

Universidad Nacional de La Plata



**Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas
Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM)**



Patogénesis molecular en la infección experimental por virus Coxsackie B3

Lic. Carolina Jaquenod De Giusti

**Tesis Doctoral
2013**

Director: Dr. Ricardo M. Gómez

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP-CCT-La Plata-CONICET, bajo la dirección del Dr. Ricardo M. Gómez.

A quienes me han sabido acompañar a lo largo
de este camino, ellos saben quiénes son..

Reconocimiento

Mi reconocimiento a la Universidad Nacional de La Plata, a la Facultad de Ciencias Exactas, al Departamento de Ciencias Biológicas y al IBBM, por brindarme el ámbito para realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme las becas que me permitieron llevar a cabo el presente trabajo.

Agradecimientos

Al Dr. Ricardo M. Gómez, por guiarme a lo largo de estos años, por renegar conmigo pero seguir enseñándome, por incentivar a moverme, por siempre apoyarme, por dejarme tomar mis propias decisiones aunque no siempre estuviera de acuerdo, por confiar en mí y siempre defenderme. Siempre voy a estar agradecida por esta oportunidad, por tu confianza y tu apoyo.

Al Dr. Victor Romanowski, por la oportunidad que dio inicio al resto. Por siempre estar dispuesto a ayudar.

Al IBBM en su totalidad, porque a pesar de todo es un lugar de trabajo de esos a los que uno siempre quiere volver.

A todos los integrantes del IBBM, por hacer del trabajo de uno siempre más fácil, porque siempre hay una mano dispuesta a ayudar.

Al laboratorio de Trombosis Experimental de la Academia Nacional de Medicina. A la Dra. Schattner y a todo su grupo. Por la colaboración constante.

Al Centro de Investigaciones Cardiovasculares de la Facultad de Medicina, por ayudarme con los cardiomiocitos que tanto me costaron, por enseñarme. A Mónica Rando por su entrenamiento y sus células.

Al Dr. Miriuka y todo su grupo de trabajo del Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular, FLENI, por su colaboración en el estudio de las células embrionarias humanas.

Al Dr. Martín Rumbo y a Loli, por las J774 que tanto les he pedido.

Al Dr. Bergelson y a su laboratorio, por ayudar desde lo lejos y luego acompañarme desde cerca. Por la oportunidad de conocer su laboratorio, trabajar con su gente, charlar con él. Por ayudarme a cumplir un sueño. Por Filadelfia y CHOP.

Al Dr. Caffini, quién me inició en la ciencia, me guió en la carrera, me recomendó para la Beca. Si hubiera un padrino de ciencia, serías el mío.

Al laboratorio de Virus Animales, por ser el lugar donde elegí y elijo trabajar. A sus integrantes, que saben hacerlo un excelente lugar de trabajo, por divertirnos, acompañarnos. A los VA anteriores, a la pequeña Marina y a Edu, al infalible y siempre listo para ayudar Agustín y mi adorada Laurita, a Javi, Ale, Fer. A Katy. A los de ahora (presentes y viajeros): a Leti, Noe, Gabi, Maia, Haaseeeee, Jesi, Lucre, Flor, Emi, Mati. A Leito que es de acá y allá. Gracias a todos por todos estos años, pero sobre todo por el último, porque hay momentos difíciles que sólo muestran lo que vale la gente. Gracias por ayudarme y mimarme tanto, incluso a la distancia.

A Ricardo, por ser un jefe de los que hay pocos. Por la absoluta fidelidad. Por el “no quiero torturarte pero..”. Por mantenerme en tierra pero empujarme a volar. Por enseñarme a pensar y discutir. Por escucharme siempre. Por ser mucho más que un jefe.

A Leti, mi compañera más antigua, mi amiga. Gracias por estar siempre ahí, por entender cuando te pido que me esperes con mate. Gracias por estos años y por los que vendrán. Gracias por nuestras mil charlas y almuerzos. Gracias por mimarme tanto. Gracias por cuidarme y ser tan incondicional. Gracias por siempre defenderme. Tengo tantas gracias para darte que me torno reiterativa. Te quiero muchísimo.

A Noeli, por tu amistad, por tu honestidad bruta, por nuestra capacidad de hablarnos sin palabras, porque siendo tan distintas somos lo mismo. Te adoro.

A Ma. Laura García y sus verdes, por ser compañeros, amigos. A Agus y Gabo. A los R4 pasados y presentes. A los RPS. A Flor del Papa, Mariano, Tony, por ayudarme mucho, por preocuparse y ocuparse siempre. A los Bordetella. A mi compañera de mil y un materias y TPs, Emi. A Julieta Fernández por las charlas, por preocuparse y retarme, por perseguir mis expedientes más que yo misma.

A los R3 que se merecen un párrafo aparte. Por ser mi escondite, mi cable a tierra en los momentos más difíciles, mis amigos. Por retarme, cuidarme, acompañarme, ayudarme, hacerme horrorizar y sonrojar tantas veces, por hacerme reír aún más. Por hacerme lugar en mesadas, escritorios, festejos. A Flor, JPG, Quelas, Pity, Elías, Julia, Cove. A Aníbal por asesorarme en esta última etapa y por aceptarme las invasiones.

A Florcita por todos estos años, por ser mi amiga desde hace muchos y ser siempre tan fiel, tan compañera. Por ser una de las pocas personas a las que dejaría a cargo de mi casa y mi gato. Por estar siempre lista para ayudar. Por el 2012, por lo rápido que respondiste al momento que te necesité. Por el jueves fuera del depto y mil veces más. Te adoro.

A Jotita por tanto. Por ser tan sincera pero cuidarse tanto de no lastimarme. Por alegrarse por mis logros y confiarme sus alegrías. A Quelas, por tantas charlas y retos.

A mis dos compañeras de sufrimiento, Cove y Jime. Vamos que llegamos!

A mi familia.

A mis papas, no hay palabras suficientes para agradecerles. Porque tenerlos de mi lado ha sido una fuerza que me acompañó siempre. Por nunca retarnos ni cuestionarnos. Por el apoyo incondicional, por la fuerza y el orgullo que siempre demostraron por nosotros. Por no pedir nada a cambio. Por ser padres y malcriarnos siempre pero no demasiado. Por enseñarnos lo que se puede conseguir en la vida con trabajo duro. Por sobreponerse a todo cuando lo necesite. Por acompañarme a lo largo de estos 29 años, de los de la carrera y los del Doctorado y más que nada el último. Por hacerme tan fácil pedirles ayuda. Papá y mamá, me encantó encontrarlos como padres y confidentes estos últimos años. Son los mejores padres que uno podría tener y son los míos. A mamá por Philly.

A mis dos maravillosos e infalibles hermanos. A Gise que hace más de tres años se fue a vivir a la otra punta del mundo pero siempre se las ingenió para estar presente. Por mimarme siempre. Por darme Noruega y todo lo que significó para mí. A Ole por ser un cuñado excelente. A los dos por darme una Navidad y Año Nuevo inolvidables. A Gusti, porque nunca vas a dejar de ser mi pequeño aunque ya seas todo un hombre. Por siempre estar. A Pepa por ser tan hermosa y dulce. Tengo los 2 + 2 hermanos más hermosos.

A mis tíos y primos. Porque todos y cada uno me ha ayudado y acompañado en lo que ha podido. Por cuidarme. A Verito por ser infalible.

A mis dos hermanas de la vida y su familia. A Nadia e Ivana y los Ravea/Pietromónaco. Por ser incondicionales. Por ser amigas, hermanas y compañeras. Haberlas conocido fue un regalo de la vida. Las adoro con el alma. Gracias por estar siempre, por ser mi fuerza y mi empuje. Por estar siempre listas. Por cuidarme y saber siempre lo que necesito. Al Bochi, por ser de esos amigos de oro. Por siempre sacarme una sonrisa. Por defenderme a muerte y cuidarme. A Nadu y Nacho por darme a Iri, mi princesa, una parte muy grande de mi felicidad. Por ser la personita que me hace olvidar de todo. Escucharte decir tía fue uno de los momentos más felices de mi vida. Por darme fuerza. Por aceptar una tía en la compu.

A Nacho Di Cecco, mi amigo más antiguo y hermano. Por nuestra amistad que no le teme a tiempos ni distancias.

A Jesi y Pao, mis adorables amigas.

A los chicos del barrio, que me han acompañado todos estos años sin tener la más remota idea de que hago. A Lucho por ser tan compañero. Te quiero amigo!

