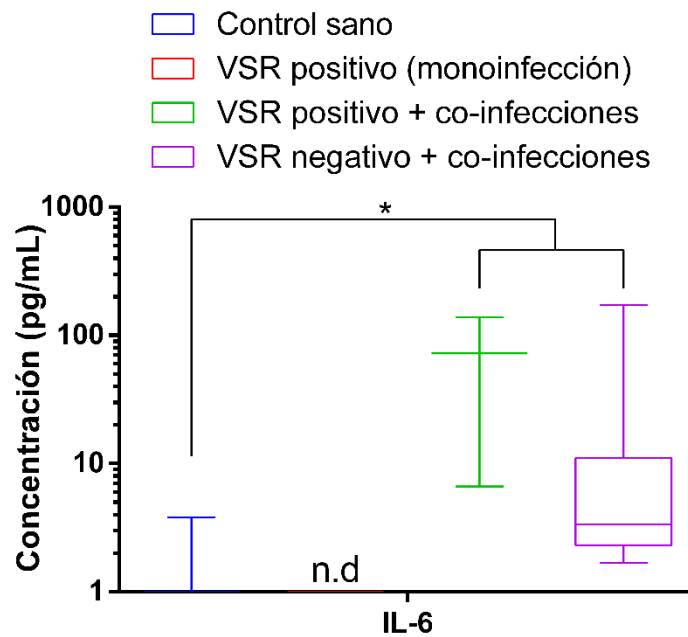
En el caso de las citocinas plasmáticas, los grupos estudiados fueron controles sanos ( $n = 9$ ), pacientes VSR positivos (monoinfección) ( $n = 4$ ), VSR positivos con co-infecciones ( $n = 7$ ) y VSR negativos con co-infecciones ( $n = 57$ ). Se observó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los rangos de las siguientes citocinas: GM-CSF, IL-13, IL-1 $\beta$  e IL-17E. Los niveles plasmáticos (pg/mL) de GM-CSF fueron menores en los grupos de pacientes infectados con virus comparado con los controles ( $P < 0.05$ ). Los niveles plasmáticos de IL-13 e IL-1 $\beta$  se encontraron

disminuidos en los pacientes VSR negativo con co-infecciones comparado con los controles ( $P<0.05$ ). Por otro lado, los niveles de IL-17E se encontraron aumentados en los pacientes VSR negativo con co-infecciones comparado con los controles ( $P<0.05$ ) ver **Fig. 20**.



**Fig. 20** Niveles plasmáticos de GM-CSF, IL-13, IL-1 $\beta$  e IL-17E en controles sanos (n = 9), pacientes VSR positivos (monoinfección) (n = 4), VSR positivo con co-infecciones (n = 7) y VSR negativo con co-infecciones (n = 57). Las cajas representan el 95% de los datos, la línea horizontal dentro la caja representa la mediana y los “bigotes” el valor máximo y mínimo. Un valor de (\*)  $P<0.05$  se consideró como significativo por medio de la prueba H de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn.

En el caso de citocinas analizadas en lavado nasal, el número de casos por grupo de estudio variaron debido a que no en todos se pudieron detectar, sin embargo, por medio de la prueba H de Kruskal-Wallis se determinó que únicamente los niveles de IL-6 fueron significativamente diferentes ( $P<0.05$ ) entre los grupos. Los niveles observados en los controles sanos fueron significativamente menores en comparación con pacientes VSR positivo o negativo ambos con co-infecciones ( $P<0.05$ ) ver **Fig. 21**.

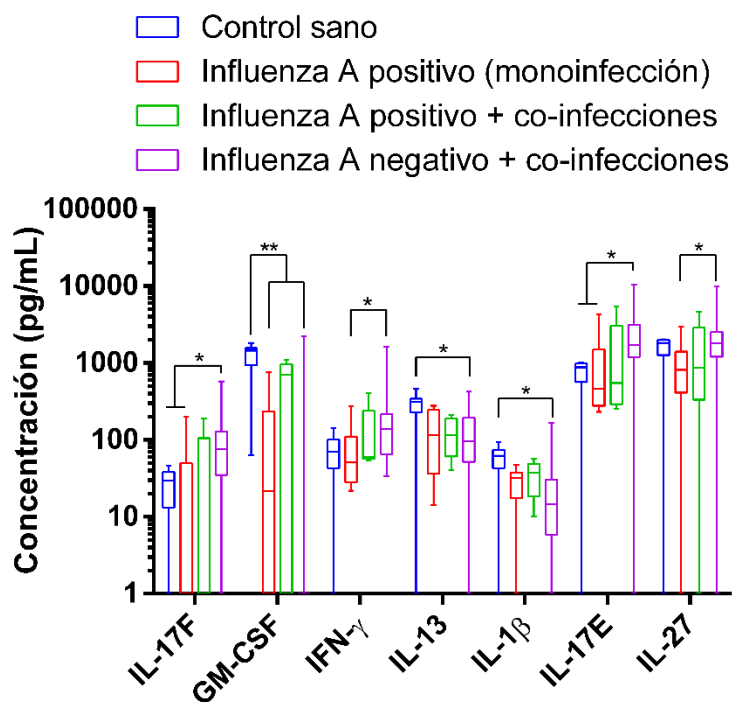


**Fig. 21** Niveles de IL-6 en lavado nasal de controles sanos ( $n = 9$ ), pacientes VSR positivos (monoinfección) ( $n = 3$ ), VSR positivos con co-infecciones ( $n = 3$ ) y VSR negativos con co-infecciones ( $n = 16$ ). Las cajas representan el 95% de los datos, la línea horizontal dentro la caja representa la mediana y los “bigotes” el valor máximo y mínimo. Un valor de (\*)  $P<0.05$  se consideró como significativo por medio de la prueba H de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn. n.d: no detectado

## **Influenza A regula los niveles de citocinas plasmáticas**

En el caso de las citocinas plasmáticas, los grupos estudiados fueron controles sanos (n = 9), pacientes Influenza A positivo (monoinfección) (n= 6), Influenza A positivo con co-infecciones (n = 5) e Influenza A negativo con co-infecciones (n = 57). Se observó diferencia significativa ( $P<0.05$ ) entre los rangos de las siguientes citocinas: IL-17F, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-13, IL-1 $\beta$ , IL-17E e IL-27.

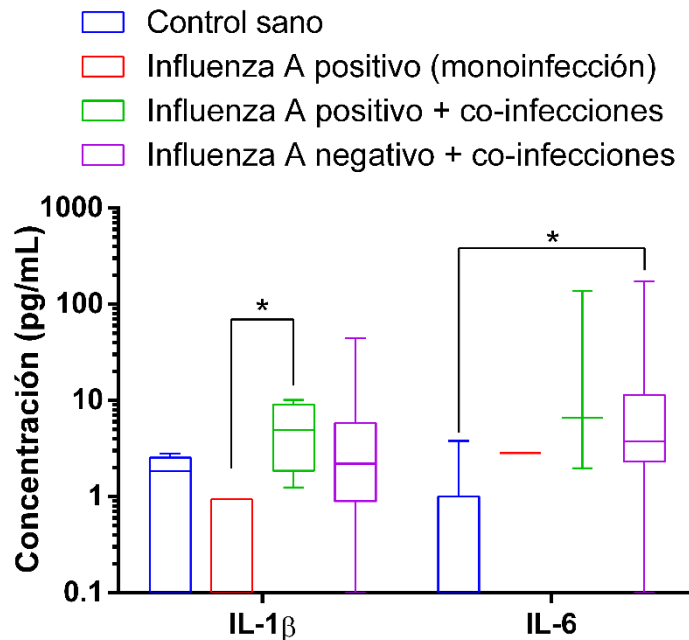
Los niveles de GM-CSF fueron significativamente mayores en los controles sanos en comparación con los de pacientes infectados únicamente con Influenza A o sin influenza ( $P<0.01$ ). Los niveles de IFN- $\gamma$  observados en los pacientes infectados únicamente con Influenza A fueron significativamente menores en comparación con aquellos infectados por otros tipos de virus ( $P<0.05$ ). Los niveles de IL-13 e IL-1 $\beta$  en el grupo de controles sanos fueron significativamente mayores en comparación con aquellos pacientes con infección viral que no contaban con Influenza A ( $P<0.05$ ). Los niveles plasmáticos de IL-17E, IL-17F e IL-27 fueron significativamente mayores en pacientes negativos para influenza A en comparación con aquellos infectados únicamente con Influenza A ( $P<0.05$ ), ver **Fig. 22**.



**Fig. 22** Niveles de expresión de algunas citocinas plasmáticas en controles sanos (n = 9), pacientes Influenza A positivos (monoinfección) (n = 6), Influenza A positivo con co-infecciones (n = 5) e Influenza A negativo con co-infecciones (n = 57). Las cajas representan el 95% de los datos, la línea horizontal dentro la caja representa la mediana y los “bigotes” el valor máximo y mínimo. Un valor de (\*)  $P < 0.05$  o (\*\*)  $P < 0.01$  se consideró como significativo por medio de la prueba H de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn.

En el caso de citocinas analizadas en lavado nasal, el número de casos por grupo de estudio variaron debido a que no en todos se pudieron detectar, sin embargo, por medio de la prueba H de Kruskal-Wallis se determinó que los niveles de citocinas con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los grupos de estudio fueron: IL-1 $\beta$  e IL-6. Los niveles de IL-1 $\beta$  en lavado nasal en el grupo de pacientes positivos para Influenza A co-infectados fueron significativamente mayores en comparación con aquellos monoinfectados ( $P < 0.05$ ). Los niveles de IL-6 en lavado

nasal fueron mayores en pacientes Influenza A negativos con co-infecciones comparados con los controles ( $P < 0.05$ ), ver **Fig. 23**.



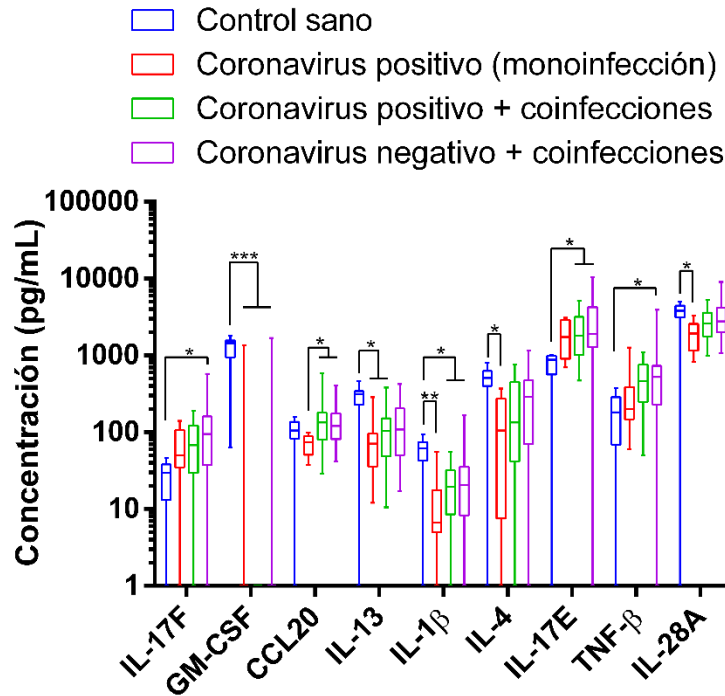
**Fig. 23** Niveles de IL-1 $\beta$  e IL-6 en lavado nasal de controles sanos, pacientes Influenza A positivos (monoinfección), Influenza A positivos con co-infecciones e Influenza A negativos con co-infecciones. Las cajas representan el 95% de los datos, la línea horizontal dentro la caja representa la mediana y los “bigotes” el valor máximo y mínimo. Un valor de (\*)  $P < 0.05$  se consideró como significativo por medio de la prueba H de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn.

### Coronavirus regula la respuesta de citocinas

En el caso de las citocinas plasmáticas, los grupos estudiados fueron controles sanos ( $n = 9$ ), pacientes Coronavirus positivo (monoinfección) ( $n = 8$ ), Coronavirus positivo con co-infecciones ( $n = 18$ ) y Coronavirus negativo con co-infecciones ( $n = 26$ ). Se observó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los rangos de las siguientes

citocinas: IL-17F, GM-CSF, CCL20, IL-13, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-17E, TNF- $\beta$  e IL-28A. Los niveles de IL-17F en pacientes coronavirus negativos con co-infecciones fueron significativamente mayores en comparación con los controles sanos ( $P<0.05$ ). GM-CSF en controles sanos fueron significativamente mayores en comparación con los tres grupos restantes ( $P<0.001$ ). CCL20 en el grupo de pacientes infectados con Coronavirus o negativo ambos con co-infecciones fueron significativamente mayores en comparación con aquellos que estaban infectados únicamente con Coronavirus ( $P<0.05$ ). IL-13 en el grupo de controles sanos fueron significativamente mayores en comparación con los pacientes infectados únicamente con Coronavirus o con co-infecciones ( $P<0.05$ ). IL-1 $\beta$  en el grupo de controles sanos fueron significativamente mayores en comparación con Coronavirus positivo (monoinfección) ( $P<0.01$ ), Coronavirus positivo y negativo ambos con co-infecciones ( $P<0.05$ ). IL-4 en el grupo de controles sanos fueron significativamente mayores en comparación con los de pacientes infectados únicamente con Coronavirus ( $P<0.05$ ). IL-17E en los grupos de pacientes Coronavirus positivo o negativo ambos con co-infecciones fueron significativamente mayores en comparación con los de controles sanos ( $P<0.05$ ). TNF- $\beta$  en el grupo de pacientes Coronavirus negativo con co-infecciones fueron significativamente mayores en comparación con los de controles sanos ( $P<0.05$ ). IL-28A en el grupo de controles sanos fueron significativamente mayores en comparación con el de pacientes infectados únicamente con Coronavirus ( $P<0.05$ ), ver **Fig. 24**.

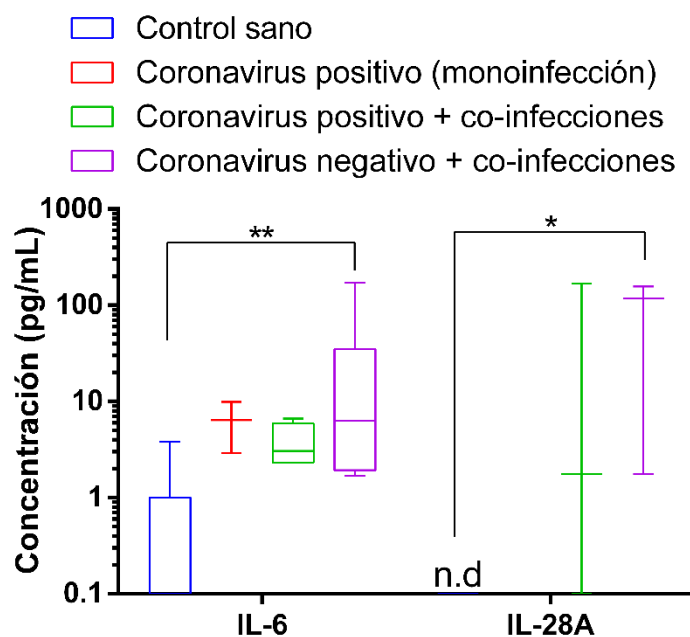




**Fig. 24** Niveles de citocinas plasmáticas en controles sanos (n = 9), pacientes Coronavirus positivo (monoinfección) (n = 8), Coronavirus positivo con coinfecciones (n = 18) y Coronavirus negativo con co-infecciones (n = 26). Las cajas representan el 95% de los datos, la línea horizontal dentro la caja representa la mediana y los “bigotes” el valor máximo y mínimo. Un valor de (\*)  $P < 0.05$  o (\*\*)  $P < 0.01$  o (\*\*\*)  $P < 0.001$  se consideró como significativo por medio de la prueba H de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn.

En el caso de citocinas analizadas en lavado nasal, el número de casos por grupo de estudio variaron debido a que no en todos se pudieron detectar, sin embargo, por medio de la prueba H de Kruskal-Wallis se determinó que los niveles de citocinas con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los grupos de estudio fueron: IL-6 e IL-28A. Los niveles de IL-6 en lavado nasal se encontraron elevados en pacientes negativos para Coronavirus con co-infecciones ( $P < 0.05$ ). El grupo de pacientes únicamente infectados con Coronavirus no contó con casos para IL-28A

en lavado nasal por lo que se excluyó del análisis y el grupo de pacientes Coronavirus negativo con co-infecciones fueron significativamente mayores en comparación a los controles sanos ( $P<0.05$ ), ver **Fig. 25**.

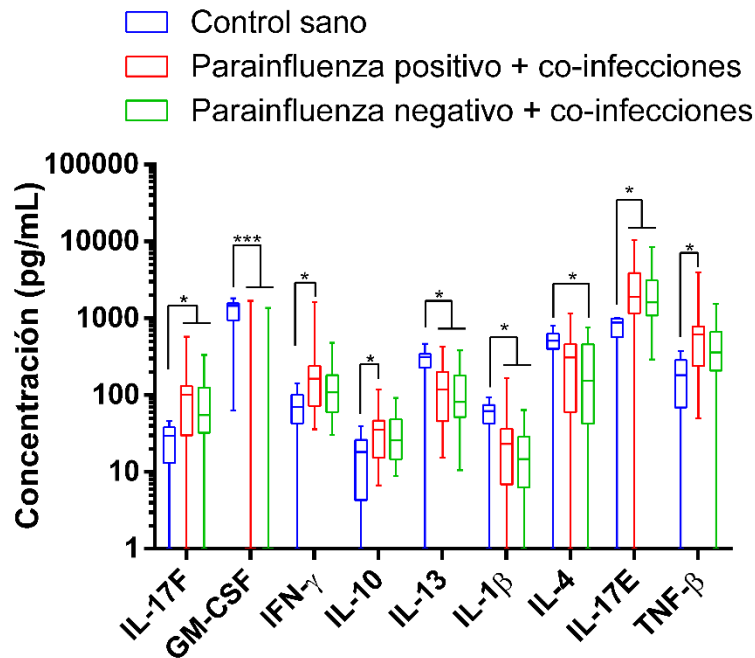


**Fig. 25** Niveles de IL-6 e IL-28A en lavado nasal de controles sanos, pacientes Coronavirus positivo (monoinfección), Coronavirus positivo con co-infecciones y Coronavirus negativo con co-infecciones. Las cajas representan el 95% de los datos, la línea horizontal dentro la caja representa la mediana y los “bigotes” el valor máximo y mínimo. Un valor de (\*)  $P<0.05$  o (\*\*)  $P<0.01$  se consideró como significativo por medio de la prueba H de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn. n.d: no detectado

## **Parainfluenza induce respuesta de citocinas Th1/Th17/Treg en plasma**

Para verificar si existían diferencias significativas entre los valores de las distintas citocinas evaluadas en plasma como en lavado nasal de los pacientes adultos con infección respiratoria debido a Parainfluenza, se realizaron pruebas H de Kruskal-Wallis con análisis post-hoc para comparaciones múltiples de Dunn.

En el caso de las citocinas plasmáticas, los grupos estudiados fueron controles sanos ( $n = 9$ ), pacientes Parainfluenza positivo con co-infecciones ( $n= 19$ ) y Parainfluenza negativo con co-infecciones ( $n = 32$ ). No hubo casos de pacientes infectados únicamente con Parainfluenza. Se observó diferencia significativa ( $P<0.05$ ) entre los rangos de las siguientes citocinas: IL-17F, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-13, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-17E y TNF- $\beta$ . Los niveles de IL-17F e IL-17E en el grupo de pacientes Parainfluenza positivos o negativos ambos con co-infecciones, fueron significativamente mayores en comparación con los controles sanos ( $P<0.05$ ). Las concentraciones de GM-CSF fueron significativamente mayores en controles sanos comparados con los grupos de infectados ( $P<0.001$ ). IFN- $\gamma$  e IL-10 en el grupo de pacientes Parainfluenza positivos con co-infecciones fueron significativamente mayores en comparación con los de controles sanos ( $P<0.05$ ). IL-13 e IL-1 $\beta$  en los controles sanos fueron significativamente mayores en comparación con los grupos de estudio ( $P<0.05$ ). Los niveles de IL-4 en los controles sanos fueron significativamente mayores en comparación con los de pacientes Parainfluenza negativos, pero con infección por otros virus ( $P<0.05$ ). TNF- $\beta$  en el grupo de pacientes infectados con Parainfluenza, fueron significativamente mayores en comparación con los de controles sanos ( $P<0.05$ ), ver **Fig. 26**.

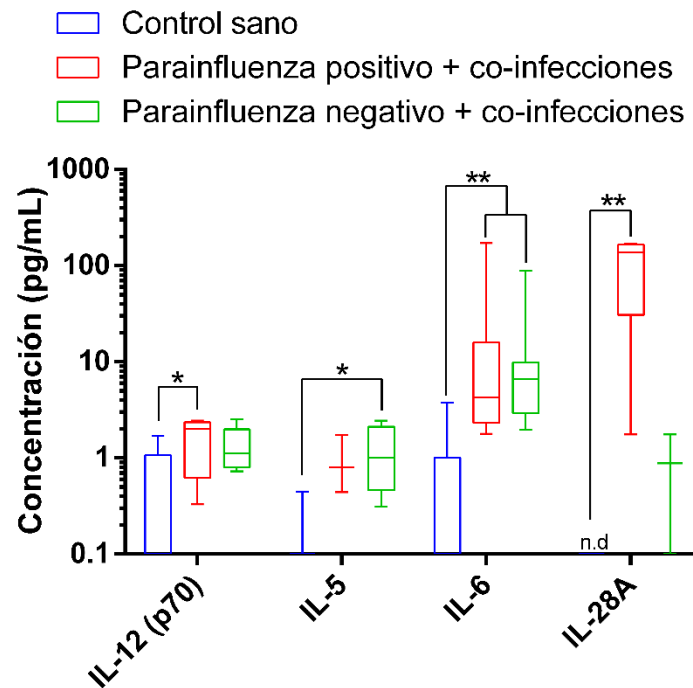


**Fig. 26** Niveles de citocinas plasmáticas en controles sanos (n = 9), pacientes Parainfluenza positivos con co-infecciones (n = 19) y Parainfluenza negativos con co-infecciones (n = 32). Las cajas representan el 95% de los datos, la línea horizontal dentro la caja representa la mediana y los “bigotes” el valor máximo y mínimo. Un valor de (\*)  $P < 0.05$  o (\*\*)  $P < 0.01$  se consideró como significativo por medio de la prueba H de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn.

### Parainfluenza induce respuesta local de citocinas inflamatorias e IL-28A

En el caso de citocinas analizadas en lavado nasal, el número de casos por grupo de estudio variaron debido a que no en todos se pudieron detectar, sin embargo, por medio de la prueba H de Kruskal-Wallis se determinó que los niveles de citocinas con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los grupos de estudio fueron: IL-12 (p70), IL-13, IL-5, IL-6 e IL-28A. Los niveles de IL-12 (p70) en lavado nasal de los pacientes infectados con Parainfluenza, fueron significativamente mayores en comparación con los de controles sanos ( $P < 0.05$ ). Los niveles de IL-5

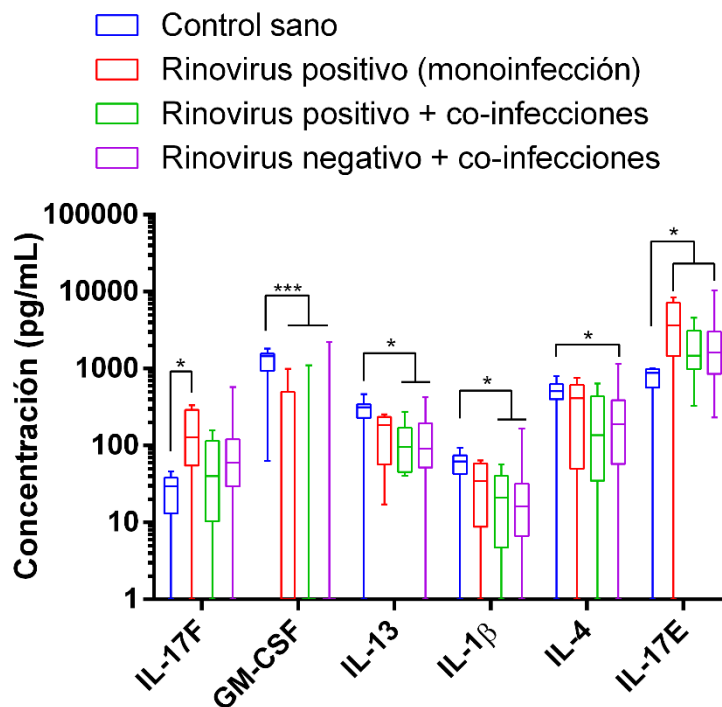
fueron significativamente mayores en pacientes sin Parainfluenza, pero con algún otro tipo de virus comparado con los controles ( $P < 0.05$ ). Los niveles de IL-6 fueron mayores en los grupos de pacientes infectados comparados con los controles ( $P < 0.01$ ). IL-28A fue mayor en pacientes infectados con Parainfluenza en comparación con los controles ( $P < 0.01$ ), ver **Fig. 27**.