A Paco y Pablo, por rescatarme en Filadelfia. Por transformar ese viaje en un sueño hecho realidad. Por el apoyo, el aguante, las incontables risas. Los veo pronto amigos!

A los chicos de Philly y la IHouse, por divertirme tanto y cuidarme más. Porque me devolvieron a alguien que creía perdida.

A Letizia, mi veci/amiga. Porque encontrarnos hace tres años en ese ascensor transformó mi edificio en mi hogar.

A quienes aunque ya no estén acá son una parte grande de este logro.

A quienes dieron tanto sin recibir a cambio en este extenso último año. Por entender, aceptar e incluso incentivar Philly.

A todos aquellos que seguramente olvidé nombrar. Gracias por acompañarme a llegar!

Índice

Índice	1
Índice de figuras	7
Índice de tablas.....	9
Abreviaturas	11
I. Introducción	
A. Introducción	I-1
1. Introducción general	I-1
Virus coxsackie	I-1
Genoma y estructura de CVB.....	I-2
Receptores de CVB	I-5
Ingreso viral	I-6
Ciclo de infección.....	I-8
2. Enfermedades y patologías asociadas	I-14
3. Miocarditis y cardiomiopatía dilatada	I-14
4. Etapas de la infección	I-16
Etapas de la infección viral	I-16
Etapas de la miocarditis viral por CVB	I-17
5. Replicación de CVB en células especializadas.....	I-19
Cardiomiocitos.....	I-19
Fibroblastos cardíacos	I-20
Macrófagos.....	I-20
6. Respuesta inmune, inflamación, daño celular y fibrosis.....	I-21
Inmunidad innata	I-21
IFN-I	I-22

Células de la respuesta inmune innata	I-23
Macrófagos en la respuesta inmune	I-24
Fibroblastos y fibrosis	I-28
Daño cardíaco	I-29
Galectina 3.....	I-30
B. Objetivo general	I-33
Objetivos específicos e hipótesis de trabajo	I-33
1. Estudiar la expresión de los receptores celulares y su correlación con la susceptibilidad a la infección por virus Coxsackie B (CVB) en células cardíacas murinas y humanas y en ratones de distintas cepas.....	I-33
2. Estudiar la infección de macrófagos por CVB	I-34
3. Estudiar el rol de macrófagos en la miocarditis viral y la fibrosis	I-34
II. Materiales y Métodos	
Materiales y métodos	II-1
Materiales, reactivos, soluciones	II-1
Bacterias	II-1
Líneas celulares.....	II-1
Medios de cultivo	II-1
Obtención de stocks virales	II-2
MiniPrep.....	II-2
Transcripción in vitro	II-4
Transfección y electroporación	II-5
Titulación por dosis de cultivo de tejidos infectiva 50 (TCID50/ml)	II-7
Titulación por placa	II-8
Aislamiento de cardiomiocitos murinos	II-8
Producción de cardiomiocitos humanos.....	II-9
Infección de cultivos celulares	II-10

Activación de macrófagos.....	II-10
Análisis de viabilidad celular.....	II-10
Inmunofluorescencia.....	II-11
Animales.....	II-11
Infección de animales.....	II-11
Depleción de macrófagos.....	II-11
Citometría de flujo.....	II-12
Inhibición de Gal-3.....	II-12
Histología e inmunohistoquímica.....	II-12
Obtención de RNA total.....	II-13
Síntesis de DNA complementario.....	II-13
PCR.....	II-14
PCR en tiempo real.....	II-15
Electroforesis en geles de agarosa.....	II-16
Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	II-16
Western blot.....	II-16
ELISA de Galectina 3.....	II-17

III. Resultados

1. Expresión de los receptores celulares y su correlación con la susceptibilidad a la infección por virus Coxsackie B (CVB) en células cardíacas murinas y humanas y en ratones de distintas cepas.....	III-1
3-A. Células cardíacas humanas.....	III-2
i. Las células utilizadas expresan marcadores de pluripotencialidad.....	III-2
ii. Las hESC diferenciadas expresan marcadores cardíacos.....	III-3
iii. Los niveles de los receptores CAR y DAF se modulan con la diferenciación.....	III-4
iv. Tanto las hESC como las hESC-CM son susceptibles a la infección por CVB.....	III-5

v.	Se observa una menor susceptibilidad a la infección en las hESC-CM.....	III-6
vi.	La infección disminuye la viabilidad celular.....	III-7
3-B.	Células murinas	III-9
i.	Obtención de cardiomiocitos murinos	III-9
ii.	Los niveles del receptor CAR se modulan con la diferenciación celular	III-11
iii.	Tanto los cardiomiocitos derivados de ratones recién nacidos como de ratones adultos son susceptibles a la infección por CVB3.....	III-12
iv.	Se observó una menor susceptibilidad a la infección en los cardiomiocitos de animales adultos	III-13
3-C.	Análisis de la susceptibilidad en ratones de cepas distintas.	III-14
i.	Menor susceptibilidad a la infección viral en ratones C57BL/6	III-14
ii.	Menor grado de injuria tisular en ratones C57BL/6.....	III-15
iii.	Menores niveles de CAR en ratones C57BL/6.....	III-15
	Discusión	III-17
2.	Infección de macrófagos por CVB.....	III-21
i.	Susceptibilidad a la infección.....	III-21
ii.	Citoquinas y marcadores de activación en la infección	III-21
iii.	Estado de activación y susceptibilidad a la infección.....	III-22
iv.	La infección de los macrófagos por CVB3 produce cambios en los niveles de Gal-3	III-25
	Discusión	III-27
3.	Rol de los macrófagos en la miocarditis viral y la fibrosis.....	III-33
3-A.	Rol de los macrófagos en las etapas aguda y subaguda de la miocarditis viral	III-34
i.	Esquema de depleción	III-34
ii.	La depleción de macrófagos aumenta los títulos virales a 3 y 7 dpi	III-35
iii.	La depleción de macrófagos disminuye el daño tisular agudo	III-35
iv.	Infiltrado inflamatorio en la miocarditis viral	III-36

v.	La depleción de macrófagos disminuye la expresión de Gal-3 e iNOS cardíacas inducidas por la infección.....	III-37
vi.	La depleción disminuye los niveles de señales proinflamatorias.....	III-38
vii.	Gal-3 modula la replicación viral en varios tejidos	III-39
viii.	La inhibición de Gal-3 no afecta la replicación viral.....	III-40
ix.	La inhibición de Gal-3 disminuye el daño tisular	III-41
3-B.	Rol de los macrófagos en la etapa crónica de la miocarditis	III-42
i.	Esquema de depleción	III-42
ii.	La depleción de macrófagos no conduce a la persistencia viral	III-43
iii.	La infección conduce a la aparición de focos fibróticos en corazón y reemplazo adiposo en páncreas	III-44
iv.	La tinción con Sirius Red confirmó los cambios en la fibrosis	III-46
v.	Los marcadores de fibrosis variaron considerablemente	III-46
	Discusión	III-50
	IV. Conclusiones finales	
	Conclusiones finales	IV-1
	V. Perspectivas	
	Perspectivas.....	V-1
	VI. Referencias	
	Referencias	VI-1

Índice de figuras

Figura 1. Genoma viral, poliproteína y procesamiento.	I-2
Figura 2. Esquema del virión de CVB.	I-4
Figura 3. Célula polarizada y tipos de uniones.	I-5
Figura 4. Receptores.....	I-6
Figura 5. Ingreso viral en células polarizadas.	I-7
Figura 6. Ingreso viral en células no polarizadas.	I-8
Figura 7. Replicación del genoma viral.	I-10
Figura 8. Mecanismo de replicación.	I-11
Figura 9. Formación de los viriones.	I-13
Figura 10. Etapas de la infección.	I-17
Figura 11. Etapas de la miocarditis viral.	I-19
Figura 12. Cascada de señalización de la inmunidad innata contra virus a RNA.	I-22
Figura 13. Vías de activación de macrófagos.	I-25
Figura 14. Mecanismo de depleción.....	I-28
Figura 14. Dominios de Galectina-3.	I-31
Figura 15. Esquema plásmidos.	II-2
Figura 16. MiniPreps de plásmidos pBSKSH3 y pMKS1-eGFP.	II-3
Figura 17. Digestión plásmidos pBSKSH3 y pMKS1-eGFP.	II-4
Figura 18. Transcripción <i>in vitro</i> de pBSKSH3 y pMKS1-eGFP.....	II-5
Figura 19. Efecto citopático en células transfectadas con RNA de pBSKSH3.	II-6
Figura 20. Microscopía de fluorescencia de las células transformadas con CVB3-eGFP.	II-7
Figura 21. Marcadores de células madre.	III-3
Figura 22. Marcadores de cuerpos embrionarios.....	III-4
Figura 23. Expresión de los receptores virales en hESC y hESC-CM.....	III-5
Figura 24. Infección por CVB3 en hESC y hESC-CM.	III-6
Figura 25. CPE y título viral en hESC y hESC-CM infectadas con CVB3.....	III-7
Figura 26. Viabilidad celular de las hESC y hESC-CM con la infección.	III-8
Figura 28. Aislamiento de cardiomiocitos de ratón recién nacido.	III-9
Figura 29. Pasos de la restitución de calcio hasta llegar al medio de crecimiento DMEM. ...	III-10
Figura 30. Niveles del receptor entre cardiomiocitos de ratón recién nacido y adulto.	III-11
Figura 31. Infección por CVB3 en cardiomiocitos de ratón recién nacido y adulto.	III-12