**Fig. 27** Niveles de IL-12 (p70), IL-5, IL-6 e IL-28A en lavado nasal de controles sanos, pacientes Parainfluenza positivos y negativos con co-infecciones. Las cajas representan el 95% de los datos, la línea horizontal dentro la caja representa la mediana y los “bigotes” el valor máximo y mínimo. Un valor de (\*)  $P < 0.05$  o (\*\*)  $P < 0.01$  se consideró como significativo por medio de la prueba H de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn. n.d: no detectado

### Rinovirus induce una respuesta de citocinas Th17 en plasma

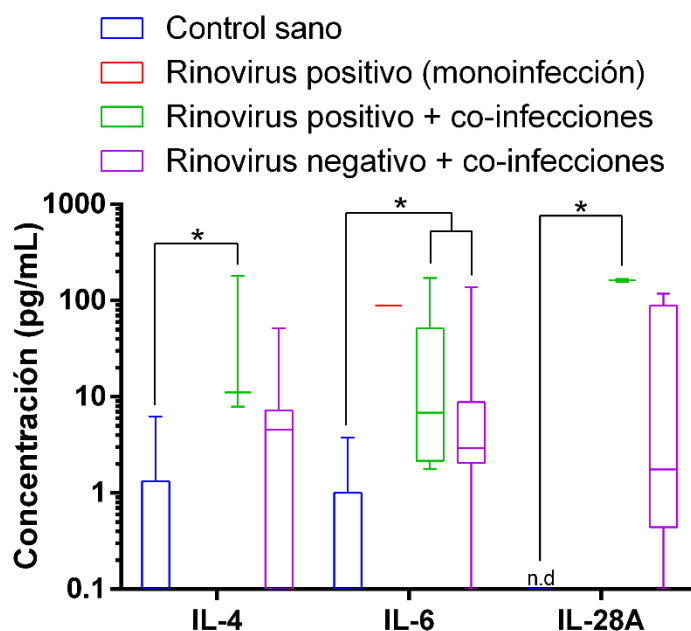
En el caso de las citocinas plasmáticas, los grupos estudiados fueron controles sanos (n = 9), pacientes Rinovirus positivo (monoinfección) (n= 5), Rinovirus positivo con co-infecciones (n = 13) y Rinovirus negativo con co-infecciones (n = 50). Se observó diferencia significativa ( $P<0.05$ ) entre los rangos de las siguientes citocinas: IL-17F, GM-CSF, IL-13, IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-17E. Los niveles de IL-17F en el grupo de pacientes infectados únicamente con Rinovirus, fueron significativamente mayores en comparación con los de controles sanos ( $P<0.05$ ). GM-CSF se encontró disminuido en los grupos estudiados comparado con los controles ( $P<0.001$ ). Los niveles de IL-13 e IL-1 $\beta$  observados en los controles sanos fueron significativamente mayores en comparación con los de pacientes Rinovirus positivo o negativo, ambos con co-infecciones ( $P<0.05$ ). IL-4 en los controles sanos fue significativamente mayor en comparación al grupo de Rinovirus negativos con co-infecciones ( $P<0.05$ ). IL-17E en el grupo de Rinovirus sin co-infección, así como en el grupo de Rinovirus negativos con co-infecciones fueron significativamente mayores en comparación con los de controles sanos ( $P<0.05$ ), ver **Fig. 28**.



**Fig. 28** Niveles de citocinas plasmáticas en controles sanos (n = 9), pacientes Rinovirus positivo (monoinfección) (n = 5), Rinovirus positivo con co-infecciones (n = 13) y Rinovirus negativo con co-infecciones (n = 50). Las cajas representan el 95% de los datos, la línea horizontal dentro la caja representa la mediana y los “bigotes” el valor máximo y mínimo. Un valor de (\*)  $P < 0.05$  o (\*\*)  $P < 0.01$  se consideró como significativo por medio de la prueba H de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn.

En el caso de citocinas analizadas en lavado nasal, el número de casos por grupo de estudio variaron debido a que no en todos se pudieron detectar, sin embargo, por medio de la prueba H de Kruskal-Wallis se determinó que los niveles de citocinas con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los grupos fueron: IL-4, IL-6 e IL-28A (**Fig. 29**). Los niveles de IL-4 en el grupo de Rinovirus positivo con co-infecciones fueron significativamente mayores en comparación con los de controles

sanos ( $P < 0.05$ ). Los niveles de IL-6 fueron significativamente mayores en los pacientes Rinovirus positivo o negativo acompañado de co-infecciones en ambos casos en comparación con los de controles sanos ( $P < 0.05$ ). IL-28A en pacientes Rinovirus positivo con co-infecciones fueron significativamente mayores en comparación con los de controles sanos ( $P < 0.05$ ).

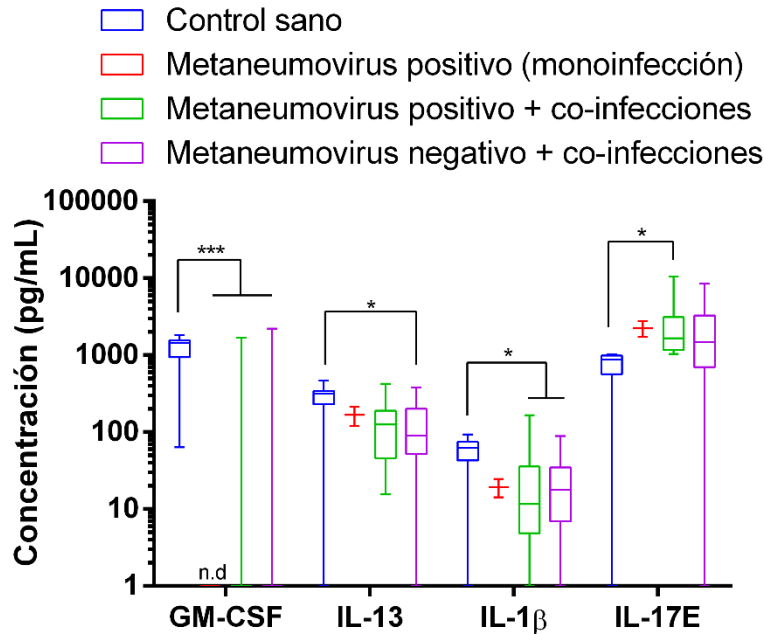


**Fig. 29** Niveles de IL-4, IL-6 e IL-28A en lavado nasal de controles sanos, pacientes Rinovirus positivo (monoinfección), Rinovirus positivo con co-infecciones y Rinovirus negativo con co-infecciones. Las cajas representan el 95% de los datos, la línea horizontal dentro la caja representa la mediana y los “bigotes” el valor máximo y mínimo. Un valor de (\*)  $P < 0.05$  se consideró como significativo por medio de la prueba H de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn. n.d: no detectado



### **Perfil de citocinas en pacientes adultos con infección respiratoria viral aguda por Metaneumovirus humano**

En el caso de las citocinas plasmáticas, los grupos estudiados fueron controles sanos ( $n = 9$ ), pacientes Metaneumovirus positivo (monoinfección) ( $n= 2$ ), Metaneumovirus positivo con co-infecciones ( $n = 11$ ) y Metaneumovirus negativo con co-infecciones ( $n = 55$ ). Se observó diferencia significativa ( $P<0.05$ ) entre los rangos de las siguientes citocinas: GM-CSF, IL-13, IL-1 $\beta$  e IL-17E (**Fig. 30**). Los niveles GM-CSF fueron significativamente mayores en comparación con los tres grupos restantes ( $P<0.001$ ). IL-13 en el grupo de controles sanos fue mayor en comparación con el grupo de Metaneumovirus negativo con co-infecciones ( $P<0.05$ ). IL-1 $\beta$  fue menor en los grupos de Metaneumovirus negativo con co-infecciones y Metaneumovirus positivo con infección por algún otro virus en comparación con los de controles sanos ( $P<0.05$ ). Los niveles IL-17E en el grupo de pacientes infectados por Metaneumovirus y algún otro virus (co-infecciones) fueron significativamente mayores en comparación con los de controles sanos ( $P<0.05$ ).

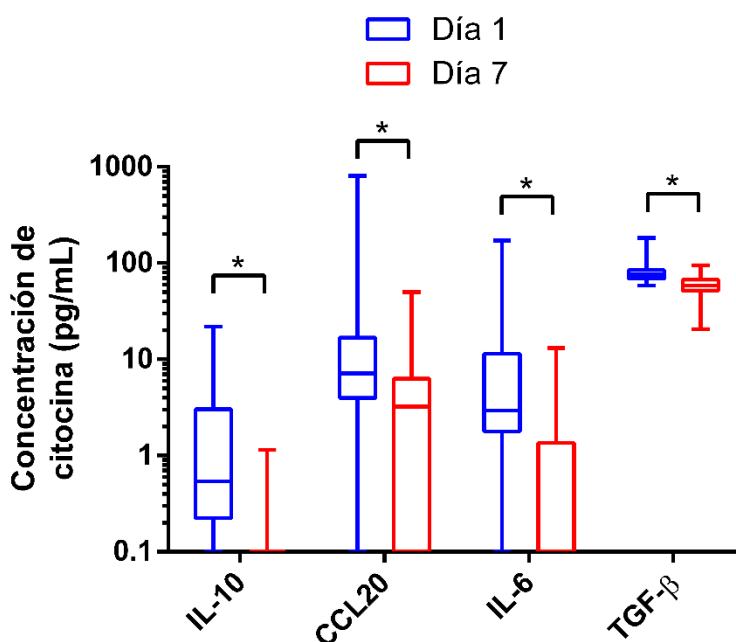


**Fig. 30** Niveles de citocinas plasmáticas en controles sanos (n = 9), pacientes Metaneumovirus positivo (monoinfección) (n = 2), Metaneumovirus positivo con co-infecciones (n = 11) y Metaneumovirus negativo con co-infecciones (n = 55). Las cajas representan el 95% de los datos, la línea horizontal dentro la caja representa la mediana y los “bigotes” el valor máximo y mínimo. Un valor de (\*)  $P < 0.05$  o (\*\*\*)  $P < 0.001$  se consideró como significativo por medio de la prueba H de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn. n.d: no detectado

En el caso de citocinas analizadas en lavado nasal, el número de casos por grupo de estudio variaron debido a que no en todos se pudieron detectar, aun así, por medio de la prueba H de Kruskal-Wallis ninguna citocina resultó con niveles significativamente diferentes entre los grupos ( $P > 0.05$ ).

## IL-10, CCL20, IL-6 y TGF- $\beta$ en lavado nasal se observaron elevadas en el día del reclutamiento en comparación con el día siete

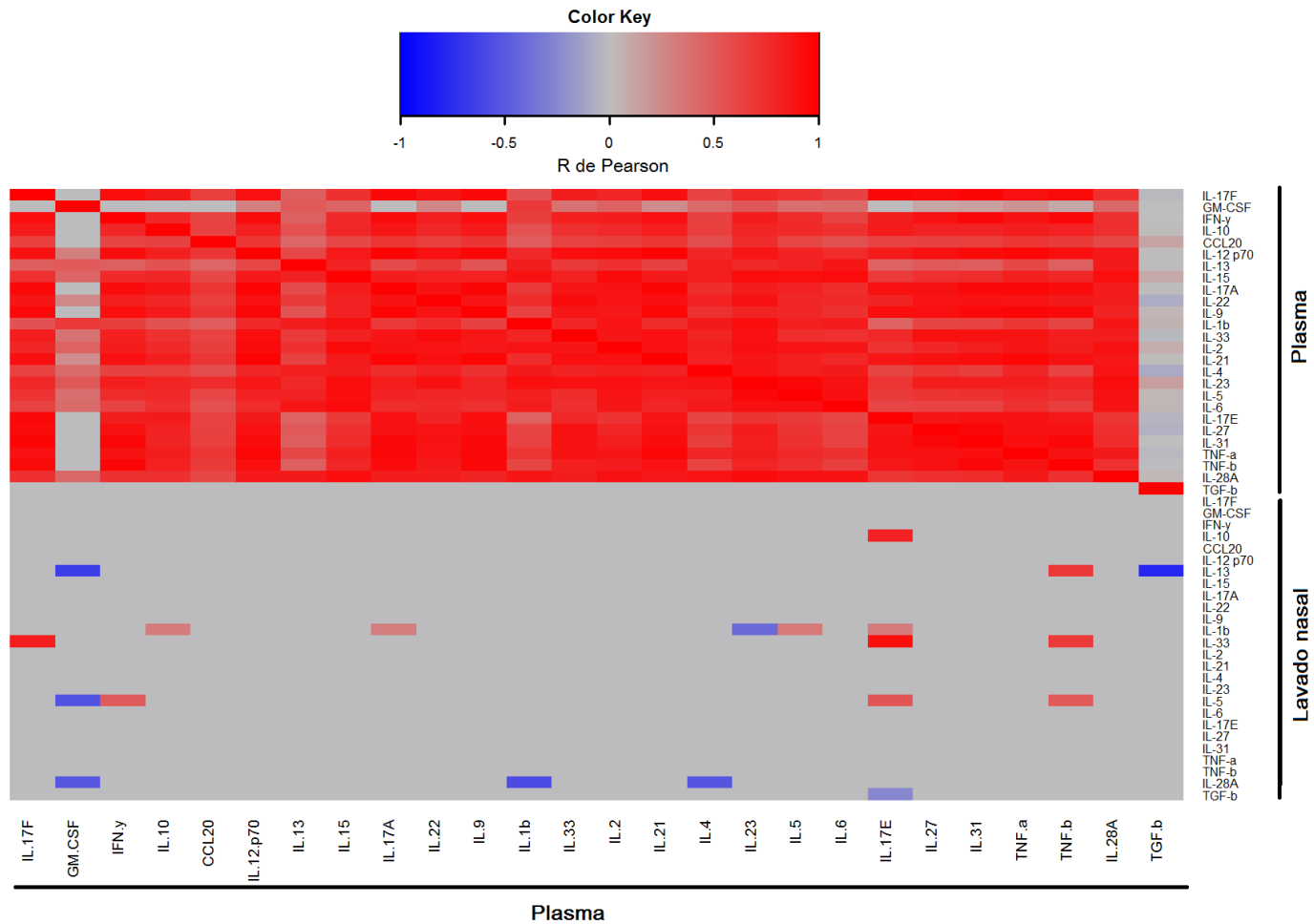
En el caso de las citocinas plasmáticas, en ninguna se observó diferencia ( $P>0.05$ ), sin embargo, en lavado nasal, los niveles (pg/mL) en el día del reclutamiento de IL-10 (media; rango) (2.09; 0 – 21.85), CCL20 (31.65; 0 – 809.79), IL-6 (17.16; 0 – 171.90) y TGF- $\beta$  (95.14; 51.24 – 182.29) fueron mayores ( $P<0.05$ ) que los observados en el día siete: IL-10 (0.15; 0 - 1.14), CCL20 (6.14; 0 – 49.86), IL-6 (1.19; 0 – 13.10) y TGF- $\beta$  (60.89; 20.59 – 95.07) (**Fig. 31**).



**Fig. 31** Niveles de concentración de IL-10, CCL20, IL-6 y TGF- $\beta$  en lavado nasal de pacientes adultos con infección respiratoria viral aguda analizados en el día 1 y 7. Se consideró una  $P<0.05$ (\*) como significativo por medio de la prueba de Wilcoxon. IL-10 n = 9, CCL20 n = 22, IL-6 n = 18 y TGF- $\beta$  n = 43. Las cajas representan el 95% de los datos, la línea horizontal dentro la caja representa la mediana y los extremos el rango.

## **El ambiente de citocinas en la mucosa nasal es diferente al observado en el sistémico**

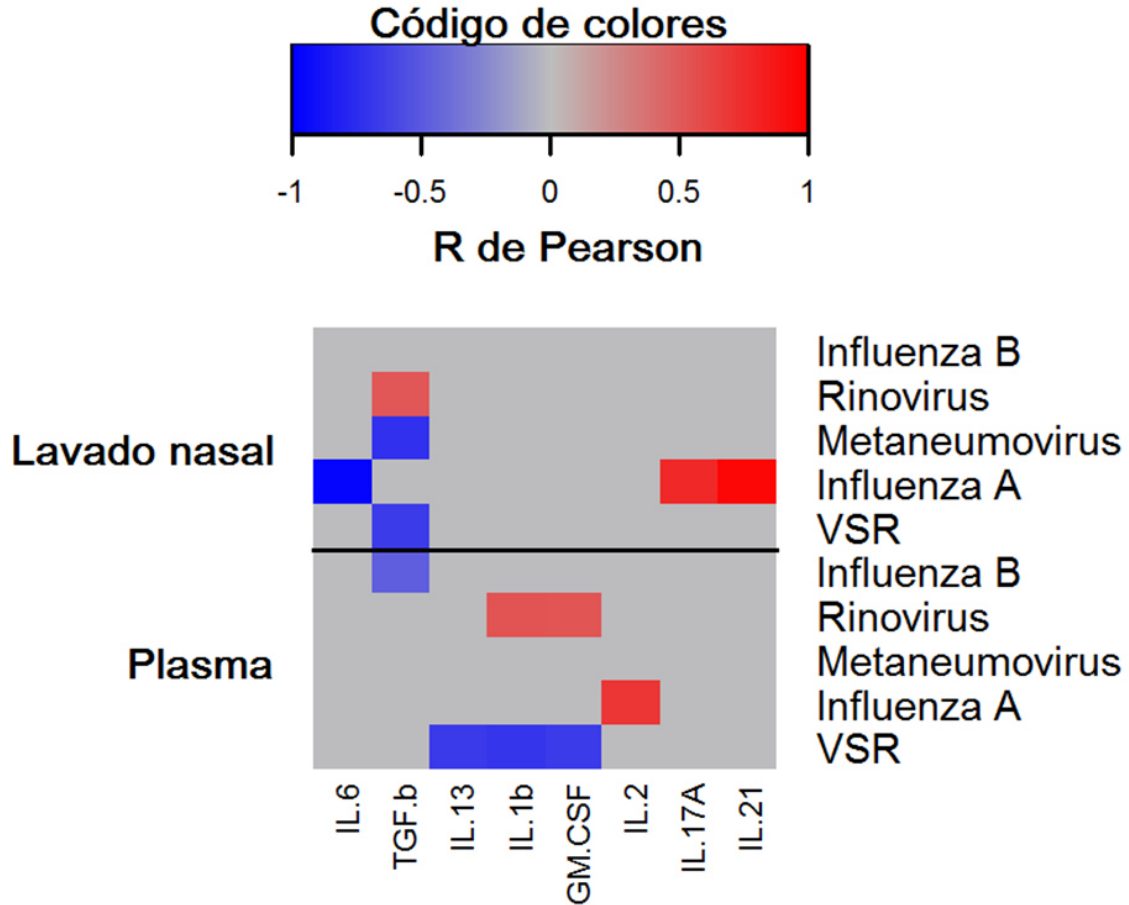
Se realizaron pruebas de correlación de Pearson para verificar si existía asociación entre los niveles de citocinas plasmáticas y en lavado nasal. Para fines prácticos, aquellas correlaciones no significativas fueron consideradas con un coeficiente igual a cero. La gran mayoría de las citocinas plasmáticas correlacionan entre sí (**Fig. 32**), sin embargo, solo se encontraron 21 correlaciones con los niveles observados en el lavado nasal lo que hablaría de un ambiente inmunológico muy diferente entre ambos sitios anatómicos.



**Fig. 32** Mapa de calor que muestra las correlaciones entre los mismos niveles de citocinas plasmáticas o con los de lavado nasal en pacientes adultos con infección respiratoria viral aguda, n plasma = 77, n lavado nasal = 44, se consideró significativo una  $P < 0.05$  mediante la prueba de correlación de Pearson, aquellas correlaciones no significativas se consideró una  $R=0$ .

### **Citocinas plasmáticas y de lavado nasal correlacionan con cargas virales**

Se encontró que existía correlación entre los logaritmos de las cargas virales de algunos agentes patógenos con los niveles de citocinas tanto plasmáticas como de lavado nasal mediante la prueba de correlación de Pearson ( $P < 0.05$ ). Se encontraron seis correlaciones (tres positivas y negativas, respectivamente) entre los niveles de citocinas en lavado nasal con las cargas virales de Rinovirus, Metaneumovirus, Influenza A y VSR. Mientras en plasma se observaron siete (tres positivas y cuatro negativas) con los virus de Influenza B, Rinovirus, Influenza A y VSR. Ninguna de las correlaciones entre las citocinas en lavado nasal con cargas virales concordó con las observadas en plasma. A pesar que se encontraron mayor cantidad de correlaciones entre citocinas plasmáticas con cargas virales, las observadas en lavado nasal fueron más fuertes. Por ejemplo, TGF- $\beta$  en lavado nasal correlacionó de forma negativa con las cargas virales de Rinovirus  $R = 0.523$ ,  $P < 0.05$ , por otro lado, IL-6 se asoció de forma negativa con el virus de influenza A,  $R = -0.873$ ,  $P < 0.05$ ; mientras que IL-17A de forma positiva,  $R = 0.773$ ,  $P < 0.05$ . En cambio, GM-CSF e IL-1 $\beta$  en plasma correlacionaron de forma positiva con Rinovirus  $R = 0.528$  y  $R = 0.537$ , respectivamente,  $P < 0.05$ , además TGF- $\beta$  correlacionó negativamente con las cargas virales de Influenza B,  $R = -0.437$ ,  $P < 0.05$ , ver **Fig. 33**.

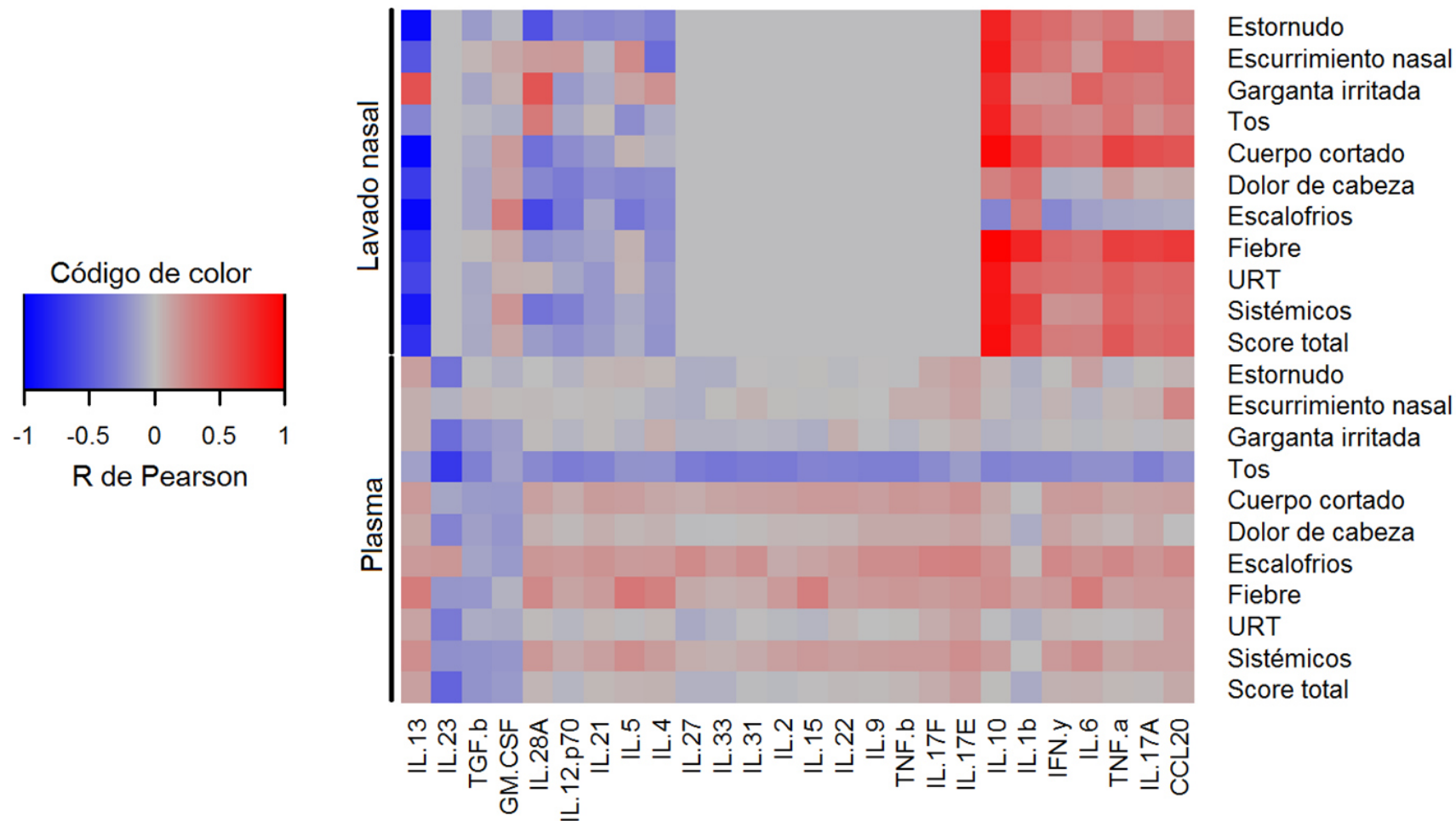


**Fig. 33** Mapa de calor que muestra las correlaciones entre los niveles de cargas virales y citocinas plasmáticas o de lavado nasal en pacientes adultos con infección respiratoria aguda. En lavado nasal: n IBV=12, n Rinovirus = 12, n Metaneumovirus =8, n Influenza A = 8, n VSR = 11. En plasma: n IBV = 38, n Rinovirus = 18, n Metaneumovirus = 13, n Influenza A = 13, n VSR = 18. Se consideró significativo una  $P < 0.05$  mediante la prueba de correlación de Pearson, en aquellas correlaciones no significativas se consideró una  $R=0$ .

**Citocinas pro-inflamatorias y T<sub>H</sub>2 correlacionan de forma positiva y negativa, respectivamente con la sintomatología de la infección respiratoria.**

Al verificar si los niveles de citocinas tanto de plasma como de lavado nasal correlacionaban con la gravedad de la sintomatología, se lograron agrupar en tres categorías: 1) Citocinas pro-inflamatorias (IL-1  $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ), CCL20, IL-17A, IFN- $\gamma$ , así como IL-10 correlacionan de forma positiva con la mayoría de los síntomas. 2) Citocinas T<sub>H</sub>2 (IL-4, IL-5 e IL-13) correlacionan de forma negativa y 3) citocinas que no se asociaron con la gravedad de la infección. También, las citocinas analizadas en lavado nasal fueron las que mejor correlacionaron con la sintomatología en comparación con las plasmáticas (**Fig. 34**).