Figura 32. Susceptibilidad a la infección de cardiomiocitos de ratón recién nacido y adulto.	III-13
Figura 33. Título viral en las dos cepas de ratones a 3 dpi.	III-14
Figura 34. Daño tisular en C3H/HeJ y C57BL/6.....	III-15
Figura 35. Niveles de CAR en ratones de las cepas C3H/HeJ y C57BL/6	III-16
Figura 36. Titulación viral y PCR de J774.1.	III-21
Figura 37. Relación entre los niveles de iNOS, IFN- β y CVB3 en J774.1.....	III-22
Figura 38. Activación de macrófagos.....	III-23
Figura 39. Susceptibilidad a la infección viral en macrófagos activados.....	III-24
Figura 40. Niveles de IFN- β	III-24
Figura 41. Aumento en los niveles de Gal-3.	III-26
Figura 42. Citometría de flujo de muestras de bazo de los ratones deplecionados.	III-34
Figura 43. Esquema de depleciones modelo agudo.	III-34
Figura 44. La depleción de macrófagos aumenta los títulos virales.	III-35
Figura 45. La depleción de macrófagos disminuye el daño tisular	III-36
Figura 46. Macrófagos e infiltrado inflamatorio.....	III-37
Figura 47. IHQ de Gal-3 e iNOS a 7 dpi.	III-38
Figura 48. Niveles de mRNA de iNOS, Gal-3 y Arginasa I en la infección aguda.	III-39
Figura 49. Título viral en C57BL/6 Gal-3 KO.....	III-40
Figura 50. TCID50 en C3H/HeJ con o sin Gal-3i.	III-41
Figura 51. HE de de animales control, infectados o infectados con Gal-3i.....	III-41
Figura 52. Esquema de depleción.....	III-43
Figura 53. Análisis de la persistencia viral en corazón.....	III-43
Figura 54. Tinción tricrómica de Masson de tejidos de animales sacrificados a 30 dpi.....	III-45
Figura 55. Tinción de PricoSirius Red de tejidos de animales sacrificados a 30 dpi.....	III-46
Figura 56. IHQ de α SMA de animales a 30 dpi con o sin depleción de macrófagos.	III-47
Figura 57. IHQ de Gal-3 de animales a 30 dpi con o sin depleción de macrófagos.....	III-48
Figura 58. qPCR de marcadores de fibrosis.	III-49

Índice de tablas

Tabla 1. Vías de activación de macrófagos y citoquinas asociadas.....	I-26
Tabla 2. Secuencia primers utilizados para PCR.....	II-14
Tabla 3. Secuencia primers utilizados para qPCR.....	II-15

Abreviaturas

AAMΦ: macrófagos alternativamente activados (M2)

aas: aminoácidos

ABAC: Asociación Banco Argentino de Células

BSA: seroalbúmina bovina (del inglés *bovine serum albumin*)

CAMΦ: macrófagos clásicamente activados (M1)

CAR: receptor de Coxsackie y Adenovirus

cel: células

cDNA: DNA complementario

CMD: cardiomiopatía dilatada

cpe: efecto citopático (del inglés *cytopathic effect*)

CRD: dominio de reconocimiento de carbohidratos (del inglés *carbohydrate recognition domain*)

Cre: elemento de replicación en *cis* (del inglés *cis-acting replication element*)

CV: Virus Coxsackie

CVA: virus Coxsackie A

CVB: virus Coxsackie B

CVB3: virus Coxsackie B serotipo 3

CVB6: virus Coxsackie B serotipo 6

DAF: factor acelerador de decaimiento (del inglés, *decay accelerating factor*)

DAMPs: patrones moleculares asociados al peligro (del inglés *danger associated molecular patterns*)

DCs: células dendríticas (del inglés *dendritic cells*)

DNA: ácido desoxirribonucleico

EB: cuerpos embrionarios (del inglés *embryonic body*)

EMCV: virus de la encefalomiocarditis (del inglés *encephalomyocarditis virus*)

Gal-3: galectina 3

HE: hematoxilina eosina

hESC: células madre embrionarias humanas (del inglés *human embryonic stem cells*)

hESC-CM: cardiomiocitos derivados de las hESC

Hs: horas

IF: inmunofluorescencia

IFN: interferón

IFN-I: interferón de tipo uno

IFN-I β : interferón β

IHQ: inmunohistoquímica

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible (del inglés, *inducible nitric oxide synthase*)

IP: intraperitoneal

IRES: sitio interno de entrada del ribosoma (del inglés, *internal ribosome entry site*)

IRF3: factor transcripcional de regulación a interferón 3 (del inglés, *interferón regulatory transcription factor 3*)

ISGs: genes estimulados por IFN (del inglés, *interferon stimulated genes*).

KO: *knock out*

LipClod: liposomas con clodronato

LPS: lipopolisacárido

MEC: matriz extracelular

MEF: fibroblastos embrionarios murinos (del inglés *murine embryonic fibroblasts*)

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, *major histocompatibility complex*)

min: minutos

MMP-9: metaloproteasa de matriz 9 (del inglés, *matrix metalloproteinase 9*)

MOI: multiplicidad de infección (del inglés *multiplicity of infection*)

mRNA: RNA mensajero

MV: miocarditis viral

NCR: región no codificante (del inglés, *non coding region*)

NO: óxido nítrico (del inglés *nitric oxide*)

Células NK: células *natural killer*

ON: toda la noche (del inglés *over night*)

PABP: proteína celular de unión a poli(A) (del inglés *poly(A) binding protein*)

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés *pathogen-associated molecular patterns*)

PBS: buffer fosfato salino (del inglés *phosphate buffer saline*)

PBST: PBS Tween 0,1% (v/v)

PCBP: proteína celular que une polirC (del inglés *polyrC binding protein*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PFU: unidades formadoras de placa (del inglés, *plaque forming units*)

pi: post infección

PMA: Phorbol-12-myristate-13-acetate

PPRs: receptores asociados a reconocimiento de patrones (del inglés *pattern recognition receptors*)

qPCR: PCR cuantitativa (en tiempo real)

RNA: ácido ribonucleico

rpm: revoluciones por minuto

RT: transcripción reversa (del inglés, *reverse transcription*)

SCR: secuencias cortas de repeticiones consenso (del inglés *short consensus repeats*)

seg: segundos

SNC: sistema nervioso central

TA: temperatura ambiente

TGF- β : factor de crecimiento de tejidos β (del inglés, *tissue growth factor β*)

TIMPs: inhibidor de metaloproteasas de matriz (del inglés *tissue inhibitors of metalloproteinases*)

TLRs: receptores tipo Toll (del inglés *Toll like receptors*)

VPg: proteína viral unida al genoma (del inglés, *viral protein genome linked*)

VRCs: complejos de replicación viral (del inglés *viral replication complexes*)

WB: *western blot*



I. Introducción

A. Introducción

1. Introducción general

Virus coxsackie

Los virus coxsackie (CV) pertenecen al género *Enterovirus*, familia *Picornaviridae* (Stanway et al. 2005). El género *Enterovirus* comprende a un gran número de virus de distribución mundial que utilizan el tracto entérico como sitio primario de replicación, y por lo tanto, se transmiten por la vía fecal-oral. La mayoría de las infecciones por enterovirus son subclínicas, pero en ocasiones provocan graves enfermedades, principalmente en niños e inmunocomprometidos. Los Enterovirus son la causa más común de meningitis aséptica, la infección más frecuente del sistema nervioso central (SNC). En general, los enterovirus se asocian a enfermedades agudas pero también se han asociado a enfermedades crónicas, entre las que se pueden incluir a la dermatomiositis, poliomiocitis, cardiomiopatía dilatada (CMD) y la diabetes mellitus [revisado en (Pallansch et al. 2001)].