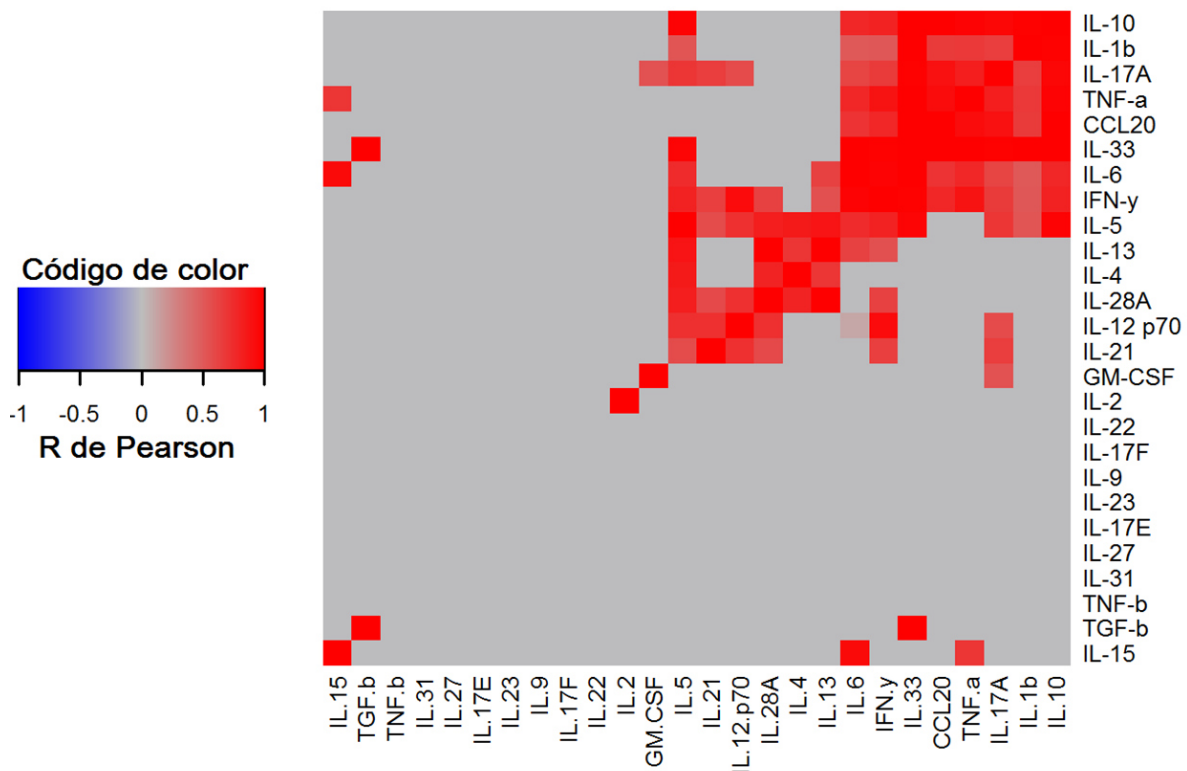




**Fig. 34** Mapa de calor que muestra las correlaciones entre los niveles de citocinas en plasma y de lavado nasal con las áreas bajo la curva de los síntomas evaluados en pacientes adultos con infección respiratoria viral aguda. n plasma = 54, n lavado nasal = 34, se consideró significativo una  $P < 0.05$  mediante la prueba de correlación de Pearson, en aquellas correlaciones no significativas se consideró una  $R = 0$ .

## IL-10 correlaciona de forma positiva con citocinas pro-inflamatorias en lavado nasal

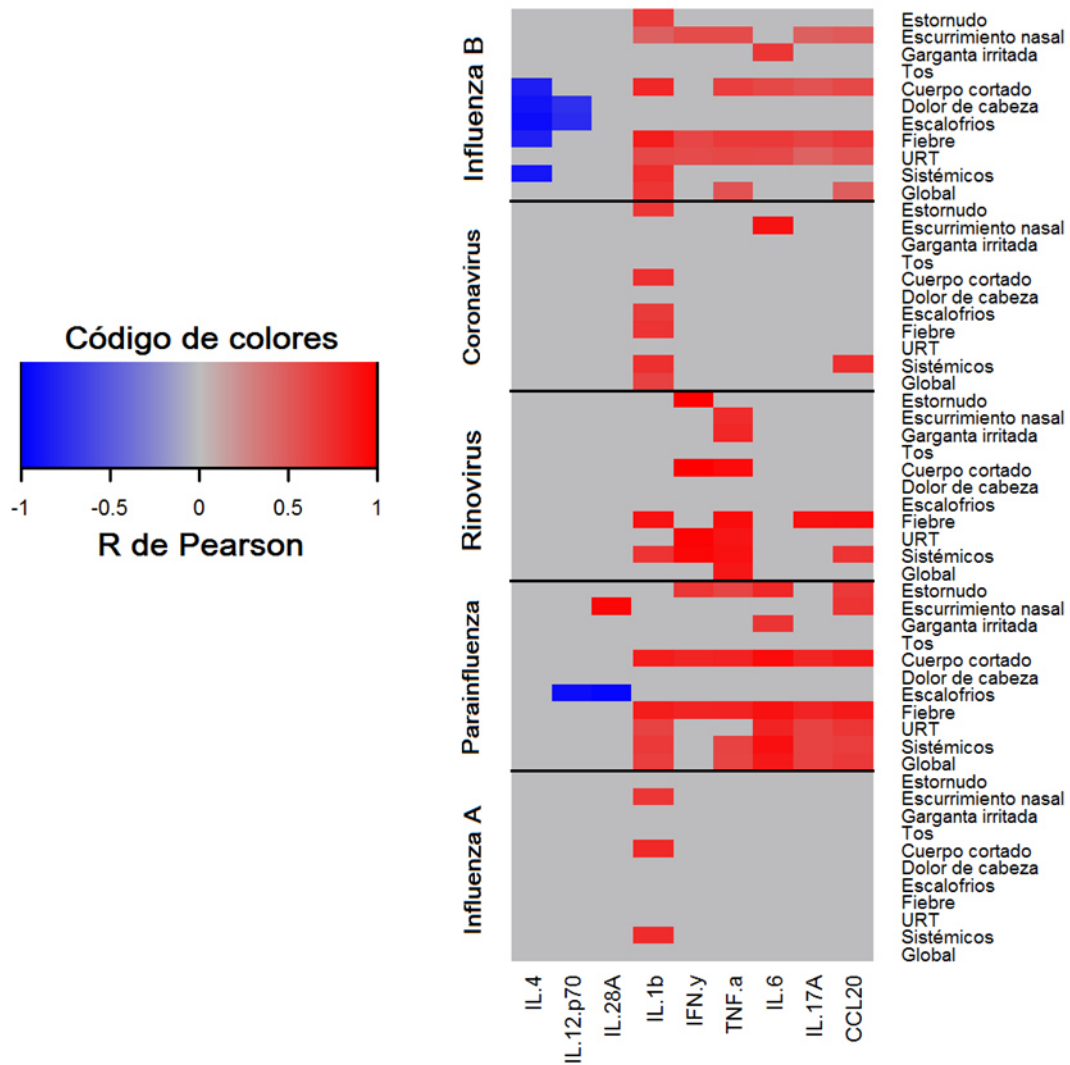
IL-10, una citocina anti-inflamatoria, correlacionó de forma positiva con la sintomatología, por lo que nos preguntamos las posibles razones de este fenómeno. Al verificar si existía asociación entre los niveles de IL-10 con otras citocinas en lavado nasal mediante pruebas de correlación de Pearson, se encontró que efectivamente los valores de esta citocina se asociaban de forma positiva con los niveles de IL-1  $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17A, CCL20 e IFN- $\gamma$  (Fig. 35).



**Fig. 35** Mapa de calor que muestra las correlaciones entre los mismos valores de citocinas analizadas en lavado nasal de pacientes adultos con infección respiratoria viral aguda.  $n = 44$ , se consideró significativo una  $P < 0.05$ , para las correlaciones no significativas se consideró una  $R = 0$ .

**Los patrones de correlación de citocinas con la sintomatología varían de acuerdo a la presencia de un agente viral en específico.**

Anteriormente las correlaciones mostradas entre los valores de citocinas con la sintomatología fueron tomando en cuenta todos los pacientes con infección viral, sin embargo, se realizó un análisis más detallado donde se separan los casos de acuerdo a la presencia de cierto agente viral y realizando los mismos ensayos de correlación de Pearson. Las correlaciones negativas de los valores de IL-4 en lavado nasal se mantienen con algunos síntomas en el caso de pacientes con virus de Influenza B a diferencia de los demás. Por otro lado, la IL-1  $\beta$  fue la citocina con mayor cantidad de correlaciones positivas con los síntomas independientemente del agente viral como previamente se había observado. En los pacientes con infección respiratoria que contaban con virus de Influenza B y/o Parainfluenza se encontró mayor cantidad de correlaciones seguido de aquellos infectados con Rinovirus, Coronavirus y en última instancia Influenza A; en el caso de Metaneumovirus no se consideró como significativa ninguna correlación debido a que todas presentaban una cantidad de casos menor a cinco, ver **Fig. 36**. En los casos de infección con Rinovirus, Parainfluenza e Influenza B las correlaciones entre los valores de citocinas pro-inflamatorias y la sintomatología se mantuvieron a diferencia de lo observado en Coronavirus e Influenza A donde fueron solo algunas.



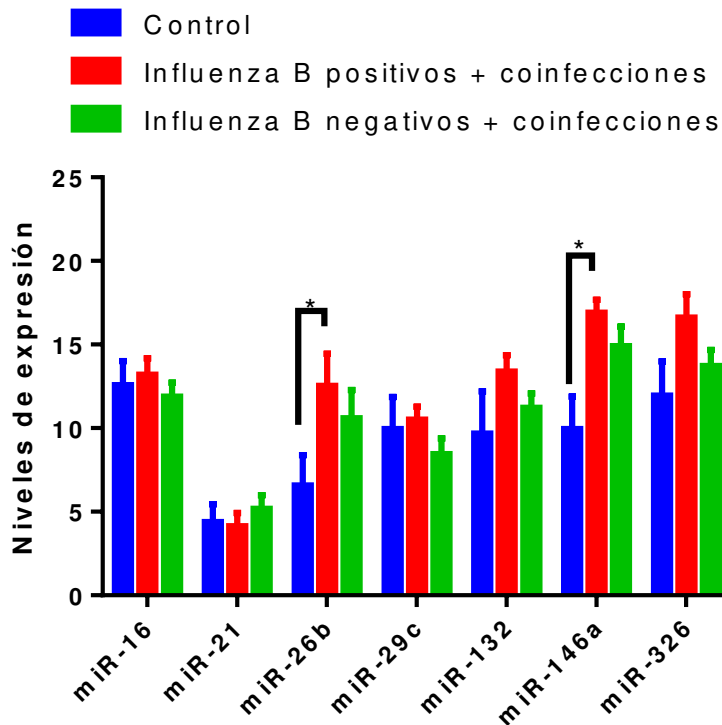
**Fig. 36** Mapa de calor que muestra las correlaciones entre los niveles de citocinas y las áreas bajo la curva de los síntomas evaluados en pacientes adultos con infección respiratoria viral aguda dependiendo la presencia de Influenza B, Coronavirus, Rinovirus, Parainfluenza e Influenza A con co-infecciones en todos los casos. n mínima en cada correlación = 5; se consideró significativo una  $P < 0.05$  por medio de la prueba de correlación de Pearson, en aquellas correlaciones no significativas se consideró una  $R=0$ .

## **7.5 PERFILES DE EXPRESIÓN DE MICROARNs EN LAVADO NASAL DE PACIENTES ADULTOS CON INFECCIÓN RESPIRATORIA VIRAL AGUDA.**

Los niveles de expresión de los microARNs (miR-9, 16, 21, 26b, 29c, 132, 146a y 326) se determinaron por medio de la técnica de RT-qPCR (Retrotranscripción - Reacción en cadena de la polimerasa en dos pasos) y el método de  $\Delta\text{Ct}$  y  $\Delta\Delta\text{Ct}$  utilizando como gen normalizador el ARN pequeño nucleolar U6. De los 82 pacientes con infección viral, en 56 y 22 de las muestras tomadas en el día uno y siete, respectivamente se logró determinar de forma confiable los niveles de expresión debido a que se eliminaron aquellas muestras donde el gen U6 amplificaba por arriba del Ct 35. En ninguna de las muestras se logró detectar el miR-9.

### **Perfil de expresión de microARNs en pacientes adultos infectados con virus de Influenza B**

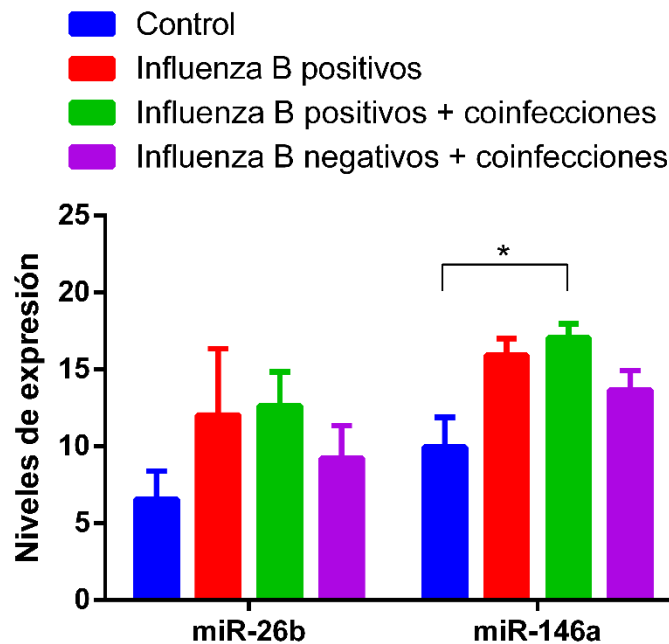
Los microARNs analizados en el día del reclutamiento eran diferentes entre los sujetos de estudio que fueron clasificados como: Influenza B positivos con co-infecciones (n = 21), Influenza B negativos con co-infecciones (n = 40) y controles sanos (n = 9). Los niveles de expresión de miR-26b y miR-146a fueron significativamente diferentes entre los grupos ( $P < 0.05$ ). Los niveles de expresión de miR-26b y miR-146a se encontraron elevados en pacientes Influenza B positivos con co-infecciones en comparación a los controles ( $P < 0.05$ ), ver **Fig 37**.



**Fig. 37** Niveles de expresión de microARNs en controles sanos (n = 9), pacientes adultos Influenza B positivos con co-infecciones (n = 21) e Influenza B negativos con co-infecciones (n = 40). Todos los datos están representados como media  $\pm$  error estándar de la media. Una (\*)  $P < 0.05$  fue tomada como significativa por medio de una prueba de ANOVA con análisis post-hoc de Tukey o Games-Howell.

Posteriormente se realizó un sub-análisis de los mismos datos por medio de un ANOVA para verificar si existían diferencias en los niveles de expresión de miR-26b y miR-146a entre los grupos siguientes: controles sanos (n = 9), Influenza B positivos (monoinfección) (n = 3), Influenza B positivos con co-infección (n = 18) y pacientes Influenza B negativos con co-infecciones (n = 40). No se encontró diferencias significativas entre los grupos de estudio y los controles ( $P > 0.05$ ). El

incremento en miR-146a observados en los pacientes Influenza B positivos con co-infecciones eran significativamente mayores en comparación con los controles sanos ( $P<0.05$ ), ver **Fig. 38**.

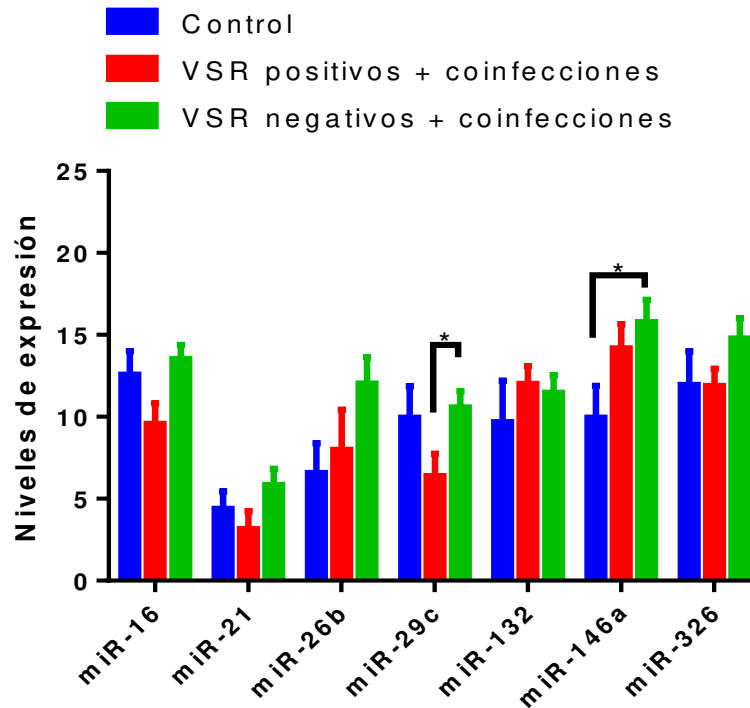


**Fig. 38** Niveles de expresión de miR-26b y miR-146a en controles sanos (n=9), pacientes Influenza B positivos (monoinfección) (n = 3), Influenza B positivos con co-infecciones (n = 18) y pacientes Influenza B negativos con co-infecciones (n = 40). Todos los datos están representados como media  $\pm$  error estándar de la media. Una (\*)  $P<0.05$  fue considerada como significativa por medio de la prueba de ANOVA con análisis post-hoc de Games-Howell.

## **Perfil de expresión de microARNs en pacientes adultos infectados con Virus Sincitial Respiratorio**

Los microARNs analizados en el día del reclutamiento eran diferentes entre los sujetos de estudio que fueron clasificados como: VSR positivos con co-infecciones (n = 21), VSR negativos con co-infecciones (n = 40) y controles sanos (n = 9). Los niveles de expresión de miR-29c y miR-146a fueron significativamente diferentes entre los grupos ( $P < 0.05$ ). Los niveles de expresión de miR-29c fueron significativamente mayores en el grupo de VSR negativos con co-infecciones en comparación con el de VSR positivos con co-infecciones ( $P < 0.05$ ). Los niveles de expresión de miR-146a en el grupo VSR negativos con co-infecciones fueron significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) en comparación con los controles sanos, ver **Fig 39**. Se realizó un sub-análisis de los datos por medio de una prueba de ANOVA ahora separando a los grupos en: controles sanos (n = 9), VSR positivos (monoinfección) (n = 8), VSR positivos con co-infección (n = 9) y VSR negativos con co-infección (n = 40). Sin embargo, no se observó ninguna diferencia significativa entre los grupos ( $P > 0.05$ ).



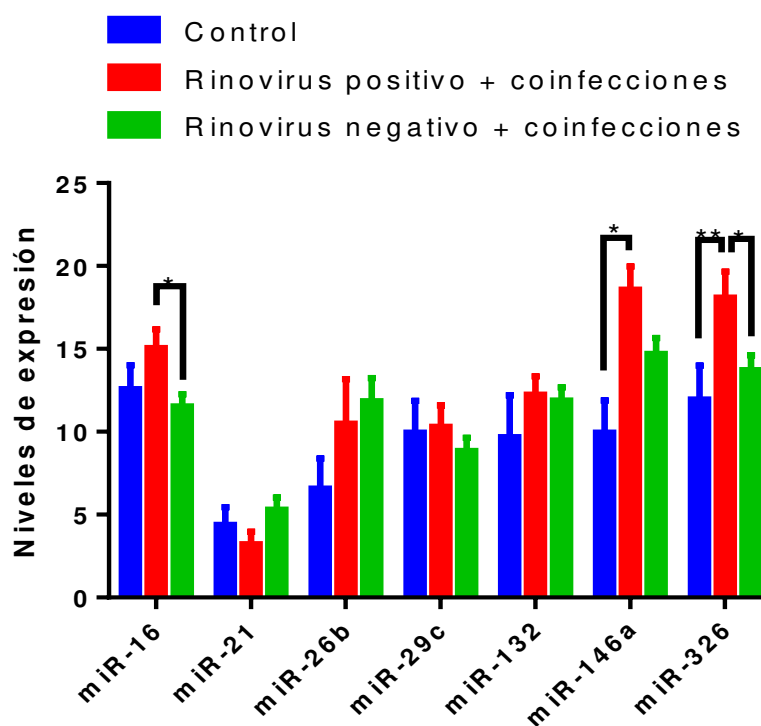


**Fig. 39** Niveles de expresión de microARNs en controles sanos (n = 9), pacientes VSR positivos con co-infecciones (n = 21) y VSR negativos con co-infecciones (n = 40). Todos los datos están representados como media  $\pm$  error estándar de la media. Una (\*)  $P < 0.05$  fue considerada como significativa por medio de la prueba de ANOVA con análisis post-hoc de Tukey.

### Perfil de expresión de microARNs en pacientes adultos infectados con Rinovirus

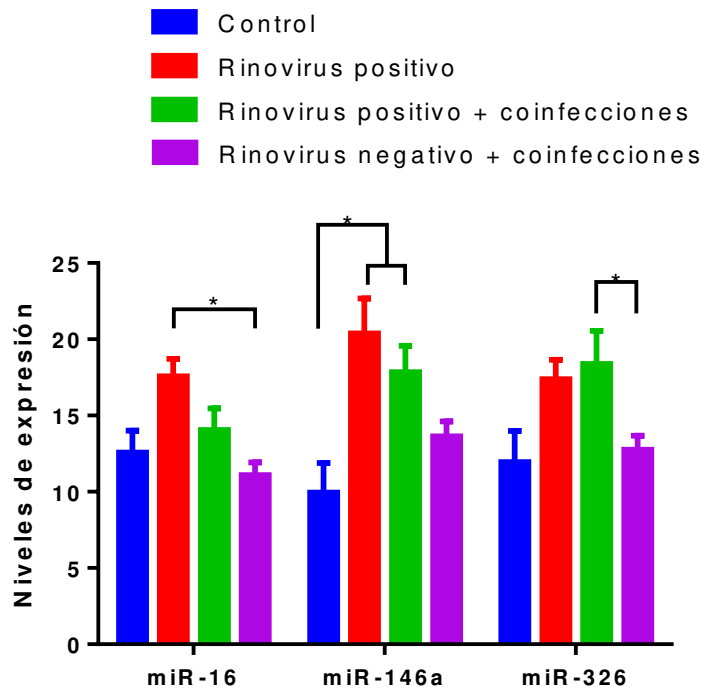
Para verificar si existía diferencia significativa entre los niveles de expresión de los distintos microARNs en los grupos de controles sanos (n = 9), Rinovirus positivo con co-infecciones (n = 14) y Rinovirus negativo con co-infecciones (n = 39) se realizó una prueba de ANOVA. Los niveles de miR-16, miR-146a y miR-326 mostraron diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0.05$ ). Los niveles de expresión de miR-16 en el grupo de Rinovirus positivo con co-infecciones fueron significativamente mayores en comparación con el de Rinovirus negativo con co-

infecciones ( $P < 0.05$ ). Los niveles de expresión de miR-146a en el grupo de Rinovirus positivo con co-infecciones fueron significativamente mayores en comparación con el de controles sanos ( $P < 0.05$ ). Los niveles de expresión de miR-326 en el grupo Rinovirus positivo con co-infecciones fueron significativamente mayores en comparación con el de Rinovirus negativo con co-infecciones y controles sanos ( $P < 0.05$  y  $P < 0.01$ , respectivamente), ver **Fig. 40**.



**Fig. 40** Niveles de expresión de microARNs en controles sanos ( $n = 9$ ), pacientes Rinovirus positivo con co-infecciones ( $n = 14$ ) y Rinovirus negativo con co-infecciones ( $n = 39$ ). Todos los datos están representados por la media  $\pm$  error estándar de la media. Una (\*)  $P < 0.05$  o (\*\*)  $P < 0.01$  se consideraron significativas por medio de la prueba de ANOVA con análisis post-hoc de Tukey.

Un sub-análisis de estos microARNs para ver si existían diferencias entre los grupos: controles sanos (n = 9), pacientes Rinovirus positivo (monoinfección) (n = 4), Rinovirus positivo con co-infecciones (n = 10) y Rinovirus negativo con co-infecciones (n = 39) por medio de una prueba ANOVA con análisis post-hoc de Tukey mostró diferencias significativas en los tres microARNs ( $P < 0.05$ ). Los niveles de expresión de miR-16 en el grupo de pacientes Rinovirus positivo (monoinfección) fueron significativamente mayores en comparación con los de Rinovirus negativo con co-infecciones ( $P < 0.05$ ). miR-146a en el grupo de controles sanos fueron significativamente menores en comparación con los encontrados en pacientes Rinovirus positivo (monoinfección) y con co-infección ( $P < 0.05$ ). Los niveles de expresión de miR-326 en el grupo de pacientes Rinovirus positivos con co-infecciones fueron significativamente mayores en comparación con el de pacientes Rinovirus negativo con co-infecciones ( $P < 0.05$ ), ver **Fig. 41**.

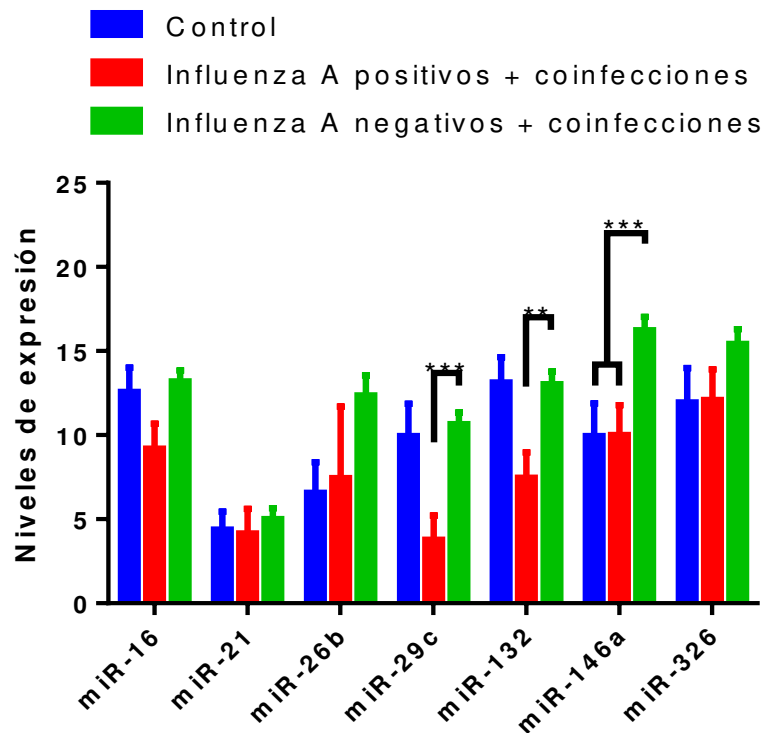


**Fig. 41** Niveles de expresión de miR-16, miR-146a y miR-326 en controles sanos (n = 9), pacientes Rinovirus positivo (monoinfección) (n = 4), Rinovirus positivo con co-infección (n = 10) y Rinovirus negativo con co-infecciones (n = 39). Todos los datos están representados como media  $\pm$  error estándar de la media. Un valor de (\*)  $P < 0.05$  fue considerado significativo por medio de la prueba de ANOVA con análisis post-hoc de Tukey.

### Perfil de expresión de microARNs en pacientes adultos infectados con virus de Influenza A

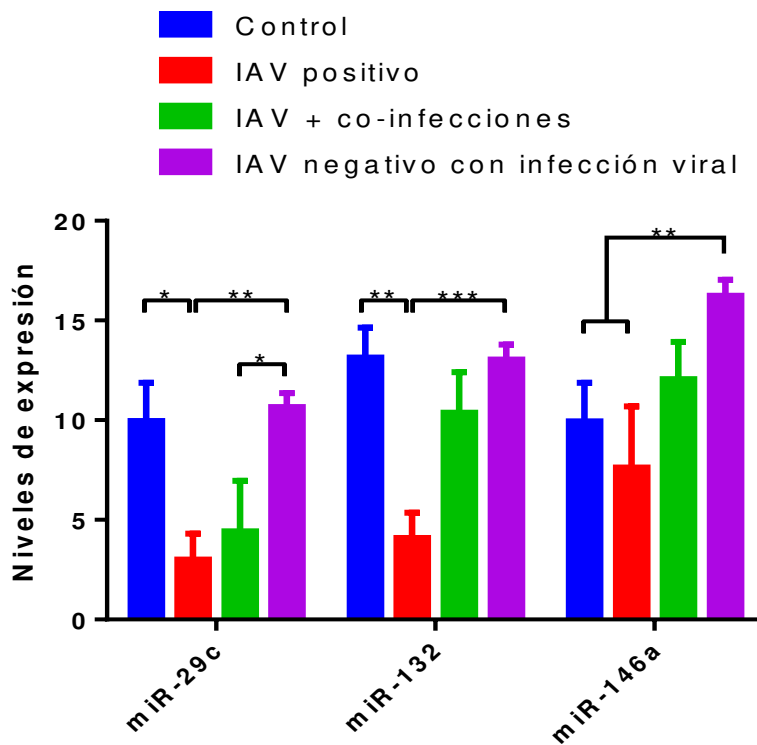
Para verificar si existía diferencia significativa entre los niveles de expresión de los distintos microARNs en los grupos de controles sanos (n = 9), Influenza A positivo con co-infecciones (n = 13) e Influenza A negativo con co-infecciones (n = 48) se realizó una prueba de ANOVA. Los niveles de miR-29c, miR-132 y miR-146a mostraron diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0.05$ ). Los niveles de expresión de miR-29c en el grupo de pacientes Influenza A negativos con co-

infecciones fueron significativamente mayores en comparación con los de Influenza A positivos con co-infecciones ( $P < 0.001$ ). Los niveles de expresión miR-132 en el grupo de pacientes Influenza A negativos con co-infecciones fueron significativamente mayores en comparación con los de pacientes Influenza A positivos con co-infecciones ( $P < 0.01$ ). Los niveles de expresión miR-146a en el grupo de pacientes Influenza A negativos con co-infecciones fueron significativamente mayores en comparación con los de controles sanos e Influenza A positivos con co-infecciones ( $P < 0.001$ ), ver **Fig. 42**.



**Fig. 42** Niveles de expresión de microARNs en controles sanos ( $n = 9$ ), pacientes Influenza A positivos con co-infecciones ( $n = 13$ ) e Influenza A negativos con co-infecciones ( $n = 48$ ). Todos los datos están representados como media  $\pm$  error estándar de la media. Un valor de (\*\*)  $P < 0.01$  o (\*\*\*)  $P < 0.001$  fue considerado como significativo por medio de la prueba de ANOVA con análisis post-hoc de Tukey.

Un sub-análisis de estos microARNs para ver si existían diferencias entre los grupos de controles sanos ( $n = 9$ ), pacientes Influenza A positivo (monoinfección) ( $n = 6$ ), Influenza A con co-infecciones ( $n = 7$ ) e Influenza A negativos con co-infecciones ( $n = 48$ ) por medio de una prueba ANOVA con análisis post-hoc de Tukey mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en los tres microARNs. Los niveles de expresión de miR-29c en el grupo de pacientes Influenza A positivos (monoinfección) fueron significativamente menores en comparación con los de controles sanos ( $P < 0.05$ ) y pacientes Influenza A negativos con co-infecciones ( $P < 0.01$ ). Además, este último grupo presentó niveles significativamente elevados ( $P < 0.05$ ) en comparación con el de pacientes Influenza A positivos con co-infecciones. Los niveles de expresión de miR-132 en el grupo de pacientes infectados solo con influenza A fueron significativamente menores en comparación con el de controles sanos ( $P < 0.01$ ) y el de pacientes Influenza A negativos con co-infecciones ( $P < 0.001$ ). Los niveles de expresión de miR-146a en el grupo de pacientes Influenza A negativos con co-infección fueron significativamente mayores en comparación con el de controles sanos e Influenza A positivos (monoinfección) ( $P < 0.01$ ), ver **Fig. 43**.



**Fig. 43** Niveles de expresión de miR-29c, miR-132 y miR-146a en controles sanos (n = 9), pacientes Influenza A positivos (monoinfección) (n = 6), Influenza A positivos con co-infecciones (n = 7) e Influenza A negativos con co-infecciones (n = 48). Todos los datos están representados por la media  $\pm$  error estándar de la media. Un valor de (\*)  $P < 0.05$ , (\*\*)  $P < 0.01$  o (\*\*\*)  $P < 0.001$  se consideró como significativo por medio de una prueba ANOVA con análisis post-hoc de Tukey.

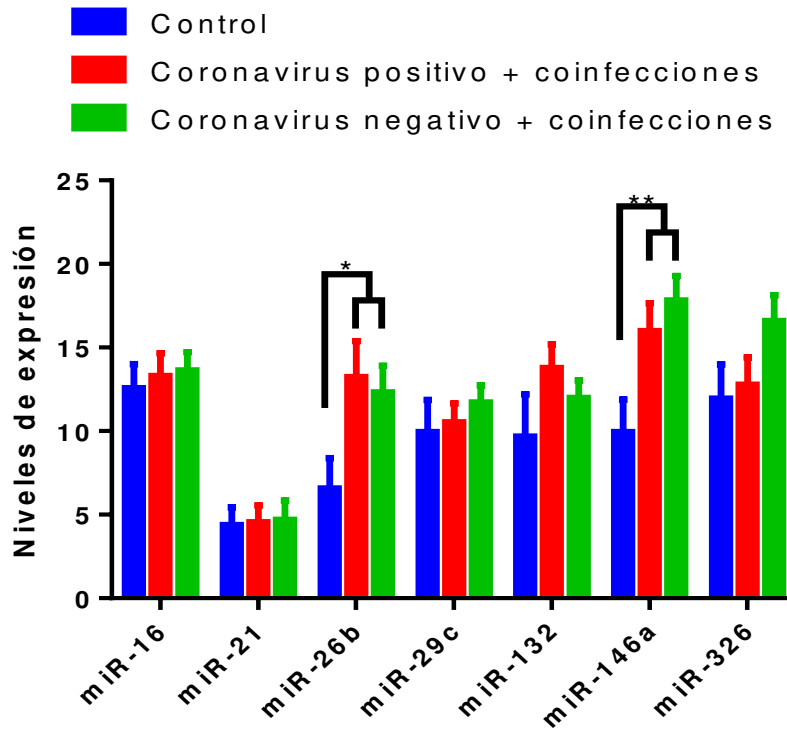
### Perfil de expresión de microARNs en pacientes adultos infectados con Coronavirus y Parainfluenza

Estos dos virus fueron agrupados en una sola sección debido a que el perfil de expresión fue muy similar. Los grupos en Coronavirus fueron: control sano (n = 9), pacientes Coronavirus positivo con co-infecciones (n = 13) y Coronavirus negativo con co-infecciones (n = 21). En el caso de Parainfluenza: control sano (n = 9), pacientes Parainfluenza positivo con co-infecciones (n = 11) y Parainfluenza

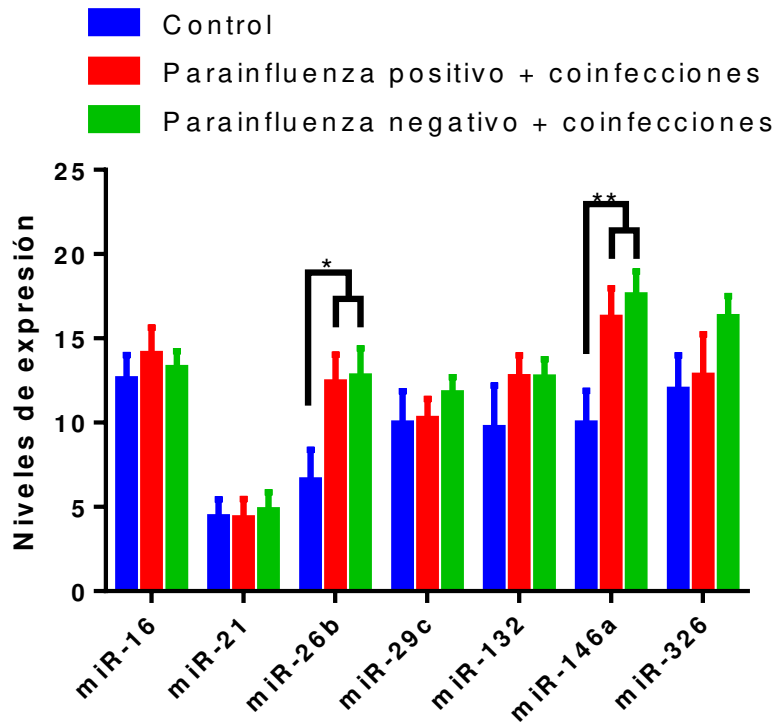
negativo con co-infecciones ( $n = 23$ ). En ambos casos, se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de miR-26b ( $P < 0.05$ ) y miR-146a ( $P < 0.01$ ). Los niveles de miR-26b y miR-146a fueron mayores en pacientes Coronavirus positivo o negativo con co-infecciones comparados con el grupo control ( $P < 0.05$ ), ver **Fig. 44**. Por otro lado, los niveles de expresión tanto de miR-26b como miR-146a en pacientes Parainfluenza positivos o negativos con co-infecciones fueron mayores comparado a los controles sanos ( $P < 0.05$ ), ver **Fig. 45**.

Se realizó un sub-análisis de los datos ahora evaluando los siguientes grupos: controles sanos ( $n = 9$ ), Coronavirus positivo (monoinfección) ( $n = 3$ ), Coronavirus positivo con co-infecciones ( $n = 13$ ) y Coronavirus negativo con co-infecciones ( $n = 21$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los dos microARNs. En el caso de Parainfluenza no se realizó el sub-análisis debido a que ningún paciente presentó monoinfecciones por este virus.





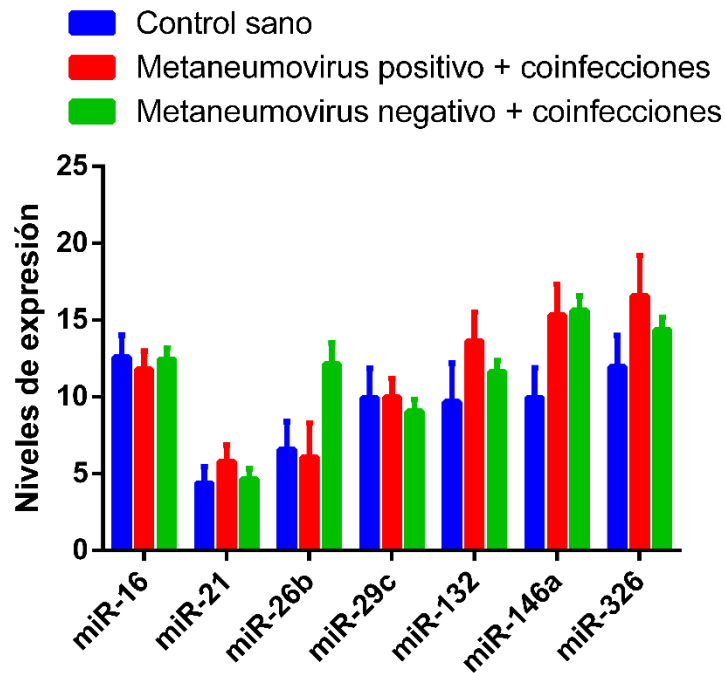
**Fig. 44** Niveles de expresión de microARNs en controles sanos (n = 9), pacientes Coronavirus positivo con co-infecciones (n = 13) y Coronavirus negativo con co-infecciones (n = 21). Todos los datos están representados por la media  $\pm$  error estándar de la media. Un valor de (\*)  $P < 0.05$  o (\*\*)  $P < 0.01$  se consideró como significativo por medio de una prueba ANOVA con análisis post-hoc de Tukey.



**Fig. 45** Niveles de expresión de microARNs en controles sanos (n = 9), pacientes Parainfluenza positivo con co-infecciones (n = 11) y Parainfluenza negativo con co-infecciones (n = 23). Todos los datos están representados por la media  $\pm$  error estándar de la media. Un valor de (\*)  $P < 0.05$  o (\*\*)  $P < 0.01$  se consideró como significativo por medio de una prueba ANOVA con análisis post-hoc de Tukey.

### Perfil de expresión de microARNs en pacientes adultos infectados con Metaneumovirus

Para verificar si existía diferencia significativa entre los niveles de expresión de los distintos microARNs en los grupos de control sano (n = 9), Metaneumovirus positivo con co-infecciones (n = 10) y Metaneumovirus negativo con co-infecciones (n = 48) se realizó una prueba de ANOVA. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) (**Fig 46**)

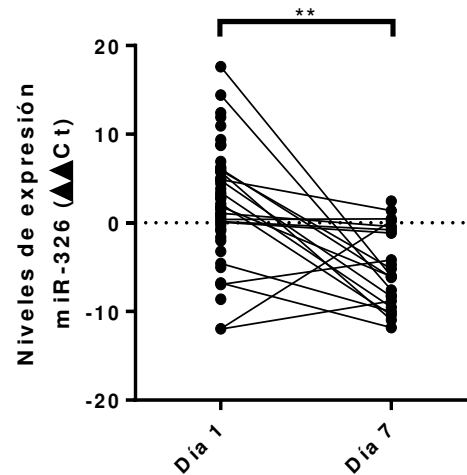
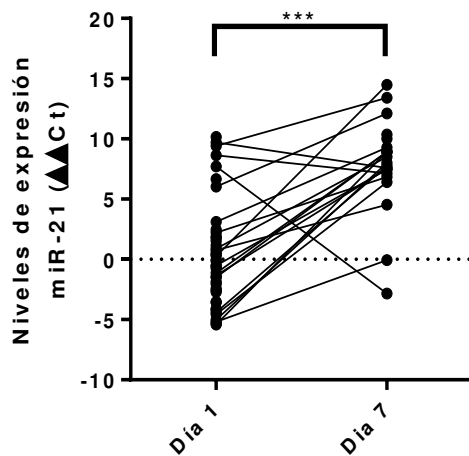


**Fig. 46** Niveles de expresión de microARNs en controles sanos (n = 9), pacientes Metaneumovirus positivo con co-infecciones (n = 11) y Metaneumovirus negativo con co-infecciones (n = 51). Todos los datos están representados por la media  $\pm$  error estándar de la media. Se realizó una prueba ANOVA con análisis post-hoc de Tukey.

**Los niveles de expresión de miR-21 y miR-326 aumentan o disminuyen al día siete, respectivamente en comparación con el día del reclutamiento en pacientes con infección viral**

Comparando los niveles de expresión de los microARNs encontrados en el día del reclutamiento con los del día siete, únicamente se encontraron diferencias en los niveles de miR-21 y miR-326.

En el caso de miR-21 se encontraron niveles de expresión significativamente aumentados ( $P < 0.001$ ) en el día siete (mediana: 8.02) comparados con los observados en el día del reclutamiento (mediana: -0.51) (**Fig. 47**). Mientras que, los niveles de miR-326 se encontraron aumentados ( $P < 0.01$ ) en el día del reclutamiento (media  $\pm$  error estándar de la media:  $2.22 \pm 0.85$ ) comparados con los observados en el día siete ( $-5.26 \pm 0.93$ ) (**Fig. 48**).



**Fig. 47** Niveles de expresión de miR-21 en pacientes adultos con infección respiratoria viral aguda evaluados en el día del reclutamiento (Día 1) y seis días después (Día 7). Las líneas indican las observaciones pareadas ( $n = 19$ ). Un valor de  $P < 0.001$  se consideró significativo por medio de una prueba T de Student de una prueba de W pareada.

## **Correlaciones de miARNs con la gravedad de la sintomatología de la infección dependiendo la presencia del agente viral**

Se realizaron pruebas de correlación de Pearson para verificar si existía asociación entre los niveles de expresión de los distintos miARNs analizados con la gravedad de la sintomatología (AUC) dependiendo si los pacientes estaban infectados con al menos un virus (Infección viral), Influenza B, Coronavirus, Rinovirus, Parainfluenza, Influenza A o Metaneumovirus, en todos los casos con coinfecciones.

Debido a que no todos los pacientes contaban con el seguimiento de la sintomatología y que además se eliminaron algunos niveles de expresión de miARNs como previamente se mencionó, el número de pacientes en cada una de las correlaciones varía, sin embargo, la cantidad mínima de datos pareados por análisis fue de once. En todos los casos, las correlaciones fueron positivas.

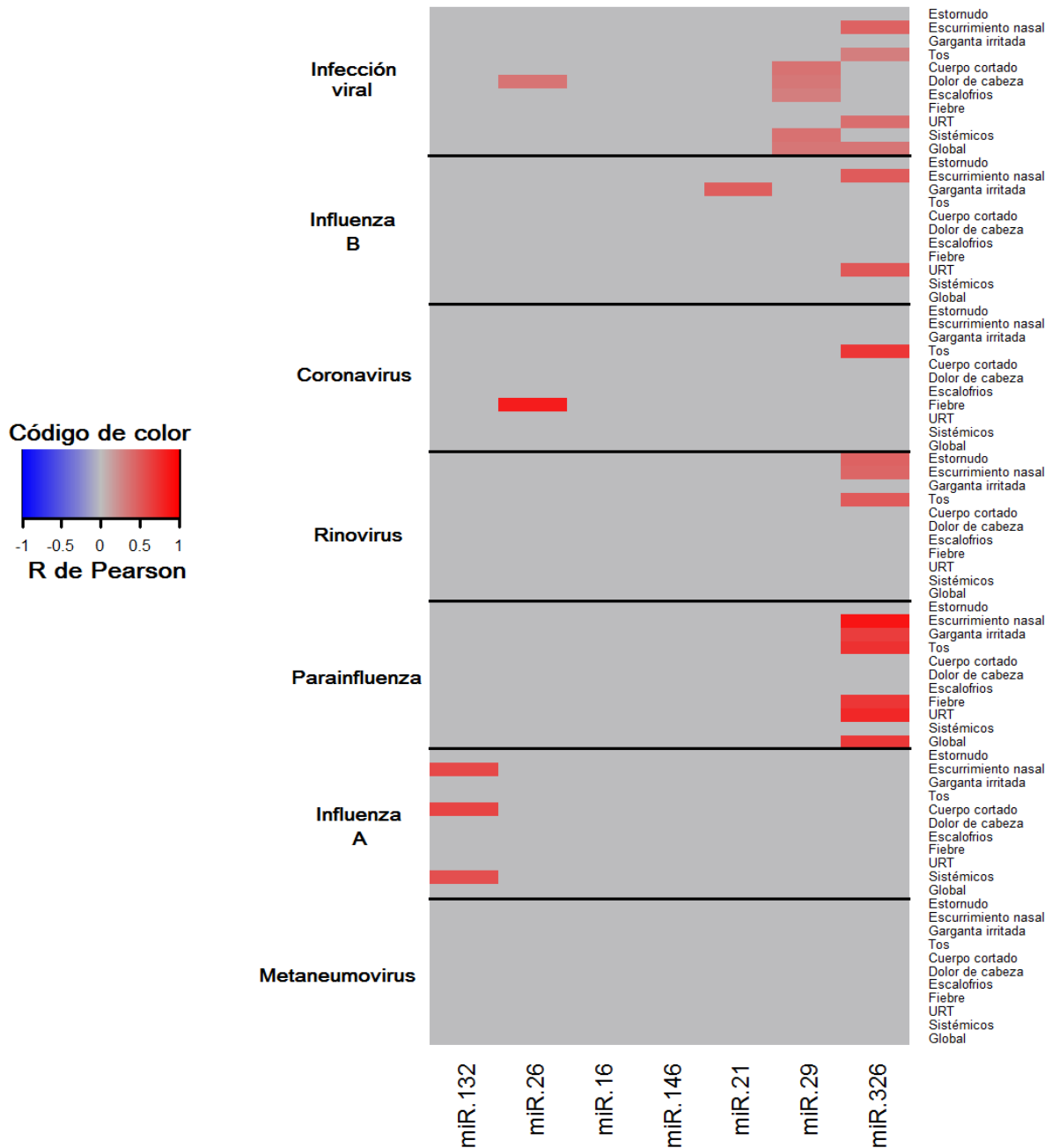
La categoría con mayor cantidad de correlaciones fue el grupo de pacientes con al menos una infección viral independientemente el tipo de virus (diez correlaciones), seguido de aquellos infectados con Parainfluenza (seis), luego Influenza B, Rinovirus e Influenza A (tres en cada grupo), después Coronavirus (dos) y al final Metaneumovirus donde no se encontró ninguna correlación significativa entre los niveles de expresión de microARNs y la gravedad de la sintomatología, esto probablemente debido a la baja cantidad de pacientes en este grupo.

El miR-326 fue el que mayor número de correlaciones tuvo con la sintomatología (16 correlaciones), seguido de miR-29c (cinco), luego miR-132 (tres), miR-26b (dos), miR-21 (una) y en el caso de miR-16 o miR-146 no se observó ninguna correlación significativa.

El rango de los coeficientes de correlación de Pearson fue de 0.308 a 0.882. La más baja se dio en el grupo de pacientes con al menos una infección viral entre miR-29c y escalofríos mientras que la más alta se observó dentro del grupo de Parainfluenza entre miR-326 y escurrimiento nasal.

En el caso de miR-326, el rango de correlaciones entre los niveles de expresión con la sintomatología fue prácticamente idéntico al rango anterior (0.309 – 0.882). La más baja se encontró con el síntoma de tos dentro del grupo de pacientes con al menos una infección viral, por otro lado, la más alta fue con escurrimiento nasal en los pacientes con Parainfluenza. Además, las correlaciones de este microARN se observaron principalmente con sintomatología del tracto respiratorio superior.

Las únicas correlaciones que se observaron dentro del grupo de pacientes con Influenza A entre la gravedad de la sintomatología con los niveles de expresión de microARNs fueron entre cuerpo cortado ( $R = 0.623$ ), escurrimiento nasal ( $R = 0.596$ ) y síntomas sistémicos ( $R = 0.561$ ) con miR-132 en los tres casos. Por otro lado, las únicas correlaciones de miR-29 fueron con escalofríos ( $R = 0.308$ ), dolor de cabeza ( $R = 0.340$ ), puntaje global de la sintomatología ( $R = 0.347$ ), cuerpo cortado ( $R = 0.367$ ) y puntaje de síntomas sistémicos ( $R = 0.374$ ), todas observadas dentro del grupo de pacientes con infección viral (**Fig. 49**).