Los primeros aislamientos de CV fueron realizados en 1948 en dos personas que sufrían parálisis en la ciudad de Coxsackie, en el estado de Nueva York (Dalldorf et al. 1948). Esos aislamientos no fueron neutralizados con suero anti poliovirus y fueron la primera evidencia de la existencia de otros enterovirus humanos. Los CV son altamente patogénicos al ser inyectados en ratones recién nacidos (Gifford et al. 1951) y acorde al fenotipo que exhiben se han clasificado en tipos A y B ya sea porque producen inflamación y necrosis difusa en músculo esquelético (CVA) o miositis focalizada y lesiones necróticas en el encéfalo, páncreas, grasa parda y miocardio (CVB). A su vez, los CVB incluyen los serotipos del 1 al 6 (Pallansch et al. 2001). Con excepción de CVB6, todos los serotipos de CVB se han asociado a enfermedades similares (Pallansch et al. 2001). Actualmente, los CV se hallan incluidos dentro de dos diferentes especies, los enterovirus humanos A y B, dentro de los cuales se hallan los CVA y B, respectivamente (Mahy 2007).

En 1958, se descubrieron CVB causantes de miocarditis epidémica en niños recién nacidos en Sudáfrica (Gear et al. 1958), demostrando que estos virus tenían una distribución mundial. Hasta el presente, no existe un tratamiento específico para las infecciones con CVB (Brunetti et al. 2008) y solo puede realizarse cierta prevención con medidas de higiene básicas, ya que estos virus son altamente contagiosos.

proteolítica de dos cisteína proteasas codificadas por el virus, 2A (Toyoda et al. 1986) y 3C (Hanecak et al. 1982), para clivar la poliproteína, resultando en la liberación de las proteínas virales (Lawson et al. 1990). La compleja cascada de eventos proteolíticos llevados a cabo por las proteasas virales permite regular la expresión de otros productos génicos virales. La proteasa 2A media el clivaje del precursor de P1 (1ABCD, Figura 1) de la poliproteína naciente de forma intramolecular (en *cis*). A continuación, la proteasa 3C cliva el precursor de la proteína de la cápside VP1 del precursor P1 (Figura 1) (Nicklin et al. 1988). El clivaje de VP0 a VP4 y VP2 es dependiente de la presencia del RNA viral y sólo ocurre en los virus maduros.

Los CVB son virus no envueltos con una cápside de 30 nm de diámetro que rodea el RNA. La cápside posee simetría icosaédrica, y está formada por 60 copias de cada una de las cuatro proteínas virales, VP1 a VP4. VP1, VP2 y VP3 se pliegan en 8 estructuras β antiparalelas formando la superficie externa del virus, mientras que VP4 se ubica en el interior de la cápside (Figura 2). Las mayores diferencias entre las estructuras de distintos picornavirus se encuentran en las regiones más y menos expuestas a la superficie de los viriones, que definen los principales sitios antigénicos y los sitios de unión a receptores, respectivamente (Hendry et al. 1999).

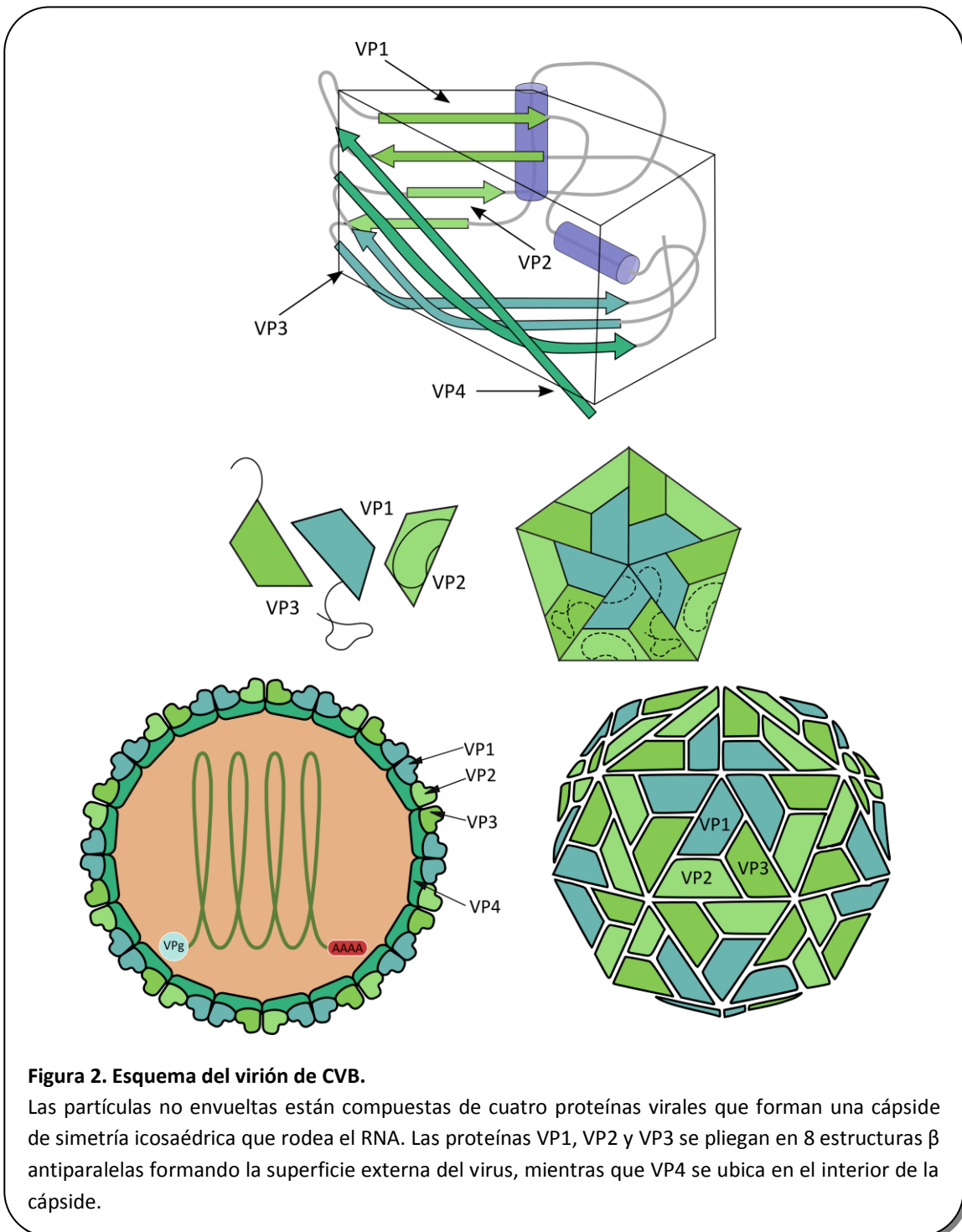


Figura 2. Esquema del virión de CVB.

Las partículas no envueltas están compuestas de cuatro proteínas virales que forman una cápside de simetría icosaédrica que rodea el RNA. Las proteínas VP1, VP2 y VP3 se pliegan en 8 estructuras β antiparalelas formando la superficie externa del virus, mientras que VP4 se ubica en el interior de la cápside.

El ciclo de replicación de los CVB se puede dividir en los siguientes pasos: a) unión a receptor, b) internalización, c) traducción y transcripción del RNA viral, d) ensamblado de partículas virales y e) lisis celular y liberación de las partículas virales (Pallansch et al. 2001). Los receptores celulares son determinantes importantes de la susceptibilidad a la infección y del rango de especies del huésped (Fields 2001).

Receptores de CVB

Para la infección por CVB, se encuentran descritos dos receptores: CAR (del inglés, *coxsackie adenovirus receptor*) (Bergelson et al. 1997) y DAF (del inglés, *decay accelerating factor*) o CD-55 (Bergelson et al. 1995; Shafren et al. 1995).

CAR es una proteína de membrana, de 46 kDa que se halla ampliamente distribuida en diversos tejidos asociada a las uniones estrechas. Se ha demostrado que CAR colocaliza con proteínas de las uniones estrechas, como ocludina y ZO-1 (Raschperger et al. 2006), siendo esta última inmunoprecipitada junto a CAR (Cohen et al. 2001; Freimuth et al. 2008) (Figura 3). En el corazón CAR se detecta principalmente a nivel de los discos intercalares (Selinka et al. 2004) y aunque no está bien definida su función celular, podría tener un rol de señalización en la célula cardíaca (Lim et al. 2008). En lo que

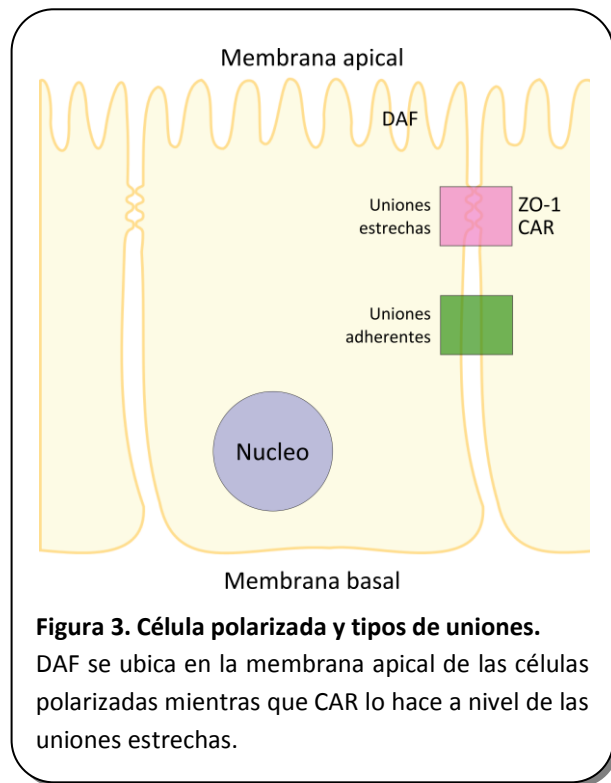
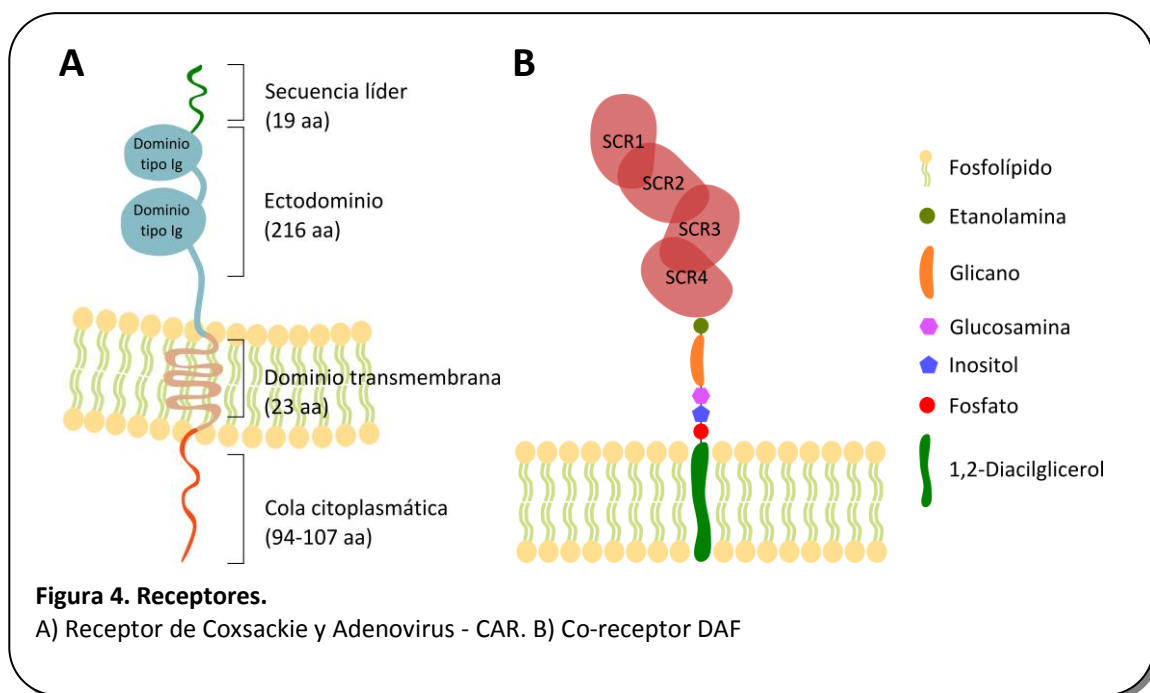


Figura 3. Célula polarizada y tipos de uniones. DAF se ubica en la membrana apical de las células polarizadas mientras que CAR lo hace a nivel de las uniones estrechas.

respecta a su función como receptor viral, esta proteína es utilizada por varios adenovirus y por todos los CVB (Freimuth et al. 2008).

El mRNA de CAR codifica para 365 aminoácidos (aas) constituidos por una pequeña secuencia líder de 19 aas, un ectodominio de 216 aas, un dominio transmembrana de 23 aas, y dependiendo del *splicing* alternativo, una cola citoplasmática de 107 o 94 aas (Figura 4A). Por lo tanto, se han identificado al menos dos proteínas CAR que difieren en el extremo carboxilo y se las refiere como mCAR1 y mCAR2 para el ratón o hCAR1 y hCAR2 para el humano (Freimuth et al. 2008). El análisis de secuencia de CAR predijo que esta proteína es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), con dos dominios extracelulares del tipo Ig localizados en la mitad amino terminal de la proteína, una hélice simple que atraviesa la membrana y una cola citoplasmática carboxilo terminal (Bergelson et al. 1997; Freimuth et al. 2007) (Figura 4A).

El otro receptor es DAF, una proteína reguladora del Complemento anclada a membrana por glicofosfatidilinositol (Figura 4B). Se trata de una glicoproteína de 70 kDa con cuatro dominios cortos de repeticiones consenso o SCR (del inglés *short consensus repeats*), típicos de las proteínas regulatorias del Complemento (Bergelson et al. 1995). Se localiza en la superficie de la mayoría de las células a fin de protegerlas de la activación inespecífica tanto de la vía clásica como de la alternativa del Complemento (Miwa et al. 2007) (Figura 3). Esta molécula es usada como co-receptor por algunas variantes de CVB (Shafren et al. 1995) y también por los Echovirus (Racaniello 2001) aunque difiere en el modo de unirse al receptor (Hafenstein et al. 2007). Si bien se ha encontrado alta homología en la secuencia y función de CAR humano y murino, en el caso de DAF parece ser distinto ya que no presentan alta homología en la secuencia y se ha descrito que aquellos virus que presentan afinidad por DAF humano no hacen por el homólogo Daf-1 murino (Spiller et al. 2000).



Ingreso viral

Los 6 serotipos de CVB se unen a CAR para ingresar a las células e infectarlas, mientras que algunos CVB también se unen a DAF; sin embargo esta interacción por sí sola no es suficiente para la internalización del virus. El mecanismo de internalización del virus dentro de las células blanco depende del tipo celular (Coyne et al. 2006; Patel et al. 2009).

Como los CVB ingresan por el tubo digestivo, deben cruzar la mucosa intestinal para iniciar una infección productiva. En las células polarizadas del epitelio intestinal, CAR se haya inmobilizado a nivel de las uniones estrechas (Cohen et al. 2001) (Figura 3), por lo que el mecanismo de ingreso requiere la interacción con el co-receptor DAF, formando *clusters* que pueden ser detectados a los 10 min posinfección (pi). Esta interacción activa una cascada de señalización del tipo tirosina quinasa que permite la translocación del cluster CVB-DAF a las uniones estrechas. Estos *clusters* de DAF pueden ser inducidos por al agregado de un anticuerpo, y sea cual fuere el motivo del *clustering*, este complejo se traslada a las uniones estrechas con participación de los *lipid rafts*, donde colocaliza con CAR y ZO-1. La interacción del virus con CAR conduce a la internalización viral mediada por vesículas formadas por caveolina-1. Una vez que el virus ha ingresado a la célula comienza el desnudamiento o *uncoating* que resulta en la liberación del virus al citoplasma (Figura 5) (Coyne et al. 2006).