**Fig. 49** Mapa de calor que muestra las correlaciones entre los niveles de expresión de microARNs y gravedad de la sintomatología (AUC) en pacientes adultos infectados con al menos un agente viral (infección viral), Influenza B, Coronavirus, Rinovirus, Parainfluenza, Influenza A o Metaneumovirus. n mínima en cada correlación = 11; se consideró significativo una  $P < 0.05$  por medio de la prueba de correlación de Pearson, para aquellas correlaciones no significativas se consideró una  $R = 0$

## **Correlaciones de miARNs con citocinas de lavado nasal dependiendo la presencia del agente viral**

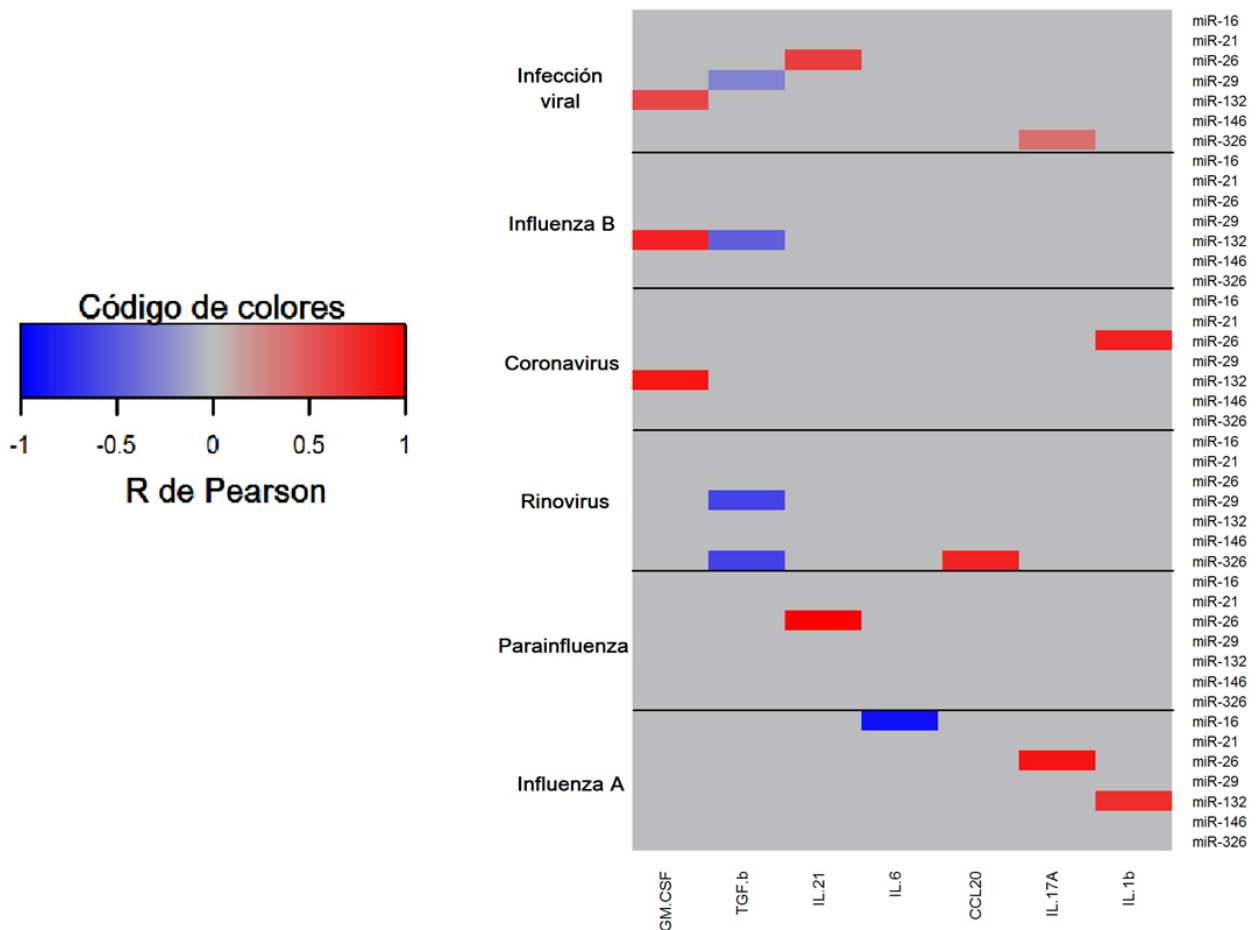
Se realizaron pruebas de correlación de Pearson para verificar si existía asociación entre los niveles de expresión de los distintos miARNs analizados con los de citocinas de lavado nasal dependiendo si los pacientes estaban infectados con al menos un virus (Infección viral), Influenza B, Coronavirus, Rinovirus, Parainfluenza, Influenza A o Metaneumovirus, en todos los casos con coinfecciones (**Fig. 50**).

El caso con mayor número de correlaciones significativas ( $P < 0.05$ ) fue el grupo de pacientes con al menos una infección viral, seguido del grupo con Rinovirus e Influenza A, Influenza B y Coronavirus y en último el de Parainfluenza.

Las citocinas GM-CSF, IL-21, CCL20, IL-17A e IL-1 $\beta$  correlacionaron de forma únicamente positiva con algunos microARNs, mientras que TGF- $\beta$  e IL-6 lo hicieron de forma negativa. GM-CSF en los tres casos donde correlacionó lo hizo únicamente con miR-132 en el grupo de pacientes con Coronavirus ( $R = 0.881$ ), Influenza B ( $R = 0.813$ ) y los que cuentan con al menos una infección viral ( $R = 0.612$ ). TGF- $\beta$  correlacionó de forma negativa con miR-29c tanto en pacientes con Rinovirus ( $R = -0.622$ ) como en aquellos con al menos una infección viral ( $R = -0.27$ ).



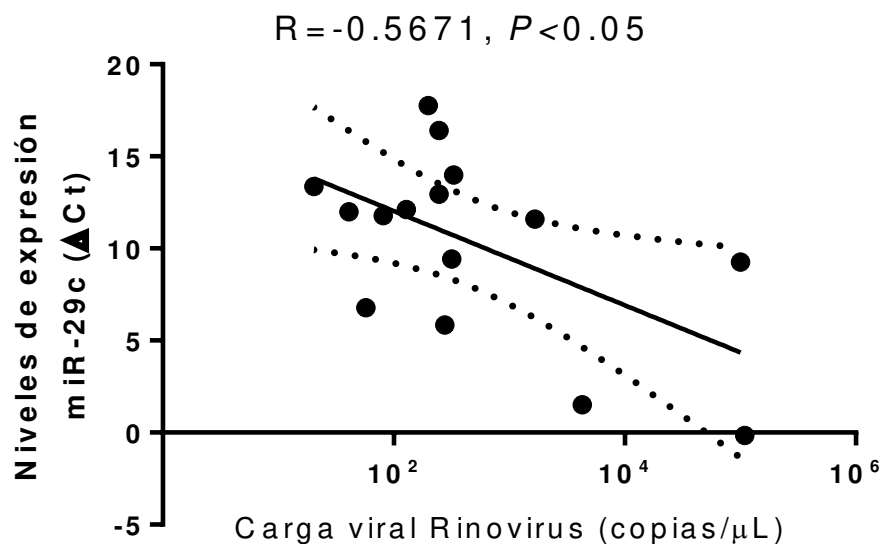
IL-17A correlaciona de forma positiva con miR-326 en aquellos pacientes con al menos una infección respiratoria ( $R = 0.391$ ), sin embargo, esta correlación no se observa en ningún otro grupo. Otro hallazgo similar es IL-6 el cual correlacionó de forma negativa únicamente con miR-16 en el grupo de pacientes con Influenza A ( $R = -0.914$ ).



**Fig. 50** Mapa de calor que indica las correlaciones entre los niveles de expresión de microARNs con los de citocinas en lavado nasal dependiendo la presencia del agente viral.  $n$  en cada correlación  $\geq 5$ . Un valor de  $P < 0.05$  se consideró significativo por medio de una prueba de correlación de Pearson. En aquellas correlaciones no significativas se consideró una  $R = 0$ .

## Niveles de expresión de miR-29c correlacionan de forma negativa con los niveles de cargas virales de Rinovirus

Para verificar si existían asociaciones entre los niveles de expresión de microARNs con las cargas virales de los agentes patógenos analizados en pacientes adultos con infección respiratoria aguda, se realizaron pruebas de correlación de Pearson. Únicamente se encontró una asociación fuerte y negativa ( $R = -0.5671$ ,  $P < 0.05$ ) entre miR-29c y los valores de cargas virales de Rinovirus (Fig. 51)



**Fig. 51** Correlación entre los niveles de cargas virales de Rinovirus y de expresión de miR-29c en pacientes adultos con infección respiratoria.  $n = 15$ . Un valor de  $P < 0.05$  se consideró significativo mediante la prueba de correlación de Pearson.

## **DISCUSIÓN**

## 8. DISCUSIÓN

Los casos incluidos en el presente estudio fueron determinados por conveniencia, sin embargo, comparado con otros reportes similares donde se evalúan infecciones respiratorias, manejan una cantidad similar [230] o incluso menor [226, 234]. También es importante mencionar que estudios similares se enfocan a la detección de un solo virus y no determinan la presencia de coinfecciones por otros en el tracto respiratorio [235-237].

En cuanto a las enfermedades respiratorias, se ha reportado una etiología viral entre 40.7% - 65.6% [238-240] contrastando con el 82% encontrado en nuestra cohorte. Lo anterior puede ser explicado a que el estudio estaba previamente dirigido a encontrar virus respiratorios o por la tecnología empleada para la detección de los mismos.

Entre distintas regiones se reportan varias frecuencias de detección del tipo de virus, por ejemplo, un estudio realizado en China reportó una mayor cantidad de casos de Influenza A, seguido de Influenza B, Parainfluenza, Adenovirus, Rinovirus y Coronavirus en adultos [236], sin embargo, esto fue en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad a diferencia de nuestra cohorte de estudio donde ninguno desarrolló neumonía. En otro estudio llevado a cabo en pacientes pediátricos y adultos ambulatorios, muestra frecuencias de detección similares donde el virus con mayor número de casos fue Influenza A seguido de Rinovirus, Influenza B y VSR [241], a diferencia de nuestros hallazgos donde el virus de Influenza B fue el de mayor frecuencia de detección seguido de Coronavirus y los menos frecuentes fueron Influenza A y Metaneumovirus.

Múltiples estudios [230, 236, 237, 242, 243] indican que el virus de Influenza A es más común en comparación con Influenza B difiriendo con nuestros resultados, esto puede explicarse a una epidemiología distinta en México en lo que va del 2016 por la Dirección General de Epidemiología los casos más reportados son de Influenza B [244]. Por otro lado, la epidemiología parece ser diferente en pacientes pediátricos ya que se ha observado que el Metaneumovirus es el más frecuente [245], teniendo esto en cuenta y la falta de estudios donde únicamente recluten pacientes adultos, limita la comparación entre cohortes de estudio.

El análisis de co-infecciones virales es de gran importancia debido a que la presencia de más virus respiratorios induce una respuesta inmunológica distinta en los pacientes en comparación cuando se encuentra uno solo (esto se discute más adelante), además se ha descrito en un estudio *in vitro* como el virus de Parainfluenza tipo 2 favorece la replicación del virus de Influenza A [246].

Se han reportado distintos porcentajes desde 3% hasta 15% de detección de co-infecciones virales [236-239, 241, 247], sin embargo en nuestra cohorte se encontró más de la mitad con múltiples infecciones. Esto podría ser explicado debido a que se ha descrito una tendencia a encontrar mayor número de co-infecciones cuando la muestra es tomada en los primeros días de la enfermedad [238] como se hizo en la mayoría de los casos en este estudio, a pesar de esto, la mayoría de los reportes citados no expresan los días de evolución en el paciente al momento del reclutamiento por lo que impide comparar resultados.

El número de virus respiratorios causando dobles, triples y cuádruples infecciones ocurren con frecuencias de 91%, 8% y 0.2%, respectivamente en un

estudio donde se reclutaron pacientes adultos y pediátricos [247], también se han descrito dos casos donde se detectaron cinco virus causando infección, sin embargo, estos se encontraban en un estado de inmunosupresión [235]. Comparando con nuestros resultados las frecuencias difieren, pero la tendencia de disminuir conforme a mayor cantidad de virus co-infectando se observa, otra diferencia es el hallazgo de un paciente con hasta cinco virus respiratorios en nuestra cohorte el cual no reportó alguna enfermedad crónica o tratamiento inmunosupresor.

La asociación entre infecciones virales parece variar en la literatura, se ha reportado una asociación negativa entre el virus de Influenza A con Metapneumovirus y Rinovirus, mientras que VSR y Adenovirus se asocian de forma positiva con Rinovirus [240]. También se ha descrito una asociación entre Influenza A con VSR y Rinovirus [238]. Estos dos estudios difieren con nuestros hallazgos, esto es porque, probablemente las asociaciones entre virus dependan de la epidemiología de la región y esta es diferente en nuestra cohorte, como ya se discutió anteriormente.

A pesar de encontrar una correlación positiva entre los valores de carga viral de Influenza B con la edad, toma en cuenta los pacientes de todas las edades. Los pacientes adultos mayores de aproximadamente 45 años muestran tanto cargas virales altas como bajas en comparación con los pacientes menores de este punto de corte, por lo que una mejor interpretación de los datos de correlación es que los pacientes jóvenes muestran menores cargas virales del virus de Influenza B. No se encontró un reporte igual a nuestro hallazgo, sin embargo, se ha reportado una

tendencia en presentar menores o mayores cargas virales de Influenza A por parte de pacientes menores o mayores de 65 años, respectivamente [248]. Por otro lado, se ha descrito que en el día de reclutamiento se encontraron menores cargas de virus de Influenza en pacientes mayores de siete años en comparación con aquellos menores de esta edad, sin embargo, esta diferencia desaparece al día 3 [230]. Existe un reporte describió como los pacientes jóvenes de 15-29 años disminuyen más rápido la carga viral de Influenza A(H1N1)pdm09 en comparación con aquellos mayores de 30 años [249], concordando con nuestros resultados.

No se encontró un estudio que reportara la diferencia en las cargas virales de Metaneumovirus de acuerdo al género. Se ha descrito una mayor frecuencia de detección de este virus en pacientes masculinos, pero no exploraron los valores de carga viral [247]. Por otro lado, las hormonas sexuales han sido asociadas con la modulación de la respuesta inmune [250], se ha descrito que el género femenino despliega, preferencialmente, una respuesta Th2 [251], además la función de células NK se encuentra disminuida en comparación con masculinos lo que podría explicar nuestro hallazgo [252]. Un escenario contrario ha sido reportado en pediátricos, ya que pacientes masculinos presentan mayores cargas virales de VSR en comparación con femeninos [253], poniendo nuevamente en evidencia la diferencia entre las respuestas inmunes de masculinos y femeninos.

En pacientes pediátricos se han descrito co-infecciones, niveles disminuidos en las cargas virales de Adenovirus y Parainfluenza en comparación con mono infectados, mientras que los niveles de VSR, Influenza A y Metaneumovirus no mostraron diferencias entre estos grupos [254]. En nuestros hallazgos no se

encontró ninguna diferencia en las cargas virales entre los grupos de co-infectados y mono-infectados concordando parcialmente con el estudio anterior. No se encontró ninguna descripción en pacientes adultos.

La tendencia de recuperación de los pacientes a lo largo de los siete días ya se ha reportado en un estudio donde incluso reclutaron pacientes pediátricos y adultos tanto hospitalizados como ambulatorios [230]. Otro estudio realizado durante 2006-2010 en distintos países de América Latina donde evaluaron infecciones respiratorias en pacientes pediátricos y adultos reportaron a la tos y rinorrea como los principales síntomas con los que acudían en el día del reclutamiento [87], concordando con nuestros hallazgos. Algunos reportes describen a los síntomas sistémicos como los de mayor gravedad [230], sin embargo, esto probablemente se debe a que incluyen pacientes hospitalizados a diferencia de nuestra cohorte donde únicamente se reclutaron ambulatorios.

Al separar a los pacientes en grupos de síntomas leves, moderados y graves no se encontraron diferencias en las cargas virales de los agentes analizados. Concordando con nuestro hallazgo, algunos estudios describen que este parámetro no correlaciona con la gravedad en pacientes infectados con virus de Influenza [230, 255]. Por otro lado, al correlacionar las áreas bajo la curva se encontró que el síntoma de la tos correlacionó de forma positiva con la carga viral de Influenza B. Se ha descrito como la carga viral de Influenza A disminuye conforme se resuelve el dolor de cabeza y la tos en los pacientes [249] de forma similar a nuestros resultados. En pacientes pediátricos existen reportes que describen asociaciones de la carga viral con varios indicadores de gravedad, por ejemplo, se ha reportado



que pacientes con cargas virales elevadas de Bocavirus presentan mayor duración de sibilancia y estancia hospitalaria en comparación con los de cargas virales disminuidas [256]. Por otro lado, cargas mayores de VSR se asoció con falla respiratoria y requerimiento de cuidado intensivo [253]. Teniendo en cuenta lo anterior, existe controversia entre la asociación de cargas virales con la gravedad, aparentemente en pediátricos si existen tendencias, sin embargo, hacen falta estudios donde se recluten exclusivamente adultos para tener un panorama más amplio al respecto.

Existe un gran debate en determinar si las co-infecciones virales se asocian con mayor gravedad de la enfermedad, por un lado, reportes indican tal existencia, por ejemplo, los pacientes con co-infecciones por Bocavirus-Influenza A tienen 2.5 veces más probabilidad de ingresar a unidad de cuidados intensivos en comparación con aquellos pacientes infectados únicamente con Influenza A [237]. En contraste, un reporte indica que el tiempo de estadía y mortalidad son iguales en co-infectados en comparación con mono infectados, pero que la presencia de múltiples virus predispone a los pacientes a padecer neumonía por infección secundaria de origen bacteriano [257], sin embargo otros reportan que tal asociación no existe [258]. En contraste, nuestros resultados no muestran una asociación de la gravedad con las co-infecciones virales, pero la evaluación de las de origen bacteriano es necesaria debido a su asociación con la gravedad de la enfermedad respiratoria [259].

Un estudio ha evaluado tanto las concentraciones de citocinas en lavado nasal y plasma de pacientes infectados con virus de Influenza A [230] no encontrando

correlación entre ambos sitios anatómicos, lo que concuerda con nuestros resultados. Esto evidencia la importancia de la evaluación de marcadores inmunológicos tanto moleculares como celulares en el sitio de infección ya que, en este mismo estudio, las poblaciones celulares de monocitos son diferentes en la mucosa nasal a sangre periférica.

Se encontró una correlación positiva entre los valores de TGF- $\beta$  en lavado nasal y carga viral de Rinovirus. En la literatura se ha descrito como la infección por este virus induce un aumento en la producción de TGF- $\beta$  en células del epitelio respiratorio [260] y niveles elevados de esta citocina potencian la replicación viral debido a la regulación negativa de la respuesta inmune innata con la inhibición de producción de IFN's tipo I [261, 262] por lo que este mecanismo podría explicar nuestro hallazgo. En cuanto a las cargas virales de VSR y Metaneumovirus, correlacionaron de forma negativa con TGF- $\beta$ , si bien no se encontró ningún reporte en humanos, un estudio realizado en ratones infectados con estos virus [263], describió que los macrófagos alveolares son importantes productores de IFN's tipo I y la depleción de esta población celular en el caso de infección con VSR, potenció la replicación viral y causó un aumento en la producción de TGF- $\beta$ , es decir, la presencia de esta población celular inhibe la replicación de VSR por la producción de IFN's y presenta niveles disminuidos de TGF- $\beta$ , concordando con nuestros resultados, sin embargo, en el caso de Metaneumovirus, la depleción de los macrófagos alveolares inhibió la replicación viral sin cambios en la producción de TGF- $\beta$ .

En el caso de la correlación negativa entre los niveles de IL-6 en lavado nasal con las cargas virales de Influenza A, podría ser explicado porque se ha descrito en ratones como esta citocina promueve el reclutamiento y supervivencia (inhibiendo la apoptosis inducida por el virus) de neutrófilos en los pulmones, células importantes en el montaje de la respuesta inmune innata antiviral [264]. Por otro lado, se ha descrito como IL-17A es importante en la resolución de la infección por virus de Influenza A [227, 265], sin embargo, esta citocina se encuentra elevada en plasma y pulmón de pacientes con enfermedad grave causada por este virus [228, 229, 266]. Estos reportes concuerdan con la correlación positiva entre los niveles de IL-17A en lavado nasal con cargas virales de Influenza A encontrada en nuestra cohorte.

Anteriormente se ha descrito que los niveles de IL-6 en lavado nasal correlacionaron de forma positiva con la gravedad de los síntomas del tracto respiratorio superior [230], en concordancia con nuestros hallazgos, sin embargo, además de esta correlación, en nuestra cohorte fueron halladas correlaciones positivas con otras citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  no descritas en el estudio previamente citado. Como se mencionó en la introducción, el papel pro-inflamatorio está bien definido para estas citocinas siendo lógico que niveles elevados de estas correlacionen con la gravedad de la sintomatología. Si bien no se ha reportado un hallazgo similar; la tormenta de citocinas es la responsable de agravar los casos de infección por Influenza A [228, 267], además, pacientes fallecidos con síndrome de dificultad respiratoria aguda mostraron niveles elevados de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en lavado bronquioalveolar en comparación con aquellos que

sobrevivieron [268] y el volumen espiratorio forzado correlacionó de forma negativa con los niveles de IL-1 $\beta$  en plasma de pacientes con enfermedad obstructiva crónica [269]. Todos estos reportes concuerdan, en cierta forma, con nuestros hallazgos.

La correlación positiva entre los niveles de CCL20 en lavado nasal con la gravedad de la sintomatología no se ha descrito en ningún otro estudio, sin embargo, se ha reportado como esta quimiocina es producida por células del epitelio respiratorio en respuesta a citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  [174], como estas citocinas correlacionaron positivamente, podría explicar este suceso. Por otro lado, se ha descrito como el bloqueo de CCL20 de forma *in vivo* en ratones, redujo la patología pulmonar por favorecer una respuesta Th1 [270] concordando, en cierta forma, con nuestro resultado.

La citocina Th1 como IFN- $\gamma$ , correlacionó de forma positiva con la gravedad de la sintomatología. Se ha descrito como esta citocina se encontró elevada en suero de pacientes hospitalizados por enfermedad causada por virus de Influenza A en comparación con ambulatorios y controles sanos [228]. Por otro lado, citocinas Th2 como IL-4, IL-5 e IL-13 correlacionaron de forma negativa con la gravedad de la sintomatología. Esto podría ser debido a que en el momento de la polarización de los linfocitos T CD4+ en los órganos secundarios, una respuesta Th2 puede inhibir la polarización hacia Th1 por producción de IL-10 [271], de la misma forma, una respuesta Th1 inhibe a la Th2 por acción de IFN- $\gamma$  en un mecanismo dependiente de IL-1 [272]. La co-existencia de ambas respuestas y los mecanismos inhibitorios entre ellas es importante para regular la respuesta inmune. En concordancia con

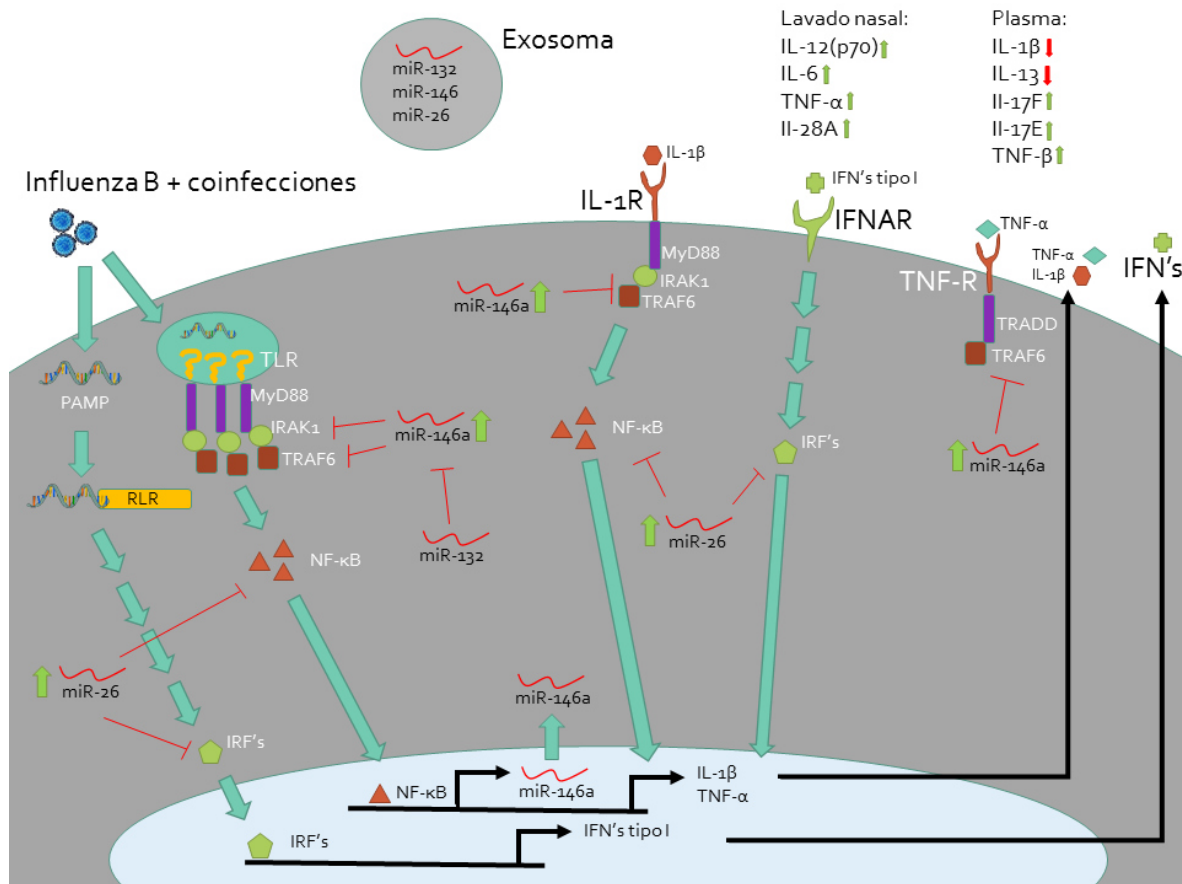
nuestros resultados, el IFN- $\gamma$  agrava la sintomatología e inhibe citocinas Th2 que correlacionaron de forma negativa con la gravedad porque regulan la respuesta Th1.

Un hallazgo inesperado fue la correlación positiva entre los niveles de IL-10 con la gravedad de la sintomatología, debido a que esta es una citocina anti-inflamatoria. Esto pudo ser explicado debido a que los niveles de IL-10 correlacionaron de forma positiva con los niveles de citocinas pro-inflamatorias, CCL20 e IFN- $\gamma$  y estas al correlacionar de forma positiva con la gravedad de la sintomatología, IL-10 muy probablemente lo hizo también por el fenómeno de multicolinealidad. Además, se ha descrito como citocinas pro-inflamatorias inducen la producción de IL-10 por distintos mecanismos [273, 274] para regular la respuesta inmune, incluso esta citocina es necesaria para modular de forma negativa la respuesta Th17 en ratones infectados con virus de Influenza A [275], por lo que el incremento de citocinas pro-inflamatorias sucede junto con el de IL-10, explicando nuestro hallazgo.