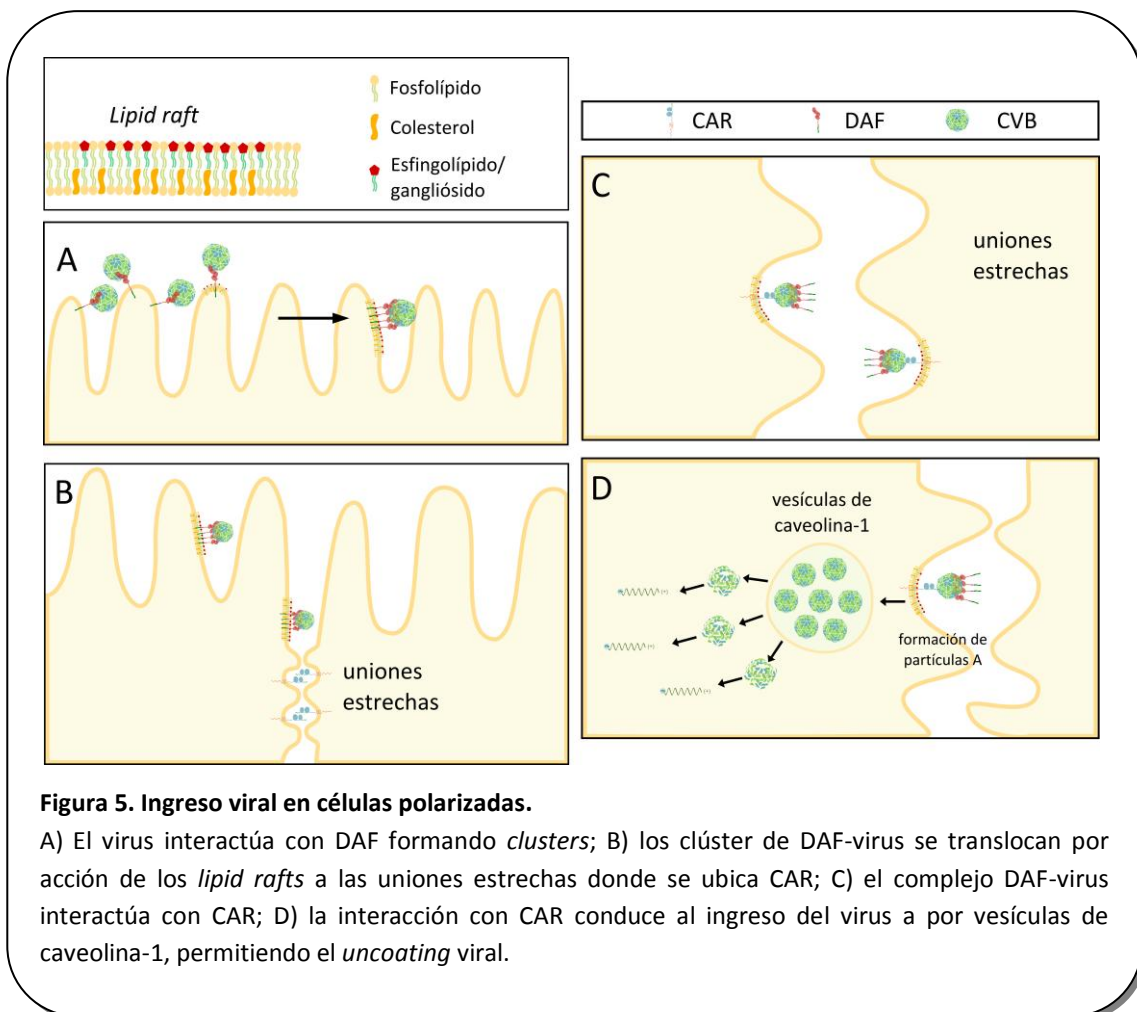
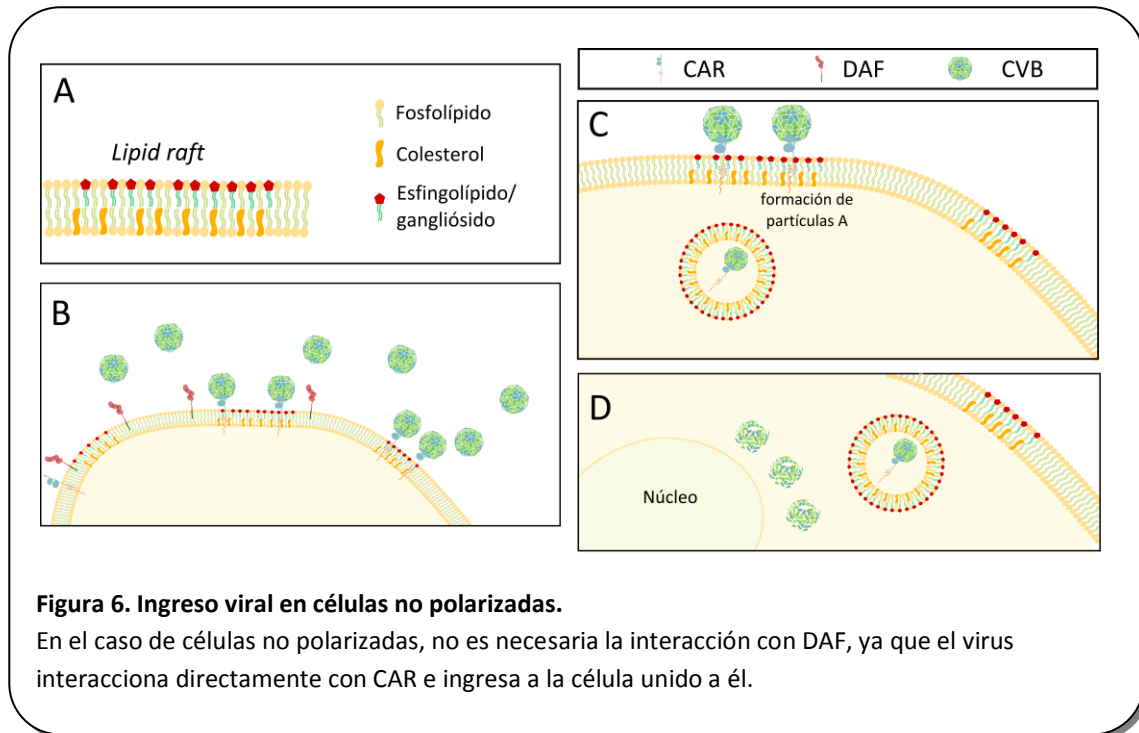


Figura 5. Ingreso viral en células polarizadas.

A) El virus interactúa con DAF formando *clusters*; B) los *clusters* de DAF-virus se translocan por acción de los *lipid rafts* a las uniones estrechas donde se ubica CAR; C) el complejo DAF-virus interactúa con CAR; D) la interacción con CAR conduce al ingreso del virus a por vesículas de caveolina-1, permitiendo el *uncoating* viral.

En el caso del ingreso a células no polarizadas, como las células HeLa, se encontró que todos los CVB (independientemente de si son o no capaces de unir DAF) utilizan un mecanismo mediado por dinamina y *lipid rafts*, ingresando a las células unidos a CAR (Patel et al. 2009) (Figura 6).



Sin importar cual sea el mecanismo de ingreso, la interacción del virus con CAR conduce a la formación de las partículas A, un estadio del virus incapaz de iniciar una nueva infección viral. Las partículas A contienen el RNA viral pero han perdido la proteína de la cápside VP4. A su vez, el extremo N terminal de VP1, que normalmente se ubica en el interior de la cápside, se expone en la superficie de la partícula A (Fricks et al. 1990). Debido a que esta secuencia es hidrofóbica, las partículas A tienen una afinidad aumentada a las membranas comparadas con la partícula viral nativa y permitirían la interacción con la membrana celular y la formación de un poro a través del cual se liberaría el RNA viral (Pallansch et al. 2001).

Ciclo de infección

La traducción del RNA viral se realiza por un mecanismo independiente del 5'CAP característico de los mRNAs eucariotas y que es reconocido por el complejo de iniciación eIF4F (Jang et al. 1988; Pelletier et al. 1988). Los picornavirus poseen una secuencia 5'NCR (del inglés *non coding region*) compuesta por una extensa estructura secundaria y múltiples codones de

iniciación, que permite la entrada al ribosoma y la traducción independiente de eIF4F (Sean et al. 2008). Más aún, la proteasa viral 2A cliva el factor eIF4G, que forma parte del complejo eIF4F, inhibiendo la traducción dependiente del 5'CAP e impidiendo la traducción del mRNA celular (Duncan et al. 1983; Krausslich et al. 1987). También se ha visto que VPg es clivada luego del ingreso del RNA viral y previo a su traducción. Este cambio en la traducción proteica ocurre en las primeras 2 hs de la infección; sin embargo, en tiempos posteriores como 5 hs pi la traducción de proteínas virales también es inhibida (Bonderoff et al. 2008).