No se ha descrito el perfil de citocinas en plasma o en lavado nasal de pacientes infectados con virus respiratorios cuando presentan co-infecciones. El virus de Influenza B en presencia de co-infecciones indujo una respuesta de citocinas Th17 en plasma, sin embargo, muy probablemente la mono infección por este virus también lo haga ya que observando los valores en pacientes co-infectados se encuentran muy similares o incluso mayores, pero probablemente debido a la baja cantidad de casos en el grupo, no se observaron diferencias en comparación con el control sano. Mientras que, en lavado nasal la infección de Influenza B en presencia de co-infecciones indujo una respuesta inflamatoria con

niveles elevados de IL-6 y TNF- $\alpha$  así como IL-12 (p70) y el interferón tipo III: IL-28A (IFN- $\lambda$ 2). Los microARNs en estos mismos grupos de estudio mostraron niveles elevados de miR-26b y miR-146a en comparación con el control, por lo que la respuesta inducida por Influenza B, en presencia o no, de co-infecciones es muy parecida. Teniendo en cuenta estos hallazgos, se propone el siguiente modelo **ver Fig. 52.**

Como se describe en la imagen, es contradictorio el hecho de que los niveles de expresión de miR-26 y miR-146a (regulan de forma negativa) así como los de citocinas se encuentren aumentados. Sin embargo, se debe contemplar que se evaluaron solo algunos microARNs y existen otros involucrados en la regulación de la respuesta inmune como miR-155, miR-218, miR-203, miR-192, miR-145, let-7b, let-7i, let-7e, miR-98 y miR-26 [276].



**Fig. 52** Modelo de regulación de la respuesta inmune por microARNs en pacientes infectados con Influenza B con co-infecciones. El virus infecta a las células epiteliales cuyos receptores TLR y RLR reconocen los PAMP's virales, la activación de estos culmina con la translocación al núcleo de los factores de transcripción NF-κB e IRF's los cuales inducen la transcripción de genes que codifican para citocinas pro-inflamatorias como IL-1β y TNF-α así como IFN's tipo I (α, β y λ), respectivamente [139]. Estas citocinas actúan de manera autocrina y paracrina induciendo inflamación local y estado antiviral. El miR-146a es inducido bajo la regulación de NF-κB, sus blancos de inhibición son los ARNm que codifican para las proteínas IRAK1 y TRAF6 involucradas en la cascada de señalización de TLR's, IL-1R y TNF-R [214]. Por otro lado, miR-26 regula negativamente la vía de NF-κB e IRF's [277]. Ambos microARNs se encontraron sobreexpresados en comparación con controles sanos, sin embargo, la producción de citocinas como TNF-α, IL-6 e IL-28A se observó aumentada en lavado nasal, así como Th17 en plasma. Por otro lado, los niveles de IL-1β e IL-13 en plasma, estaban más bajos en comparación con controles sanos.

En el caso de los niveles de citocinas plasmáticas en pacientes con VSR ya sea monoinfectados o con co-infección, no hubo diferencias con los controles sanos, sin embargo, nuevamente puede deberse a un problema en la baja cantidad de casos en ambos grupos debido a que los niveles observados en pacientes VSR negativos con co-infecciones, a pesar de tener niveles mayores de citocinas en comparación con los dos grupos antes mencionados, si dieron significativas las diferencias con los controles sanos. En cuanto a lavado nasal, únicamente se observaron valores aumentados de IL-6 en pacientes VSR positivos o negativos con co-infecciones en comparación con los controles sanos, pero no se detectaron en mono-infectados pudiéndose interpretar como que el VSR no induce la producción de IL-6 o que la cantidad de casos fue muy limitada (n = 3). Sin embargo, se ha descrito que VSR induce la producción *in vitro* de esta citocina en líneas celulares de epitelio respiratorio [278] e incluso el subtipo de virus muestra diferentes potencias de inducción [279], a pesar de esto, otros factores como la dosis de infección y el hecho de ser un modelo *in vitro* podrían influir en este escenario.

En cuanto a los microARNs inducidos por este virus, se observó una posible inhibición de la expresión de miR-29c debido a que el grupo de pacientes VSR negativos con co-infecciones presentó niveles mayores en comparación con los VSR positivos. Un estudio realizado en cepillados de mucosa nasal de pacientes pediátricos infectados con VSR mostraron niveles disminuidos de miR-29c en comparación con controles sanos [280], concordando con nuestros resultados. Sin embargo, este estudio no exploró si los pacientes contaban con co-infecciones



virales por lo que impide comparar con pacientes que tienen infección viral debido a otros virus.

En el caso de pacientes infectados con Rinovirus, se observó una respuesta Th17 en plasma. Anteriormente se ha descrito como este induce una respuesta local con producción de IL-17A [281], por otro lado, pacientes pediátricos prematuros graves naturalmente infectados con Rinovirus mostraron niveles elevados de esta misma citocina en mucosa nasal [282]. Esto soporta la idea de como este virus puede modular la respuesta Th17.

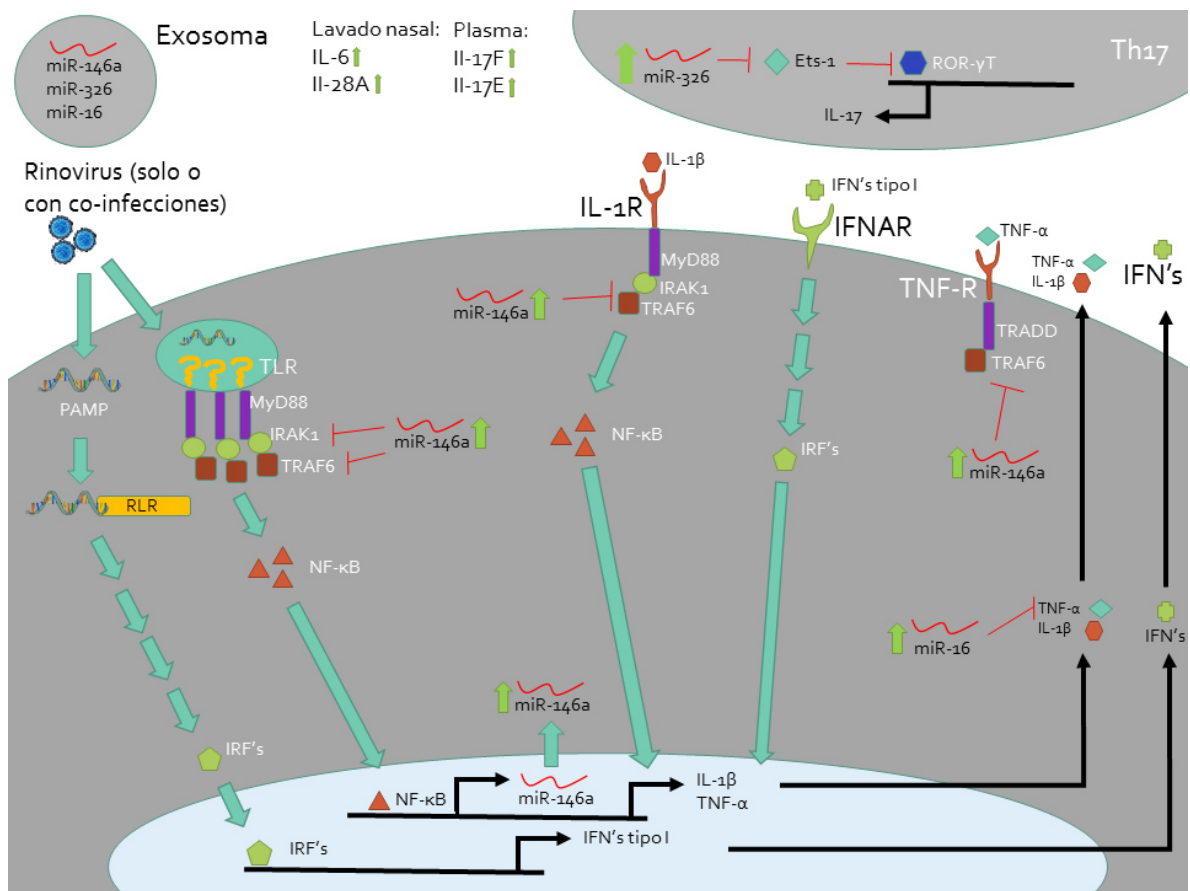
Lamentablemente debido a la baja cantidad de casos en los niveles de este tipo de citocinas en lavado nasal, probablemente no se encontraron resultados diferenciales. Sin embargo, se observó como Rinovirus induce un aumento en la producción de IL-28A en presencia de co-infecciones a diferencia de pacientes infectados por otros virus. Previamente se ha descrito como células del epitelio respiratorio producen esta citocina cuando son infectadas con el Rinovirus de forma *in vitro* concordando con nuestros resultados [283].

En cuanto a microARNs, tanto en los niveles de miR-16 como miR-146a se puede apreciar una tendencia en la supresión de la expresión por parte de los demás virus. Ambos microARNs disminuyen sus niveles de expresión en el grupo de pacientes Rinovirus positivo (monoinfección) a Rinovirus positivo con co-infecciones y en último lugar el de Rinovirus negativo con co-infecciones fue observada. A diferencia de lo encontrado en el miR-326 donde no se apreció un comportamiento como en los anteriores. Por otro lado, otra interpretación es que el

Rinovirus puede estar induciendo la expresión de miR-16 y miR-146a y este efecto se ve diluido debido a la presencia de otros agentes virales.

No se observaron valores diferenciales en citocinas Th17 en lavado nasal, pero si en plasma donde los niveles de IL-17E e IL-17F se encontraron elevados. Esto podría ser debido al aumento en la expresión de miR-326 el cual inhibe el ARNm de la proteína Ets-1, un regulador negativo de factor de transcripción maestro ROR- $\gamma$ t, el cual es indispensable para la polarización hacia una respuesta Th17 [219].

Como no hubo diferencia entre los niveles de microARNs en los grupos de pacientes mono infectados o co-infectados con Rinovirus se propone el siguiente modelo **ver Fig. 53**.

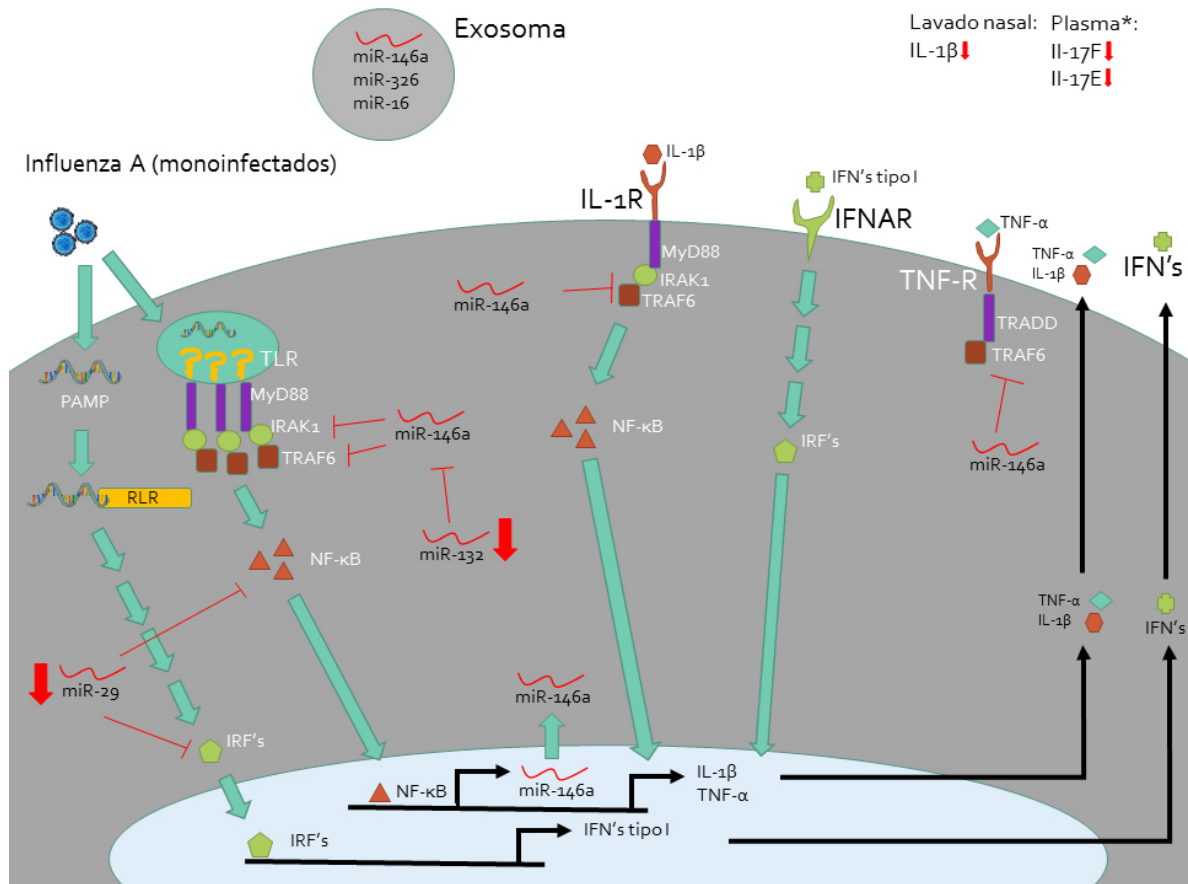


**Fig. 53** Modelo de regulación de la respuesta inmune por microARNs en pacientes mono infectados y co-infectados con Rinovirus. El virus infecta a las células epiteliales cuyos receptores TLR y RLR reconocen los PAMP's virales, la activación de estos culmina con la translocación al núcleo de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B e IRF's los cuales inducen la transcripción de genes que codifican para citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  así como IFN's tipo I ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\lambda$ ), respectivamente [139]. Estas citocinas actúan de manera autocrina y paracrina induciendo inflamación local y estado antiviral. El miR-146a es inducido bajo la regulación de NF- $\kappa$ B, sus blancos de inhibición son los ARNm que codifican para las proteínas IRAK1 y TRAF6 involucradas en la cascada de señalización de TLR's, IL-1R y TNF-R [214]. Por otro lado, los blancos de miR-16 son los mensajeros ricos en elementos AU como aquellos que codifican para TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 [200], mientras que miR-326 es un inhibidor del factor Ets-1 que a su vez es un regulador negativo del factor de transcripción ROR- $\gamma$ t necesario para la polarización de linfocitos hacia un fenotipo Th17 [219]. Se observaron niveles elevados de IL-6 e IL-28A en lavado nasal, así como de citocinas Th17 en plasma.

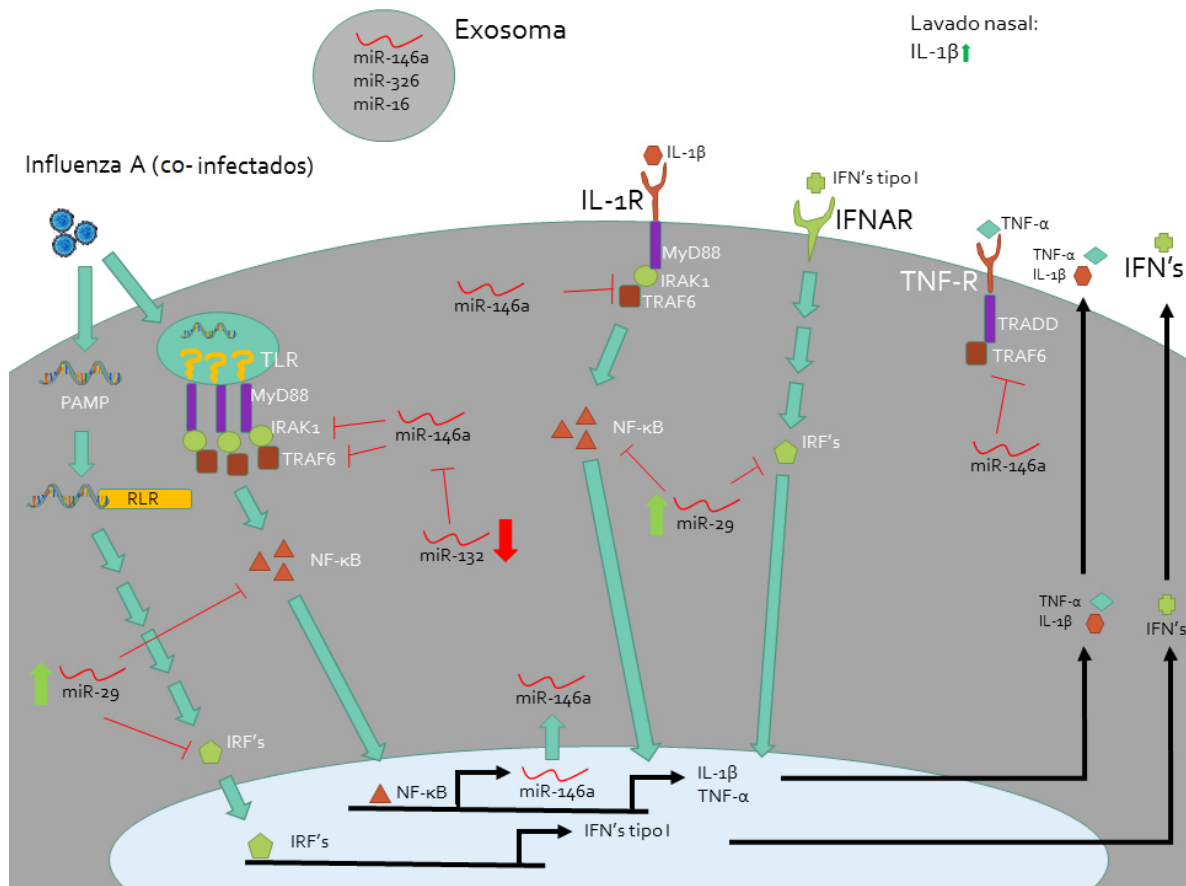
El virus de Influenza A pareciera inhibir la producción de citocinas Th17 en plasma ya que cuando este está ausente, los niveles de IL-17F e IL-17E se encuentran disminuidos. Se ha descrito como la respuesta por este tipo de citocinas es necesaria para el control de la enfermedad [227, 265] por lo que el virus podría estar modulando la respuesta inmune favoreciendo su replicación. Por otro lado, el aumento de citocinas Th17 son las encargadas de promover la patogénesis en los casos graves [228] tiempo después. Probablemente la cinética de producción de citocinas Th17 cambia a lo largo del tiempo, sin embargo, en el tiempo del reclutamiento estos valores se encuentran disminuidos cuando el virus de Influenza A esta presente.

En lavado nasal, un hallazgo importante fue la disminución en la producción de IL-1 $\beta$  en el grupo de pacientes mono infectados con el virus de Influenza A en comparación con co-infectados. Por un lado, el virus podría estar inhibiendo la síntesis de esta citocina, o bien los demás virus co-infectando inducen la síntesis en forma aditiva o sinérgica. Se ha descrito como de forma *in vitro* en células del epitelio respiratorio [284] o *in vivo* en ratones [285], este virus induce la producción de IL-1 $\beta$  y al mismo tiempo, permite su replicación. Por lo que, otra interpretación posible es que el hospedero mantenga niveles de esta citocina suficientes para montar una respuesta, pero no ayudar a la replicación del virus.

El virus de Influenza A inhibe o no induce la expresión de miR-29c incluso cuando otros agentes virales están co-infectando al paciente, sin embargo, en el caso de miR-132 la sola presencia del virus no inhibe su expresión debido a que cuando hay co-infecciones los niveles están aumentados. Dado que las respuestas parecen ser diferentes entre mono-infectados y co-infectados con el virus de Influenza A, se proponen los dos modelos siguientes, **ver Fig. 54 y 55.**



**Fig. 54** Modelo de regulación de la respuesta inmune en pacientes monoinfectados con Influenza A. El virus infecta a las células epiteliales cuyos receptores TLR y RLR reconocen los PAMP's virales, la activación de estos culmina con la translocación al núcleo de los factores de transcripción NF-κB e IRF's los cuales inducen la transcripción de genes que codifican para citocinas pro-inflamatorias como IL-1β y TNF-α así como IFN's tipo I (α, β y λ), respectivamente [139]. Estas citocinas actúan de manera autocrina y paracrina induciendo inflamación local y estado antiviral. El miR-146a es inducido bajo la regulación de NF-κB, sus blancos de inhibición son los ARNm que codifican para las proteínas IRAK1 y TRAF6 involucradas en la cascada de señalización de TLR's, IL-1R y TNF-R [214]. Por otro lado, miR-29 regula negativamente la vía de NF-κB e IRF's [221]. Mientras que miR-132 inhibe al mensajero que codifica para la proteína AGO2 necesaria para que los microARNs como miR-146a realicen su acción inhibitoria [212] o bien, inhibe el ARNm de la proteína co-activadora de la transcripción p300 y de esta forma no se transcriben los genes estimulados por interferón [213]. Se encontraron niveles disminuidos de IL-1β en lavado nasal en comparación con co-infectados, así como de citocinas Th17 en comparación con pacientes infectados por algún otro virus\*.



**Fig. 55** Modelo de regulación de la respuesta inmune en pacientes con Influenza A acompañado de co-infecciones. El virus infecta a las células epiteliales cuyos receptores TLR y RLR reconocen los PAMP's virales, la activación de estos culmina con la translocación al núcleo de los factores de transcripción NF-κB e IRF's los cuales inducen la transcripción de genes que codifican para citocinas proinflamatorias como IL-1β y TNF-α así como IFN's tipo I (α, β y λ), respectivamente [139]. Estas citocinas actúan de manera autocrina y paracrina induciendo inflamación local y estado antiviral. El miR-146a es inducido bajo la regulación de NF-κB, sus blancos de inhibición son los ARNm que codifican para las proteínas IRAK1 y TRAF6 involucradas en la cascada de señalización de TLR's, IL-1R y TNF-R [214]. Por otro lado, miR-26 regula negativamente la vía de NF-κB e IRF's [277]. Mientras que miR-132 inhibe al mensajero que codifica para la proteína AGO2 necesaria para que los microARNs como miR-146a realicen su acción inhibitoria [212] o bien, inhibe el ARNm de la proteína co-activadora de la transcripción p300 y de esta forma no se transcriben los genes estimulados por interferón [213]. Se encontraron niveles aumentados de IL-1β en lavado nasal en comparación con mono infectados

En el caso de los pacientes infectados únicamente con el virus de Influenza A se encuentra disminuida la regulación por parte de miR-29 pero, al estar disminuido miR-132, este dejaría actuar a miR-146 o por otro lado, aumentaría la transcripción de ISG's porque no inhibe a p300. Sin embargo, las citocinas tanto en lavado nasal como en plasma se encuentran disminuidas. Mientras en el caso de los pacientes con Influenza A acompañado de co-infecciones se añade la sobrerregulación negativa por parte de miR-29, sin embargo, los niveles de IL-1 $\beta$  están aumentados en comparación con mono infectados. No existe un reporte que pudiera explicar este suceso de manera clara. Probablemente, el papel de los distintos microARNs en la regulación tiene distinto peso, o la afinidad y eficiencia de inhibición es diferente entre ellos.

Se ha descrito que los niveles de expresión de miR-146a aumentan en la infección con Influenza A de células epiteliales respiratorias humanas (A549) de forma *in vitro* [286], sin embargo, estos niveles comienzan a disminuir a las 24 h lo cual concuerda con nuestros resultados debido a que las muestras fueron tomadas cuando los pacientes ya contaban con síntomas y el tiempo de incubación de este virus es en promedio 2 días [287], por lo que probablemente en tiempos posteriores los niveles de miR-146a disminuyen.

La infección por Coronavirus y Parainfluenza indujo una expresión de microARNs muy similar, pero esto no fue así a nivel de citocinas plasmáticas. Por un lado, Coronavirus no induce o inhibe la producción de CCL20 e IL-28A a diferencia cuando se encuentran otros virus co-infectando. Mientras que Parainfluenza induce una respuesta Th1/Th17/Treg con el aumento en la



producción de IFN- $\gamma$ , IL-17F, IL-17E e IL-10. En cuanto a lavado nasal, Coronavirus no mostró diferencias mientras que, Parainfluenza indujo una respuesta pro-inflamatoria con producción de IL-6 e IL-28A. Se ha descrito como SARS-CoV no induce la producción de IFN- $\beta$  en macrófagos de forma contraria a CoV-229E [288], poniendo de manifiesto la importancia del análisis detalladamente incluso hasta el subtipo de virus. También, SARS-CoV no induce la expresión de algunos genes relacionados con la respuesta inmune innata incluyendo a IL-28A [289], concordando en cierta parte con nuestros hallazgos. En cuanto a Parainfluenza, se ha descrito que induce la producción de IFN- $\gamma$  en células humanas de epitelio nasal [290] en las primeras 24-48h, esto concuerda con nuestro hallazgo en plasma, sin embargo no se observó el mismo efecto en lavado nasal, esto porque probablemente la baja cantidad de casos no permitió encontrar diferencia significativa. Por otro lado, se ha descrito un papel importante para IL-10, debido a que el virus de Parainfluenza induce la producción de esta citocina en células mononucleares de sangre periférica de forma *in vitro* y actúa protegiendo a los linfocitos T de la apoptosis inducida por el virus [291], concordando con nuestros hallazgos

Únicamente en el grupo de Metaneumovirus con co-infecciones, los niveles de IL-17E se encontraron aumentados. Se ha descrito en la infección experimental de humanos con este virus, que la respuesta de citocinas en secreciones nasales es muy variable entre individuos y no se observó una tendencia por una respuesta en específico [292]. Por otro lado, un estudio en ratones infectados con Metaneumovirus no induce la producción de IL-17 en lavado bronquioalveolar [293],

no concordando con nuestros resultados, sin embargo no reportan que isoforma y además la diferencia entre ratones y humanos no debe ignorarse.