La traducción procede en dirección 5' a 3', mientras que la replicación de la hebra negativa ocurre en dirección 3' a 5', siendo imposible que ambos procesos ocurran simultáneamente. Más aún, la traducción domina sobre la replicación ya que la interacción con el ribosoma evita que la RpRd avance (Bonderoff et al. 2008). Por lo tanto, la traducción viral deberá detenerse antes de que comience la replicación del RNA viral. La replicación del RNA de los CVB ocurre rápidamente, comenzando aproximadamente 2,5 hs después de la infección. Los mecanismos de replicación del RNA de los enterovirus, están altamente conservados.

Estos procesos requieren dos pasos de amplificación del RNA: (i) síntesis completa de la hebra negativa [RNA (-)] complementaria a partir del RNA parental genómico y (ii) síntesis de la hebra positiva del RNA [RNA (+)] usando el intermediario de RNA (-) como molde, que luego puede ser utilizado para la traducción independiente del 5'CAP o para ser empaquetada en viriones para las infecciones subsecuentes. A su vez, esta hebra hija puede ser utilizada en rondas adicionales de síntesis de la hebra negativa. La replicación correcta requiere de todas las proteínas virales en sus formas maduras y precursoras, así como de las estructuras secundarias en el RNA (Sean et al. 2008) (Figura 7).

Para la replicación, las proteínas virales reclutan el RNA (+), lo que requiere del ensamblaje de complejos de replicación viral o VRCs (del inglés *viral replication complexes*) (Bolten et al. 1998). Cada VRC produce primero una hebra de RNA (-) complementaria usando el RNA (+) original como molde. El RNA (-) es luego utilizado por la RdRp para sintetizar nuevas moléculas de RNA (+) que atraviesan nuevas rondas de traducción y replicación para formar nuevas partículas virales (Nagy et al. 2012). Se ha demostrado que la proteína 3AB de poliovirus interacciona tanto con las vesículas membranosas como con las proteínas virales involucradas en la replicación del RNA, por lo que 3AB podría ser potencialmente responsable de reclutar el complejo de replicación a la superficie de las vesículas membranosas (Semler et al. 1982;

Towner et al. 1996; Hope et al. 1997). Un rol potencial de 3AB en el reclutamiento del complejo de replicación podría involucrar a 3CD ya que se ha visto que 3CD interactúa tanto con 3AB como con ambos extremos de la hebra positiva del RNA de poliovirus (Harris et al. 1994; Xiang et al. 1998). La proteína 2C también interactúa con las vesículas membranosas y la hebra negativa del RNA de poliovirus, por lo que 2C podría actuar como una proteína de anclaje del RNA en la superficie de las vesículas membranosas (Echeverri et al. 1995; Banerjee et al. 1997).

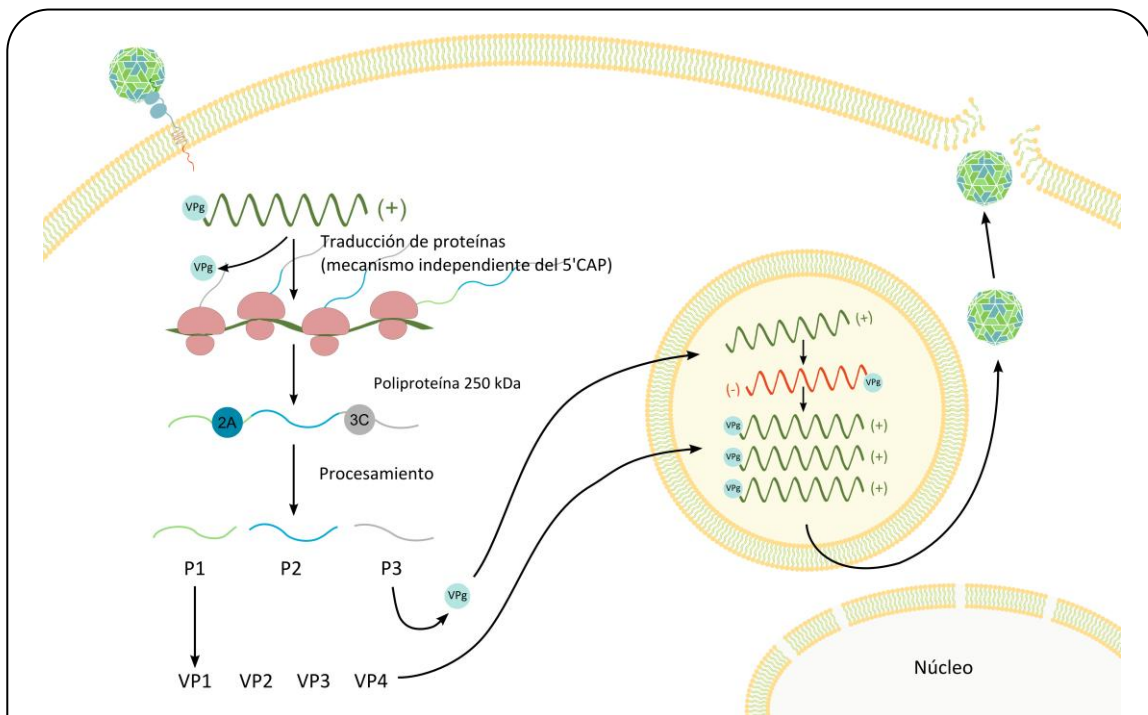


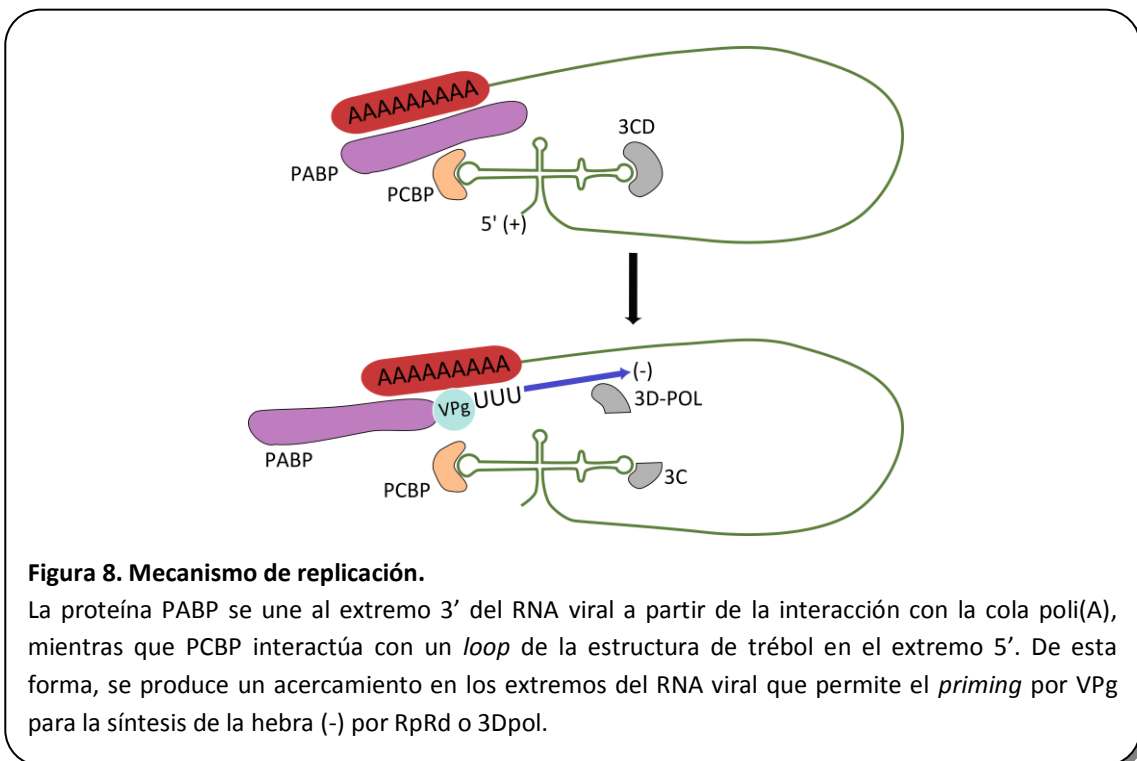
Figura 7. Replicación del genoma viral.