En nuestra cohorte, los pacientes infectados con Metaneumovirus no mostraron ninguna diferencia en los niveles de expresión de los microARNs analizados, sin embargo, se ha descrito en un estudio realizado de forma *in vitro* donde infectan células epiteliales respiratorias humanas (A549) con este virus, la inducción de la expresión de let-7f y miR-452 mientras que inhibe la transcripción de miR-374\* y miR-192 [223]. Debido a esto, el estudio de otros microARNs en estos pacientes es importante. Una limitante probable fue la poca cantidad de casos analizados.

Los niveles de miR-21 y miR-326 aumentaron y disminuyeron en nuestra cohorte de estudio al día 7 en comparación con el día del reclutamiento. Como ya se mencionó, miR-21 regula de forma negativa la respuesta Th1 [204] e inhibe la proteína pro-inflamatoria PDCD4 [205], mientras que miR-326 inhibe la proteína Ets-1 favoreciendo una respuesta Th17 [219] y esta se asocia con casos graves de enfermedad respiratoria dirigiendo la tormenta de citocinas junto con las Th1 [228] concordando con nuestro resultado debido a que la mayoría de los pacientes mejoraron al día 7 en comparación con el día del reclutamiento.

Se ha descrito como TGF- $\beta$  regula de forma negativa los niveles de expresión de miR-29 [294, 295] y previamente se mencionó como esta citocina correlacionó de forma positiva con la replicación viral de Rinovirus debido a que regula de forma negativa la respuesta inmune innata [261], en conjunto, estos reportes concuerdan

con nuestro hallazgo de que las cargas virales de Rinovirus correlacionaron de forma negativa con los niveles de expresión de miR-29.

## **CONCLUSIONES**

## 9. CONCLUSIONES

1. El virus más frecuente en nuestra cohorte de estudio fue el virus de Influenza B.
2. La tos y los síntomas del tracto respiratorio superior fueron los más graves.
3. Cada virus induce un perfil de citocinas distinto tanto a nivel local como sistémico.
4. Se encontró un perfil de expresión diferencial dependiendo del agente viral tanto de microRNAs (miR-326, miR-132, miR-29 y miR-26) como de citocinas (pro-inflamatorias, anti-inflamatorias y quimiocinas), los cuales pueden ser posibles biomarcadores de gravedad.

## **PERSPECTIVAS**

## 10. PERSPECTIVAS

1. Replicar los hallazgos en una cohorte de estudio más grande, incluso que permita estudiar a nivel de subtipo viral.
2. Determinar si existe una predisposición a contraer infección bacteriana o viral cuando se cuenta con una infección por cualquier agente patógeno respiratorio.
3. Evaluar las co-infecciones bacterianas en un estudio similar para establecer perfiles diferenciales.
4. Evaluar las poblaciones celulares en las muestras de lavado nasal mediante citometría de flujo para correlacionar con la gravedad de la sintomatología y detectar posibles blancos terapéuticos.
5. Realizar cultivos primarios e inhibir o potenciar la actividad de los miARNs para observar el efecto inducido sobre la carga viral y citocinas.

## **REFERENCIAS**



## 12. REFERENCIAS

1. (UK), C.f.C.P.a.N. *Respiratory Tract Infections - Antibiotic Prescribing*. 2008 [cited 2016 21-ene-16]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53632/>.
2. Eccles, M.P., et al., *Applying psychological theories to evidence-based clinical practice: identifying factors predictive of managing upper respiratory tract infections without antibiotics*. Implement Sci, 2007. **2**: p. 26.
3. Lakdawala, S.S. and K. Subbarao, *The ongoing battle against influenza: The challenge of flu transmission*. Nat Med, 2012. **18**(10): p. 1468-70.
4. Richard, M. and R.A. Fouchier, *Influenza A virus transmission via respiratory aerosols or droplets as it relates to pandemic potential*. FEMS Microbiol Rev, 2016. **40**(1): p. 68-85.
5. Horimoto, T. and Y. Kawaoka, *Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(8): p. 591-600.
6. Taubenberger, J.K. and J.C. Kash, *Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation*. Cell Host Microbe, 2010. **7**(6): p. 440-51.
7. Russier, M., et al., *Molecular requirements for a pandemic influenza virus: An acid-stable hemagglutinin protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(6): p. 1636-41.
8. Thomaston, J.L., et al., *High-resolution structures of the M2 channel from influenza A virus reveal dynamic pathways for proton stabilization and transduction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(46): p. 14260-5.
9. Fanning, T.G., A.H. Reid, and J.K. Taubenberger, *Influenza A virus neuraminidase: regions of the protein potentially involved in virus-host interactions*. Virology, 2000. **276**(2): p. 417-23.
10. Kim, K., et al., *Host-Specific and Segment-Specific Evolutionary Dynamics of Avian and Human Influenza A Viruses: A Systematic Review*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0147021.
11. Yoon, S.W., R.J. Webby, and R.G. Webster, *Evolution and ecology of influenza A viruses*. Curr Top Microbiol Immunol, 2014. **385**: p. 359-75.
12. Olsen, B., et al., *Global patterns of influenza a virus in wild birds*. Science, 2006. **312**(5772): p. 384-8.
13. Garten, R.J., et al., *Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans*. Science, 2009. **325**(5937): p. 197-201.
14. Freidl, G.S., et al., *Influenza at the animal-human interface: a review of the literature for virological evidence of human infection with swine or avian influenza viruses other than A(H5N1)*. Euro Surveill, 2014. **19**(18).
15. Francis, T., Jr., *A New Type of Virus from Epidemic Influenza*. Science, 1940. **92**(2392): p. 405-8.
16. Rota, P.A., et al., *Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983*. Virology, 1990. **175**(1): p. 59-68.
17. Osterhaus, A.D., et al., *Influenza B virus in seals*. Science, 2000. **288**(5468): p. 1051-3.

18. Chen, R. and E.C. Holmes, *Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics*. Mol Biol Evol, 2006. **23**(12): p. 2336-41.
19. Jackson, D., R.A. Elderfield, and W.S. Barclay, *Molecular studies of influenza B virus in the reverse genetics era*. J Gen Virol, 2011. **92**(Pt 1): p. 1-17.
20. Weis, W., et al., *Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid*. Nature, 1988. **333**(6172): p. 426-31.
21. Yoshimura, A., et al., *Infectious cell entry mechanism of influenza virus*. J Virol, 1982. **43**(1): p. 284-93.
22. Rodriguez Boulan, E. and D.D. Sabatini, *Asymmetric budding of viruses in epithelial monolayers: a model system for study of epithelial polarity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(10): p. 5071-5.
23. Henrickson, K.J., *Parainfluenza viruses*. Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(2): p. 242-64.
24. Canchola, J., et al., *Antigenic Variation among Newly Isolated Strains of Parainfluenza Type 4 Virus*. Am J Hyg, 1964. **79**: p. 357-64.
25. Henrickson, K.J. and L.L. Savatski, *Genetic variation and evolution of human parainfluenza virus type 1 hemagglutinin neuraminidase: analysis of 12 clinical isolates*. J Infect Dis, 1992. **166**(5): p. 995-1005.
26. Priniski, K., et al., *Evolution of the fusion protein gene of human parainfluenza virus 3*. Virus Res, 1992. **22**(1): p. 55-69.
27. Howe, C., et al., *Morphogenesis of type 2 parainfluenza virus examined by light and electron microscopy*. J Virol, 1967. **1**(1): p. 215-37.
28. Storey, D.G., K. Dimock, and C.Y. Kang, *Structural characterization of virion proteins and genomic RNA of human parainfluenza virus 3*. J Virol, 1984. **52**(3): p. 761-6.
29. Fehr, A.R. and S. Perlman, *Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis*. Methods Mol Biol, 2015. **1282**: p. 1-23.
30. McIntosh, K., W.B. Becker, and R.M. Chanock, *Growth in suckling-mouse brain of "IBV-like" viruses from patients with upper respiratory tract disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1967. **58**(6): p. 2268-73.
31. Bradburne, A.F., M.L. Bynoe, and D.A. Tyrrell, *Effects of a "new" human respiratory virus in volunteers*. Br Med J, 1967. **3**(5568): p. 767-9.
32. Woo, P.C., et al., *Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia*. J Virol, 2005. **79**(2): p. 884-95.
33. van der Hoek, L., et al., *Identification of a new human coronavirus*. Nat Med, 2004. **10**(4): p. 368-73.
34. Peck, K.M., et al., *Coronavirus Host Range Expansion and Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Emergence: Biochemical Mechanisms and Evolutionary Perspectives*. Annu Rev Virol, 2015. **2**(1): p. 95-117.
35. Neuman, B.W., et al., *Supramolecular architecture of severe acute respiratory syndrome coronavirus revealed by electron cryomicroscopy*. J Virol, 2006. **80**(16): p. 7918-28.
36. Delmas, B. and H. Laude, *Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression*. J Virol, 1990. **64**(11): p. 5367-75.

37. Bosch, B.J., et al., *The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex*. J Virol, 2003. **77**(16): p. 8801-11.
38. de Haan, C.A. and P.J. Rottier, *Molecular interactions in the assembly of coronaviruses*. Adv Virus Res, 2005. **64**: p. 165-230.
39. Palmenberg, A.C., J.A. Rathe, and S.B. Liggett, *Analysis of the complete genome sequences of human rhinovirus*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(6): p. 1190-9; quiz 1200-1.
40. Lamson, D., et al., *MassTag polymerase-chain-reaction detection of respiratory pathogens, including a new rhinovirus genotype, that caused influenza-like illness in New York State during 2004-2005*. J Infect Dis, 2006. **194**(10): p. 1398-402.
41. Nurani, G., B. Lindqvist, and J.M. Casasnovas, *Receptor priming of major group human rhinoviruses for uncoating and entry at mild low-pH environments*. J Virol, 2003. **77**(22): p. 11985-91.
42. Fuchs, R. and D. Blaas, *Uncoating of human rhinoviruses*. Rev Med Virol, 2010. **20**(5): p. 281-97.
43. Jacobs, S.E., et al., *Human rhinoviruses*. Clin Microbiol Rev, 2013. **26**(1): p. 135-62.
44. Blount, R.E., Jr., J.A. Morris, and R.E. Savage, *Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza*. Proc Soc Exp Biol Med, 1956. **92**(3): p. 544-9.
45. Chanock, R., B. Roizman, and R. Myers, *Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization*. Am J Hyg, 1957. **66**(3): p. 281-90.
46. Hall, C.B., *Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus*. N Engl J Med, 2001. **344**(25): p. 1917-28.
47. Ogra, P.L., *Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response*. Paediatr Respir Rev, 2004. **5 Suppl A**: p. S119-26.
48. Borchers, A.T., et al., *Respiratory syncytial virus--a comprehensive review*. Clin Rev Allergy Immunol, 2013. **45**(3): p. 331-79.
49. van den Hoogen, B.G., et al., *A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease*. Nat Med, 2001. **7**(6): p. 719-24.
50. Williams, J.V., et al., *Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children*. N Engl J Med, 2004. **350**(5): p. 443-50.
51. Biacchesi, S., et al., *Frequent frameshift and point mutations in the SH gene of human metapneumovirus passaged in vitro*. J Virol, 2007. **81**(11): p. 6057-67.
52. Panda, S., et al., *Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen*. Int J Infect Dis, 2014. **25**: p. 45-52.
53. Schildgen, V., et al., *Human Metapneumovirus: lessons learned over the first decade*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(4): p. 734-54.
54. Global Burden of Disease Study, C., *Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and*

- chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. Lancet, 2015. **386**(9995): p. 743-800.
55. Cherry, D.K., et al., *National Ambulatory Medical Care Survey: 2006 summary*. Natl Health Stat Report, 2008(3): p. 1-39.
  56. DGE. *Incidencia de Infecciones respiratorias agudas por grupos de edad en los Estados Unidos Mexicanos*. 2015 [cited 2016; Available from: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/incidencia/enfermedad\\_grupo\\_edad\\_entidad\\_federativa/016.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/incidencia/enfermedad_grupo_edad_entidad_federativa/016.pdf)].
  57. DGE, *Veinte principales causas de enfermedad en el grupo de 20 a 24 años en los Estados Unidos Mexicanos 2015*. 2015.
  58. DGE. *Veinte principales causas de enfermedad en el grupo de 25 a 44 años en los Estados Unidos Mexicanos 2015*. 2015 [cited 2016; Available from: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/principales/grupo/veinticinco\\_44.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/principales/grupo/veinticinco_44.pdf)].
  59. DGE. *Veinte principales causas de enfermedad en el grupo de 45 a 49 años en los Estados Unidos Mexicanos 2015*. 2015 [cited 2016; Available from: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/principales/grupo/cuarentaicinco\\_49.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/principales/grupo/cuarentaicinco_49.pdf)].
  60. DGE. *Veinte principales causas de enfermedad en el grupo de 50 a 59 años en los Estados Unidos Mexicanos 2015*. 2015 [cited 2016; Available from: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/principales/grupo/cincuenta\\_59.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/principales/grupo/cincuenta_59.pdf)].
  61. DGE. *Veinte principales causas de enfermedad en el grupo de 60 a 64 años en los Estados Unidos Mexicanos 2015*. 2015 [cited 2016; Available from: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/principales/grupo/sesenta\\_64.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/principales/grupo/sesenta_64.pdf)].
  62. DGE. *Veinte principales causas de enfermedad en el grupo de mayores de 65 años en los Estados Unidos Mexicanos 2015*. 2015 [cited 2016; Available from: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/principales/grupo/sesentaicinco\\_mas.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/principales/grupo/sesentaicinco_mas.pdf)].
  63. DGE. *Informe semanal de vigilancia epidemiologica de infecciones respiratorias agudas (semana 26 del 2016)*. 2016 [cited 2016; Available from: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/informes/2016/doctos/ira/IRA\\_2016\\_SE26.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/informes/2016/doctos/ira/IRA_2016_SE26.pdf)].
  64. CDC. *The Flu season*. 2014 [cited 2016; Available from: <http://www.cdc.gov/flu/about/season/flu-season.htm>].
  65. Lofgren, E., et al., *Influenza seasonality: underlying causes and modeling theories*. J Virol, 2007. **81**(11): p. 5429-36.
  66. CDC. *update: Influenza Activity — United States, October 4, 2015–February 6, 2016*. 2016 [cited 2016; Available from: [http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6506a3.htm?s\\_cid=mm6506a3\\_e](http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6506a3.htm?s_cid=mm6506a3_e)].

67. Paul Glezen, W., et al., *The burden of influenza B: a structured literature review*. Am J Public Health, 2013. **103**(3): p. e43-51.
68. Long, C.E., et al., *Influenza surveillance in community-dwelling elderly compared with children*. Arch Fam Med, 1997. **6**(5): p. 459-65.
69. Libow, L.S., et al., *Sequential outbreak of influenza A and B in a nursing home: efficacy of vaccine and amantadine*. J Am Geriatr Soc, 1996. **44**(10): p. 1153-7.
70. Drinka, P.J., et al., *Outbreaks of influenza A and B in a highly immunized nursing home population*. J Fam Pract, 1997. **45**(6): p. 509-14.
71. Yamakoshi, M., et al., *Respiratory viral infections in the elderly in a nursing home*. Kansenshogaku Zasshi, 1998. **72**(9): p. 876-82.
72. Gorse, G.J., et al., *Impact of a winter respiratory virus season on patients with COPD and association with influenza vaccination*. Chest, 2006. **130**(4): p. 1109-16.
73. Dao, C.N., et al., *Adult hospitalizations for laboratory-positive influenza during the 2005-2006 through 2007-2008 seasons in the United States*. J Infect Dis, 2010. **202**(6): p. 881-8.
74. Zambon, M., et al., *Diagnosis of influenza in the community: relationship of clinical diagnosis to confirmed virological, serologic, or molecular detection of influenza*. Arch Intern Med, 2001. **161**(17): p. 2116-22.
75. v d Hoeven, A.M., et al., *Lack of discriminating signs and symptoms in clinical diagnosis of influenza of patients admitted to the hospital*. Infection, 2007. **35**(2): p. 65-8.
76. Monto, A.S., et al., *Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza A and B virus infections*. J Infect Dis, 1999. **180**(2): p. 254-61.
77. Bettis, R., et al., *Impact of influenza treatment with oseltamivir on health, sleep and daily activities of otherwise healthy adults and adolescents*. Clin Drug Investig, 2006. **26**(6): p. 329-40.
78. Kaiser, L., et al., *Impact of oseltamivir treatment on influenza-related lower respiratory tract complications and hospitalizations*. Arch Intern Med, 2003. **163**(14): p. 1667-72.
79. Kok, T. and G. Higgins, *Prevalence of respiratory viruses and Mycoplasma pneumoniae in sputum samples from unselected adult patients*. Pathology, 1997. **29**(3): p. 300-2.
80. Thursky, K., et al., *Working towards a simple case definition for influenza surveillance*. J Clin Virol, 2003. **27**(2): p. 170-9.
81. Brotherton, J.M., et al., *A large outbreak of influenza A and B on a cruise ship causing widespread morbidity*. Epidemiol Infect, 2003. **130**(2): p. 263-71.
82. Seale, H., et al., *The use of oseltamivir during an influenza B outbreak in a chronic care hospital*. Influenza Other Respir Viruses, 2009. **3**(1): p. 15-20.
83. Foo, H., et al., *Laboratory test performance in young adults during influenza outbreaks at World Youth Day 2008*. J Clin Virol, 2009. **46**(4): p. 384-6.
84. DGE. *Incidencia de Influenza por grupos de edad en los Estados Unidos Mexicanos 2015*. 2015 [cited 2016; Available from:

[http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/incidencia/enfermedad\\_grupo\\_edad\\_entidad\\_federativa/090.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/incidencia/enfermedad_grupo_edad_entidad_federativa/090.pdf).

85. DGE. *Informe semanal de Influenza 2016/Semana 26*. 2016 [cited 2016; Available from: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/informes/2016/doctos/influenza/INFLUENZA\\_2016\\_SE26.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/informes/2016/doctos/influenza/INFLUENZA_2016_SE26.pdf).
86. Liu, W.K., et al., *Epidemiology and clinical presentation of the four human parainfluenza virus types*. BMC Infect Dis, 2013. **13**: p. 28.
87. Villaran, M.V., et al., *Human parainfluenza virus in patients with influenza-like illness from Central and South America during 2006-2010*. Influenza Other Respir Viruses, 2014. **8**(2): p. 217-27.
88. Kraaijeveld, C.A., S.E. Reed, and M.R. Macnaughton, *Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody in volunteers experimentally infected with human coronavirus strain 229 E*. J Clin Microbiol, 1980. **12**(4): p. 493-7.
89. Reed, S.E., *The behaviour of recent isolates of human respiratory coronavirus in vitro and in volunteers: evidence of heterogeneity among 229E-related strains*. J Med Virol, 1984. **13**(2): p. 179-92.
90. Falsey, A.R., et al., *The "common cold" in frail older persons: impact of rhinovirus and coronavirus in a senior daycare center*. J Am Geriatr Soc, 1997. **45**(6): p. 706-11.
91. Lepiller, Q., et al., *High incidence but low burden of coronaviruses and preferential associations between respiratory viruses*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(9): p. 3039-46.
92. Drosten, C., et al., *Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome*. N Engl J Med, 2003. **348**(20): p. 1967-76.
93. Zaki, A.M., et al., *Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia*. N Engl J Med, 2012. **367**(19): p. 1814-20.
94. Mizumoto, K., et al., *Estimating the risk of Middle East respiratory syndrome (MERS) death during the course of the outbreak in the Republic of Korea, 2015*. Int J Infect Dis, 2015. **39**: p. 7-9.
95. Milne-Price, S., K.L. Miazgowicz, and V.J. Munster, *The emergence of the Middle East respiratory syndrome coronavirus*. Pathog Dis, 2014. **71**(2): p. 121-36.
96. Gwaltney, J.M., Jr., et al., *Rhinovirus infections in an industrial population. I. The occurrence of illness*. N Engl J Med, 1966. **275**(23): p. 1261-8.
97. Winther, B., F.G. Hayden, and J.O. Hendley, *Picornavirus infections in children diagnosed by RT-PCR during longitudinal surveillance with weekly sampling: Association with symptomatic illness and effect of season*. J Med Virol, 2006. **78**(5): p. 644-50.
98. Arakawa, M., et al., *Molecular epidemiological study of human rhinovirus species A, B and C from patients with acute respiratory illnesses in Japan*. J Med Microbiol, 2012. **61**(Pt 3): p. 410-9.
99. Briese, T., et al., *Global distribution of novel rhinovirus genotype*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(6): p. 944-7.

100. McErlean, P., et al., *Distinguishing molecular features and clinical characteristics of a putative new rhinovirus species, human rhinovirus C (HRV C)*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e1847.
101. Graat, J.M., et al., *A prospective, community-based study on virologic assessment among elderly people with and without symptoms of acute respiratory infection*. J Clin Epidemiol, 2003. **56**(12): p. 1218-23.
102. Fry, A.M., et al., *Human rhinovirus infections in rural Thailand: epidemiological evidence for rhinovirus as both pathogen and bystander*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17780.
103. Peltola, V., et al., *Rhinovirus transmission within families with children: incidence of symptomatic and asymptomatic infections*. J Infect Dis, 2008. **197**(3): p. 382-9.
104. Makela, M.J., et al., *Viruses and bacteria in the etiology of the common cold*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(2): p. 539-42.
105. Lessler, J., et al., *Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review*. Lancet Infect Dis, 2009. **9**(5): p. 291-300.
106. Pappas, D.E., et al., *Symptom profile of common colds in school-aged children*. Pediatr Infect Dis J, 2008. **27**(1): p. 8-11.
107. Gwaltney, J.M., Jr., et al., *Rhinovirus infections in an industrial population. II. Characteristics of illness and antibody response*. JAMA, 1967. **202**(6): p. 494-500.
108. Arruda, E., et al., *Frequency and natural history of rhinovirus infections in adults during autumn*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(11): p. 2864-8.
109. Fendrick, A.M., et al., *The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States*. Arch Intern Med, 2003. **163**(4): p. 487-94.
110. Peret, T.C., et al., *Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America*. J Infect Dis, 2000. **181**(6): p. 1891-6.
111. Hall, C.B., C.E. Long, and K.C. Schnabel, *Respiratory syncytial virus infections in previously healthy working adults*. Clin Infect Dis, 2001. **33**(6): p. 792-6.
112. Falsey, A.R., *Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults*. Exp Lung Res, 2005. **31 Suppl 1**: p. 77.
113. Walsh, E.E. and A.R. Falsey, *Respiratory syncytial virus infection in adult populations*. Infect Disord Drug Targets, 2012. **12**(2): p. 98-102.
114. Jansen, A.G., et al., *Influenza- and respiratory syncytial virus-associated mortality and hospitalisations*. Eur Respir J, 2007. **30**(6): p. 1158-66.
115. Aberle, J.H., et al., *Human metapneumovirus subgroup changes and seasonality during epidemics*. Pediatr Infect Dis J, 2010. **29**(11): p. 1016-8.
116. Kaida, A., et al., *Seasonal distribution and phylogenetic analysis of human metapneumovirus among children in Osaka City, Japan*. J Clin Virol, 2006. **35**(4): p. 394-9.
117. Arnott, A., et al., *Genetic variability of human metapneumovirus amongst an all ages population in Cambodia between 2007 and 2009*. Infect Genet Evol, 2013. **15**: p. 43-52.



118. Esper, F., et al., *A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years*. J Infect Dis, 2004. **189**(8): p. 1388-96.
119. Pitoiset, C., et al., *Human metapneumovirus genotypes and severity of disease in young children (n = 100) during a 7-year study in Dijon hospital, France*. J Med Virol, 2010. **82**(10): p. 1782-9.
120. Agapov, E., et al., *Genetic variability of human metapneumovirus infection: evidence of a shift in viral genotype without a change in illness*. J Infect Dis, 2006. **193**(3): p. 396-403.
121. Larcher, C., et al., *Comparison of human metapneumovirus genotypes from the province of Bolzano in northern Italy with strains from surrounding regions in Italy and Austria*. Jpn J Infect Dis, 2008. **61**(2): p. 154-6.
122. Ditt, V., et al., *Respiratory infections by HMPV and RSV are clinically indistinguishable but induce different host response in aged individuals*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e16314.
123. Lusebrink, J., et al., *High seroprevalence of neutralizing capacity against human metapneumovirus in all age groups studied in Bonn, Germany*. Clin Vaccine Immunol, 2010. **17**(3): p. 481-4.
124. Ebihara, T., et al., *Comparison of the seroprevalence of human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus*. J Med Virol, 2004. **72**(2): p. 304-6.
125. Lu, G., et al., *Large-scale seroprevalence analysis of human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus infections in Beijing, China*. Virol J, 2011. **8**: p. 62.
126. Rafiefard, F., Z. Yun, and C. Orvell, *Epidemiologic characteristics and seasonal distribution of human metapneumovirus infections in five epidemic seasons in Stockholm, Sweden, 2002-2006*. J Med Virol, 2008. **80**(9): p. 1631-8.
127. Osbourn, M., et al., *Outbreak of human metapneumovirus infection in a residential aged care facility*. Commun Dis Intell Q Rep, 2009. **33**(1): p. 38-40.
128. Roche, W.R., et al., *Cell adhesion molecules and the bronchial epithelium*. Am Rev Respir Dis, 1993. **148**(6 Pt 2): p. S79-82.
129. Bergelson, J.M., *Intercellular junctional proteins as receptors and barriers to virus infection and spread*. Cell Host Microbe, 2009. **5**(6): p. 517-21.
130. Bergelson, J.M., *Virus interactions with mucosal surfaces: alternative receptors, alternative pathways*. Curr Opin Microbiol, 2003. **6**(4): p. 386-91.
131. Voynow, J.A. and B.K. Rubin, *Mucins, mucus, and sputum*. Chest, 2009. **135**(2): p. 505-12.
132. Nicholas, B., et al., *Shotgun proteomic analysis of human-induced sputum*. Proteomics, 2006. **6**(15): p. 4390-401.
133. Akira, S., *Pathogen recognition by innate immunity and its signaling*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2009. **85**(4): p. 143-56.
134. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 730-7.



135. Kang, D.C., et al., *mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 637-42.
136. Yoneyama, M., et al., *Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 2851-8.
137. Takeuchi, O. and S. Akira, *Innate immunity to virus infection*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 75-86.
138. Kato, H., et al., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 101-5.
139. Randall, R.E. and S. Goodbourn, *Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 1): p. 1-47.
140. Vareille, M., et al., *The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(1): p. 210-29.
141. Loo, Y.M. and M. Gale, Jr., *Immune signaling by RIG-I-like receptors*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 680-92.
142. Sasai, M., et al., *NAK-associated protein 1 participates in both the TLR3 and the cytoplasmic pathways in type I IFN induction*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8676-83.
143. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
144. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors*. Curr Protoc Immunol, 2015. **109**: p. 14 12 1-10.
145. Muir, A., et al., *Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **30**(6): p. 777-83.
146. Diamond, G., D. Legarda, and L.K. Ryan, *The innate immune response of the respiratory epithelium*. Immunol Rev, 2000. **173**: p. 27-38.
147. Iwamura, C. and T. Nakayama, *Toll-like receptors in the respiratory system: their roles in inflammation*. Curr Allergy Asthma Rep, 2008. **8**(1): p. 7-13.
148. Guillot, L., et al., *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, 2005. **280**(7): p. 5571-80.
149. Hewson, C.A., et al., *Toll-like receptor 3 is induced by and mediates antiviral activity against rhinovirus infection of human bronchial epithelial cells*. J Virol, 2005. **79**(19): p. 12273-9.
150. Groskreutz, D.J., et al., *Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1733-40.
151. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1143**: p. 1-20.
152. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Semin Immunol, 2007. **19**(1): p. 24-32.

153. Greene, C.M. and N.G. McElvaney, *Toll-like receptor expression and function in airway epithelial cells*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2005. **53**(5): p. 418-27.
154. Haeberle, H.A., et al., *Respiratory syncytial virus-induced activation of nuclear factor-kappaB in the lung involves alveolar macrophages and toll-like receptor 4-dependent pathways*. J Infect Dis, 2002. **186**(9): p. 1199-206.
155. Haynes, L.M., et al., *Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus*. J Virol, 2001. **75**(22): p. 10730-7.
156. Kurt-Jones, E.A., et al., *Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 398-401.
157. Lee, R.M., M.R. White, and K.L. Hartshorn, *Influenza A viruses upregulate neutrophil toll-like receptor 2 expression and function*. Scand J Immunol, 2006. **63**(2): p. 81-9.
158. Lee, N., et al., *Role of human Toll-like receptors in naturally occurring influenza A infections*. Influenza Other Respir Viruses, 2013. **7**(5): p. 666-75.
159. Murawski, M.R., et al., *Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2*. J Virol, 2009. **83**(3): p. 1492-500.
160. Land, W.G., *The Role of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Human Diseases: Part II: DAMPs as diagnostics, prognostics and therapeutics in clinical medicine*. Sultan Qaboos Univ Med J, 2015. **15**(2): p. e157-70.
161. Petrilli, V., et al., *The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(6): p. 615-22.
162. Allen, I.C., et al., *The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA*. Immunity, 2009. **30**(4): p. 556-65.
163. Thomas, P.G., et al., *The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1*. Immunity, 2009. **30**(4): p. 566-75.
164. Pestka, S., C.D. Krause, and M.R. Walter, *Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors*. Immunol Rev, 2004. **202**: p. 8-32.
165. Schoenborn, J.R. and C.B. Wilson, *Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses*. Adv Immunol, 2007. **96**: p. 41-101.
166. Donnelly, R.P. and S.V. Kotenko, *Interferon-lambda: a new addition to an old family*. J Interferon Cytokine Res, 2010. **30**(8): p. 555-64.
167. McNab, F., et al., *Type I interferons in infectious disease*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(2): p. 87-103.
168. Garcia, M.A., E.F. Meurs, and M. Esteban, *The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control*. Biochimie, 2007. **89**(6-7): p. 799-811.
169. Gil, J. and M. Esteban, *Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action*. Apoptosis, 2000. **5**(2): p. 107-14.
170. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.

171. Zhou, Z., et al., *Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases*. J Virol, 2007. **81**(14): p. 7749-58.
172. Mogensen, T.H. and S.R. Paludan, *Molecular pathways in virus-induced cytokine production*. Microbiol Mol Biol Rev, 2001. **65**(1): p. 131-50.
173. Piper, S.C., et al., *The role of interleukin-1 and interleukin-18 in pro-inflammatory and anti-viral responses to rhinovirus in primary bronchial epithelial cells*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63365.
174. Reibman, J., et al., *Airway epithelial cells release MIP-3alpha/CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **28**(6): p. 648-54.
175. See, H. and P. Wark, *Innate immune response to viral infection of the lungs*. Paediatr Respir Rev, 2008. **9**(4): p. 243-50.
176. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503-10.
177. Wang, H., N. Peters, and J. Schwarze, *Plasmacytoid dendritic cells limit viral replication, pulmonary inflammation, and airway hyperresponsiveness in respiratory syncytial virus infection*. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 6263-70.
178. Smit, J.J., et al., *The balance between plasmacytoid DC versus conventional DC determines pulmonary immunity to virus infections*. PLoS One, 2008. **3**(3): p. e1720.
179. Kadowaki, N., et al., *Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 863-9.
180. Power, C.A., et al., *Cloning and characterization of a specific receptor for the novel CC chemokine MIP-3alpha from lung dendritic cells*. J Exp Med, 1997. **186**(6): p. 825-35.
181. Grayson, M.H. and M.J. Holtzman, *Emerging role of dendritic cells in respiratory viral infection*. J Mol Med (Berl), 2007. **85**(10): p. 1057-68.
182. Swain, S.L., K.K. McKinstry, and T.M. Strutt, *Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(2): p. 136-48.
183. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(8): p. 509-24.
184. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
185. Wahid, F., et al., *MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(11): p. 1231-43.
186. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
187. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. Cell, 1993. **75**(5): p. 855-62.

188. Ruvkun, G. and J. Giusto, *The Caenorhabditis elegans heterochronic gene lin-14 encodes a nuclear protein that forms a temporal developmental switch*. Nature, 1989. **338**(6213): p. 313-9.
189. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 901-6.
190. Pasquinelli, A.E., et al., *Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 86-9.
191. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
192. Griffiths-Jones, S., *The microRNA Registry*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue): p. D109-11.
193. Han, J., et al., *Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex*. Cell, 2006. **125**(5): p. 887-901.
194. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
195. Bohnsack, M.T., K. Czaplinski, and D. Gorlich, *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. RNA, 2004. **10**(2): p. 185-91.
196. Hutvagner, G., et al., *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. Science, 2001. **293**(5531): p. 834-8.
197. Su, H., et al., *Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing*. Genes Dev, 2009. **23**(3): p. 304-17.
198. Ambros, V., et al., *A uniform system for microRNA annotation*. RNA, 2003. **9**(3): p. 277-9.
199. Fromm, B., et al., *A Uniform System for the Annotation of Vertebrate microRNA Genes and the Evolution of the Human microRNAome*. Annu Rev Genet, 2015. **49**: p. 213-42.
200. Jing, Q., et al., *Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability*. Cell, 2005. **120**(5): p. 623-34.
201. Landgraf, P., et al., *A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1401-14.
202. Lu, T.X., A. Munitz, and M.E. Rothenberg, *MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression*. J Immunol, 2009. **182**(8): p. 4994-5002.
203. Gately, M.K., et al., *The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 495-521.
204. Lu, T.X., et al., *MicroRNA-21 limits in vivo immune response-mediated activation of the IL-12/IFN-gamma pathway, Th1 polarization, and the severity of delayed-type hypersensitivity*. J Immunol, 2011. **187**(6): p. 3362-73.
205. Sheedy, F.J., et al., *Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21*. Nat Immunol, 2010. **11**(2): p. 141-7.

206. Fabbri, M., et al., *MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(31): p. E2110-6.
207. Liu, G. and E. Abraham, *MicroRNAs in immune response and macrophage polarization*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(2): p. 170-7.
208. Liu, S., et al., *Respiratory syncytial virus infection inhibits TLR4 signaling via up-regulation of miR-26b*. Cell Biol Int, 2015. **39**(12): p. 1376-83.
209. Zhang, L., et al., *MicroRNA-26b Modulates the NF-kappaB Pathway in Alveolar Macrophages by Regulating PTEN*. J Immunol, 2015. **195**(11): p. 5404-14.
210. Hong, Y., et al., *miR-29b and miR-29c are involved in Toll-like receptor control of glucocorticoid-induced apoptosis in human plasmacytoid dendritic cells*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69926.
211. Ma, F., et al., *The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon-gamma*. Nat Immunol, 2011. **12**(9): p. 861-9.
212. Leonov, G., et al., *Suppression of AGO2 by miR-132 as a determinant of miRNA-mediated silencing in human primary endothelial cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2015. **69**: p. 75-84.
213. Lagos, D., et al., *miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(5): p. 513-9.
214. Taganov, K.D., et al., *NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(33): p. 12481-6.
215. Park, H., et al., *MicroRNA-146a and microRNA-146b regulate human dendritic cell apoptosis and cytokine production by targeting TRAF6 and IRAK1 proteins*. J Biol Chem, 2015. **290**(5): p. 2831-41.
216. Perry, M.M., et al., *Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells*. J Immunol, 2008. **180**(8): p. 5689-98.
217. Xu, D., et al., *miR-146a negatively regulates NK cell functions via STAT1 signaling*. Cell Mol Immunol, 2016.
218. Miyata, R., et al., *Poly(I:C) induced microRNA-146a regulates epithelial barrier and secretion of proinflammatory cytokines in human nasal epithelial cells*. Eur J Pharmacol, 2015. **761**: p. 375-82.
219. Du, C., et al., *MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis*. Nat Immunol, 2009. **10**(12): p. 1252-9.
220. Skovgaard, K., et al., *Expression of innate immune genes, proteins and microRNAs in lung tissue of pigs infected experimentally with influenza virus (H1N2)*. Innate Immun, 2013. **19**(5): p. 531-44.
221. Zhang, X., et al., *Induction of the cellular miR-29c by influenza virus inhibits the innate immune response through protection of A20 mRNA*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **450**(1): p. 755-61.

222. Wang, Y.Y., et al., *A20 is a potent inhibitor of TLR3- and Sendai virus-induced activation of NF-kappaB and ISRE and IFN-beta promoter*. FEBS Lett, 2004. **576**(1-2): p. 86-90.
223. Deng, J., et al., *Human metapneumovirus infection induces significant changes in small noncoding RNA expression in airway epithelial cells*. Mol Ther Nucleic Acids, 2014. **3**: p. e163.
224. Bakre, A., et al., *Respiratory syncytial virus modifies microRNAs regulating host genes that affect virus replication*. J Gen Virol, 2012. **93**(Pt 11): p. 2346-56.
225. Ouda, R., et al., *Retinoic acid-inducible gene I-inducible miR-23b inhibits infections by minor group rhinoviruses through down-regulation of the very low density lipoprotein receptor*. J Biol Chem, 2011. **286**(29): p. 26210-9.
226. Moran, J., et al., *Circulating levels of miR-150 are associated with poorer outcomes of A/H1N1 infection*. Exp Mol Pathol, 2015. **99**(2): p. 253-61.
227. Wang, X., et al., *A critical role of IL-17 in modulating the B-cell response during H5N1 influenza virus infection*. Cell Mol Immunol, 2011. **8**(6): p. 462-8.
228. Bermejo-Martin, J.F., et al., *Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza*. Crit Care, 2009. **13**(6): p. R201.
229. Li, C., et al., *IL-17 response mediates acute lung injury induced by the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus*. Cell Res, 2012. **22**(3): p. 528-38.
230. Oshansky, C.M., et al., *Mucosal immune responses predict clinical outcomes during influenza infection independently of age and viral load*. Am J Respir Crit Care Med, 2014. **189**(4): p. 449-62.
231. Inchley, C.S., et al., *Nasal mucosal microRNA expression in children with respiratory syncytial virus infection*. BMC Infect Dis, 2015. **15**(1): p. 150.
232. Cohen, S., W.J. Doyle, and D.P. Skoner, *Psychological stress, cytokine production, and severity of upper respiratory illness*. Psychosom Med, 1999. **61**(2): p. 175-80.
233. Xu, C., et al., *Downregulation of microRNA miR-526a by enterovirus inhibits RIG-I-dependent innate immune response*. J Virol, 2014. **88**(19): p. 11356-68.
234. Manthei, D.M., et al., *Nasal lavage VEGF and TNF-alpha levels during a natural cold predict asthma exacerbations*. Clin Exp Allergy, 2014. **44**(12): p. 1484-93.
235. Stefanska, I., et al., *Co-infections with influenza and other respiratory viruses*. Adv Exp Med Biol, 2013. **756**: p. 291-301.
236. Zhan, Y., et al., *Respiratory virus is a real pathogen in immunocompetent community-acquired pneumonia: comparing to influenza like illness and volunteer controls*. BMC Pulm Med, 2014. **14**: p. 144.
237. Goka, E.A., et al., *Pan-human coronavirus and human bocavirus SYBR Green and TaqMan PCR assays; use in studying influenza A viruses co-infection and risk of hospitalization*. Infection, 2015. **43**(2): p. 185-92.

238. Peci, A., et al., *Community-acquired respiratory viruses and co-infection among patients of Ontario sentinel practices, April 2009 to February 2010*. *Influenza Other Respir Viruses*, 2013. **7**(4): p. 559-66.
239. Goka, E., et al., *Influenza A viruses dual and multiple infections with other respiratory viruses and risk of hospitalisation and mortality*. *Influenza Other Respir Viruses*, 2013. **7**(6): p. 1079-87.
240. Tanner, H., E. Boxall, and H. Osman, *Respiratory viral infections during the 2009-2010 winter season in Central England, UK: incidence and patterns of multiple virus co-infections*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012. **31**(11): p. 3001-6.
241. Martins Junior, R.B., et al., *Detection of respiratory viruses by real-time polymerase chain reaction in outpatients with acute respiratory infection*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2014. **109**(6): p. 716-21.
242. Ben M'hadheb, M., et al., *Multiplex RT-PCR and indirect immunofluorescence assays for detection and subtyping of human influenza virus in Tunisia*. *Curr Microbiol*, 2015. **70**(3): p. 324-9.
243. Russo, M.L., et al., *Antigenic and genomic characterization of human influenza A and B viruses circulating in Argentina after the introduction of influenza A(H1N1)pdm09*. *J Med Microbiol*, 2014. **63**(Pt 12): p. 1626-37.
244. DGE. *Informe semanal de Influenza/ semana 28*. 2016 [cited 2016; Available from: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/informes/2016/doctos/influenza/INFLUENZA\\_2016\\_SE29.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/informes/2016/doctos/influenza/INFLUENZA_2016_SE29.pdf).
245. Diaz, J., et al., *Viral coinfection in acute respiratory infection in Mexican children treated by the emergency service: A cross-sectional study*. *Ital J Pediatr*, 2015. **41**: p. 33.
246. Goto, H., et al., *Enhanced growth of influenza A virus by coinfection with human parainfluenza virus type 2*. *Med Microbiol Immunol*, 2016. **205**(3): p. 209-18.
247. Zhang, D., et al., *Epidemiology characteristics of respiratory viruses found in children and adults with respiratory tract infections in southern China*. *Int J Infect Dis*, 2014. **25**: p. 159-64.
248. Lee, N., et al., *Viral loads and duration of viral shedding in adult patients hospitalized with influenza*. *J Infect Dis*, 2009. **200**(4): p. 492-500.
249. Noh, J.Y., et al., *Viral load dynamics in adult patients with A(H1N1)pdm09 influenza*. *Epidemiol Infect*, 2014. **142**(4): p. 753-8.
250. Ansar Ahmed, S., W.J. Penhale, and N. Talal, *Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action*. *Am J Pathol*, 1985. **121**(3): p. 531-51.
251. Fairweather, D., S. Frisancho-Kiss, and N.R. Rose, *Sex differences in autoimmune disease from a pathological perspective*. *Am J Pathol*, 2008. **173**(3): p. 600-9.
252. Bouman, A., M.J. Heineman, and M.M. Faas, *Sex hormones and the immune response in humans*. *Hum Reprod Update*, 2005. **11**(4): p. 411-23.

253. DeVincenzo, J.P., C.M. El Saleeby, and A.J. Bush, *Respiratory syncytial virus load predicts disease severity in previously healthy infants*. J Infect Dis, 2005. **191**(11): p. 1861-8.
254. Martin, E.T., et al., *Multiple versus single virus respiratory infections: viral load and clinical disease severity in hospitalized children*. Influenza Other Respir Viruses, 2012. **6**(1): p. 71-7.
255. Lu, P.X., et al., *Relationship between respiratory viral load and lung lesion severity: a study in 24 cases of pandemic H1N1 2009 influenza A pneumonia*. J Thorac Dis, 2012. **4**(4): p. 377-83.
256. Deng, Y., et al., *High viral load of human bocavirus correlates with duration of wheezing in children with severe lower respiratory tract infection*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e34353.
257. Echenique, I.A., et al., *Clinical characteristics and outcomes in hospitalized patients with respiratory viral co-infection during the 2009 H1N1 influenza pandemic*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60845.
258. Asner, S.A., et al., *Clinical disease severity of respiratory viral co-infection versus single viral infection: a systematic review and meta-analysis*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e99392.
259. Yang, M., et al., *Bacterial coinfection is associated with severity of avian influenza A (H7N9), and procalcitonin is a useful marker for early diagnosis*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2016. **84**(2): p. 165-9.
260. Dosanjh, A., *Transforming growth factor-beta expression induced by rhinovirus infection in respiratory epithelial cells*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2006. **38**(12): p. 911-4.
261. Thomas, B.J., et al., *Transforming growth factor-beta enhances rhinovirus infection by diminishing early innate responses*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009. **41**(3): p. 339-47.
262. Bedke, N., et al., *Transforming growth factor-beta promotes rhinovirus replication in bronchial epithelial cells by suppressing the innate immune response*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e44580.
263. Kolli, D., et al., *Alveolar macrophages contribute to the pathogenesis of human metapneumovirus infection while protecting against respiratory syncytial virus infection*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014. **51**(4): p. 502-15.
264. Dienz, O., et al., *Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung*. Mucosal Immunol, 2012. **5**(3): p. 258-66.
265. Wang, X., et al., *IL-17A Promotes Pulmonary B-1a Cell Differentiation via Induction of Blimp-1 Expression during Influenza Virus Infection*. PLoS Pathog, 2016. **12**(1): p. e1005367.
266. Rodriguez-Ramirez, H.G., et al., *CD206+ cell number differentiates influenza A (H1N1)pdm09 from seasonal influenza A virus in fatal cases*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 921054.
267. Yu, X., et al., *Intensive cytokine induction in pandemic H1N1 influenza virus infection accompanied by robust production of IL-10 and IL-6*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28680.



268. Meduri, G.U., et al., *Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome.* Chest, 1995. **108**(5): p. 1303-14.
269. Singh, B., S. Arora, and V. Khanna, *Association of severity of COPD with IgE and interleukin-1 beta.* Monaldi Arch Chest Dis, 2010. **73**(2): p. 86-7.
270. Kallal, L.E., et al., *CCL20/CCR6 blockade enhances immunity to RSV by impairing recruitment of DC.* Eur J Immunol, 2010. **40**(4): p. 1042-52.
271. Ria, F., G. Penna, and L. Adorini, *Th1 cells induce and Th2 inhibit antigen-dependent IL-12 secretion by dendritic cells.* Eur J Immunol, 1998. **28**(6): p. 2003-16.
272. Oriss, T.B., et al., *Crossregulation between T helper cell (Th)1 and Th2: inhibition of Th2 proliferation by IFN-gamma involves interference with IL-1.* J Immunol, 1997. **158**(8): p. 3666-72.
273. Rosser, E.C., et al., *Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1beta and interleukin-6 production.* Nat Med, 2014. **20**(11): p. 1334-9.
274. Platzer, C., et al., *Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs.* Int Immunol, 1995. **7**(4): p. 517-23.
275. McKinstry, K.K., et al., *IL-10 deficiency unleashes an influenza-specific Th17 response and enhances survival against high-dose challenge.* J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7353-63.
276. Zhou, R., S.P. O'Hara, and X.M. Chen, *MicroRNA regulation of innate immune responses in epithelial cells.* Cell Mol Immunol, 2011. **8**(5): p. 371-9.
277. Chen, C.Y., et al., *MiR-26 down-regulates TNF-alpha/NF-kappaB signalling and IL-6 expression by silencing HMGA1 and MALT1.* Nucleic Acids Res, 2016. **44**(8): p. 3772-87.
278. Xie, X.H., et al., *Resveratrol Inhibits respiratory syncytial virus-induced IL-6 production, decreases viral replication, and downregulates TRIF expression in airway epithelial cells.* Inflammation, 2012. **35**(4): p. 1392-401.
279. Levitz, R., et al., *Induction of IL-6 and CCL5 (RANTES) in human respiratory epithelial (A549) cells by clinical isolates of respiratory syncytial virus is strain specific.* Virol J, 2012. **9**: p. 190.
280. Inchley, C.S., et al., *Nasal mucosal microRNA expression in children with respiratory syncytial virus infection.* BMC Infect Dis, 2015. **15**: p. 150.
281. Wiehler, S. and D. Proud, *Interleukin-17A modulates human airway epithelial responses to human rhinovirus infection.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(2): p. L505-15.
282. Perez, G.F., et al., *Rhinovirus-induced airway cytokines and respiratory morbidity in severely premature children.* Pediatr Allergy Immunol, 2015. **26**(2): p. 145-52.
283. Rajan, D., et al., *Response to rhinovirus infection by human airway epithelial cells and peripheral blood mononuclear cells in an in vitro two-chamber tissue culture system.* PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66600.

284. Kim, K.S., et al., *Induction of interleukin-1 beta (IL-1beta) is a critical component of lung inflammation during influenza A (H1N1) virus infection.* J Med Virol, 2015. **87**(7): p. 1104-12.
285. Schmitz, N., et al., *Interleukin-1 is responsible for acute lung immunopathology but increases survival of respiratory influenza virus infection.* J Virol, 2005. **79**(10): p. 6441-8.
286. Buggele, W.A., K.E. Johnson, and C.M. Horvath, *Influenza A virus infection of human respiratory cells induces primary microRNA expression.* J Biol Chem, 2012. **287**(37): p. 31027-40.
287. CDC. *Clinical Signs and Symptoms of Influenza.* 2016 [cited 2016; Available from: <http://www.cdc.gov/flu/professionals/acip/clinical.htm>.
288. Cheung, C.Y., et al., *Cytokine responses in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected macrophages in vitro: possible relevance to pathogenesis.* J Virol, 2005. **79**(12): p. 7819-26.
289. Ziegler, T., et al., *Severe acute respiratory syndrome coronavirus fails to activate cytokine-mediated innate immune responses in cultured human monocyte-derived dendritic cells.* J Virol, 2005. **79**(21): p. 13800-5.
290. Lewandowska-Polak, A., et al., *Human parainfluenza virus type 3 (HPIV3) induces production of IFN $\gamma$  and RANTES in human nasal epithelial cells (HNECs).* J Inflamm (Lond), 2015. **12**: p. 16.
291. Sieg, S., et al., *The role of interleukin-10 in the inhibition of T-cell proliferation and apoptosis mediated by parainfluenza virus type 3.* J Virol, 1996. **70**(7): p. 4845-8.
292. Talaat, K.R., et al., *Experimental infection of adults with recombinant wild-type human metapneumovirus.* J Infect Dis, 2013. **208**(10): p. 1669-78.
293. Guerrero-Plata, A., A. Casola, and R.P. Garofalo, *Human metapneumovirus induces a profile of lung cytokines distinct from that of respiratory syncytial virus.* J Virol, 2005. **79**(23): p. 14992-7.
294. Zhou, L., et al., *Inhibition of miR-29 by TGF-beta-Smad3 signaling through dual mechanisms promotes transdifferentiation of mouse myoblasts into myofibroblasts.* PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33766.
295. Winbanks, C.E., et al., *TGF-beta regulates miR-206 and miR-29 to control myogenic differentiation through regulation of HDAC4.* J Biol Chem, 2011. **286**(16): p. 13805-14.

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Erick Roel Arredondo Loza  
Candidato para el Grado de  
Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunología Médica

Tesis: PERFIL DE MICRORNAS Y CITOCINAS EN PACIENTES ADULTOS CON INFECCIÓN RESPIRATORIA VIRAL AGUDA COMO BIOMARCADORES DE GRAVEDAD

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

### Biografía:

*Datos personales:* Nacido en Río Bravo, Tamaulipas el 25 de junio de 1991. Hijo de Genaro Arredondo Garza y Ma. Guadalupe Loza Aguilar. Actualmente, residente en la ciudad de San Nicolás de los Garza, Nuevo León desde 2009.

*Educación:* Egresado del Centro de Bachillerato, Tecnológico, Industrial y de Servicios No. 73 (CBTIS 73) como Técnico Laboratorista Clínico en 2009 y de la Universidad Autónoma de Nuevo León como Químico Clínico Biólogo en 2014. Cumplió su Servicio Social en el Departamento de Química Analítica realizando investigación científica en el ámbito de la Química de Productos Naturales. Realizó una Movilidad Académica a la Universidad de Buenos Aires en Argentina durante el 2013.

### Experiencia profesional:

- 1) Asistente de Investigador SNI III durante enero – julio 2014 en el Depto. de Química Analítica de la Facultad de Medicina UANL.
- 2) Auxiliar de Investigación durante agosto 2011 – diciembre 2013 en el Depto. de Química Analítica de la Facultad de Medicina UANL.