La replicación del genoma viral requiere la finalización de la síntesis de todas las proteínas virales. Luego, el RNA (+) asociado a vesículas se replica sintetizando la copia (-), que luego servirá de molde para más hebras (+).

El requerimiento de un *primer* en la iniciación de la síntesis de ácidos nucleicos varía entre las diferentes clases de polimerasas. La RpRd es una RNA polimerasa *primer* dependiente incapaz de copiar RNA *in vitro* en ausencia de un *primer* oligo(U). El RNA de los poliovirus, tanto la hebra positiva como la negativa recién sintetizadas están unidas covalentemente en su extremo 5' a la proteína VPg de 22 aas, sugiriendo que VPg podría funcionar como un *primer* para la síntesis de RNA. Esta hipótesis fue confirmada por el descubrimiento en células infectadas de una forma uridilizada de esta proteína: VPg-pUpU. VPg puede ser uridilizada *in vitro* por RpRd pudiendo luego servir de *primer* para la síntesis de RNA poliadenilado. El molde

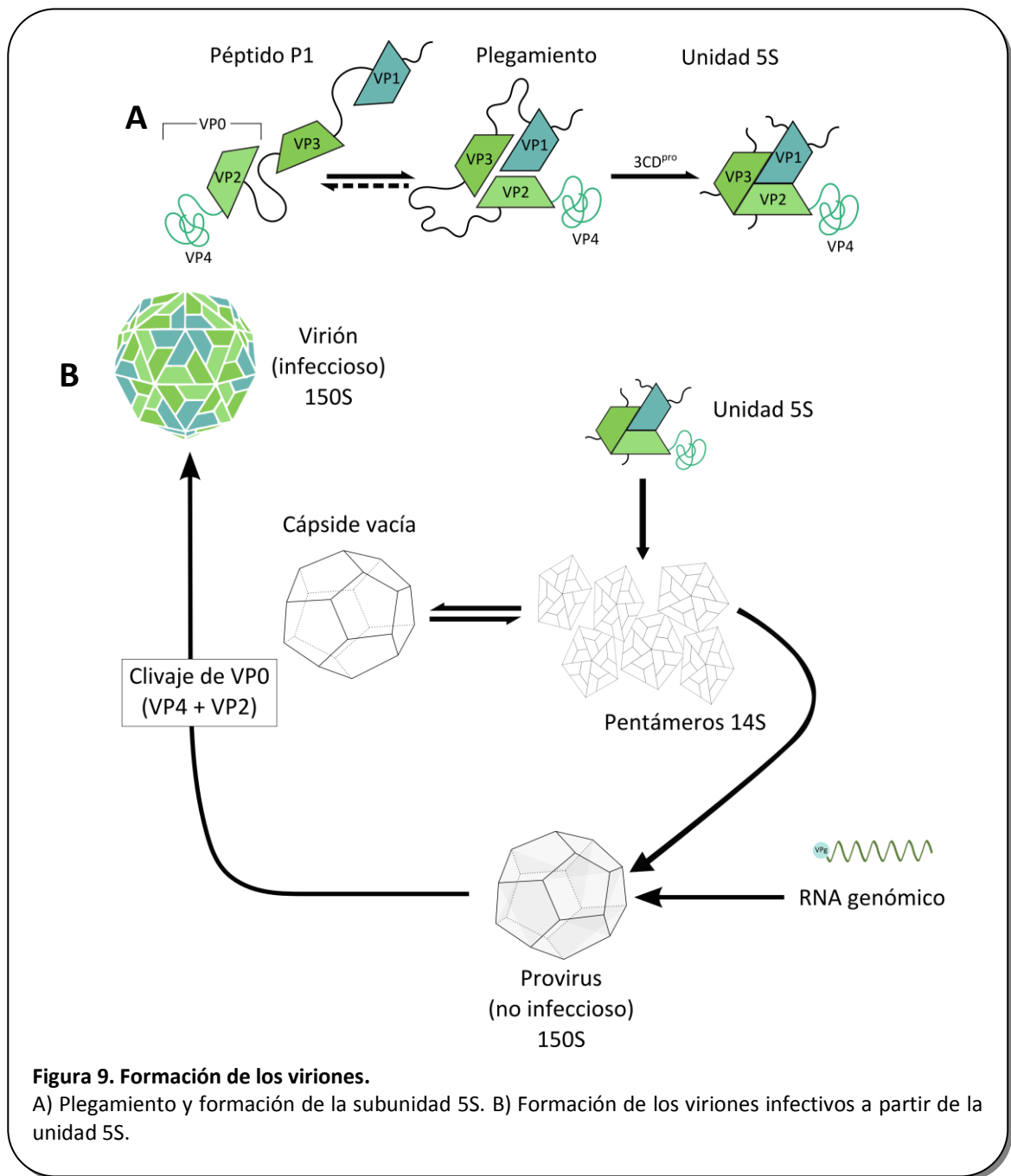
para la uridilación de VPg es un bucle de RNA, denominado elemento de replicación en *cis* o *cre* (del inglés *cis-acting replication element*). VPg-pUpU serviría también de *primer* en células no infectadas (Flint et al. 2000).

Las proteínas virales involucradas en la replicación pueden unirse selectivamente al RNA viral; sin embargo, hay también varias proteínas celulares involucradas en este proceso. Entre ellas, la proteína celular PCBP (del inglés, *polyC binding protein*) ocupa un rol central al reclutar el RNA viral. PCBP es una proteína de unión a RNA involucrada en la estabilización del mRNA y en la regulación de la transcripción y traducción, y es capaz de unirse a la estructura tipo trébol o IRES (del inglés, *internal ribosome entry site*) ubicado en el extremo 5' del RNA viral. 3CD cliva a PCBP haciéndole perder uno de sus tres sitios de unión al RNA. Los dos sitios remanentes permiten que se una junto a la proteína viral VPg a distintos bucles (*loops*) de la estructura de trébol que acerca el extremo 5' al 3', permitiendo el *priming* por VPg (Flint et al. 2000; Nagy et al. 2012) (Figura 8). Este acercamiento requiere también de la interacción de PCBP con la proteína celular de unión a poli(A), PABP (del inglés *polyA binding protein*).



Un mecanismo posible para la producción de unidades estructurales es el ensamblaje mientras las proteínas están unidas covalentemente a un precursor poliprotéico. Este mecanismo supera la necesidad de que las subunidades proteicas individuales se encuentren por difusión

al azar, y evita la competencia por interacciones no específicas. Para el caso de los enterovirus, la poliproteína contiene las cuatro proteínas que forman la unidad estructural heteromérica (Figura 2). Estas proteínas son sintetizadas como parte de un único precursor poliprotéico. Las uniones covalentes flexibles entre VP1, VP3 y VP0, en el precursor P1 permiten la formación de la unidad estructural 5S y luego, estos enlaces son clivados por la proteasa viral 3CD. Sin embargo, VP4 se mantiene unida a VP2 en VP0 hasta que el ensamblaje está completo (Basavappa et al. 1994; Paloheimo et al. 2011; Nagy et al. 2012) (Figura 9A). La unidad estructural 5S es el precursor del pentámero 14S, que es luego incorporado en las partículas virales. El pentámero es estabilizado por extensos contactos proteína-proteína y por interacciones mediadas por cadenas lipídicas presentes en los 5 extremos de VP0. Esta estructura es altamente estable, haciendo de la formación del pentámero un paso irreversible (Flint et al. 2000). Finalmente, la incorporación del RNA viral dentro de la cápside y el posterior clivaje de VP0 en VP4 y VP2 da origen a los viriones infecciosos 150S (Figura 9B) (Basavappa et al. 1994; Paloheimo et al. 2011).



El desenlace más usual en células permisivas de la replicación viral es la muerte y destrucción celular. En las infecciones naturales, las defensas del huésped son una causa importante de la destrucción de la célula infectada. Sin embargo, las infecciones de estos virus destruyen las células de una manera más directa: estos virus son citopáticos para células en cultivo. El mecanismo por el cual la replicación de virus no envueltos conduce a la muerte y lisis celular se asocia a la degradación de componentes estructurales de la célula huésped (Flint et al. 2000).

2. Enfermedades y patologías asociadas

Como ya se ha mencionado, la mayoría de las veces los CVB causan infecciones subclínicas. Sin embargo, los CVB son conocidos desde hace más de 50 años como agentes causantes de diversas enfermedades humanas (Dalldorf 1955). De estas, varias se consideran clínicamente leves como la meningitis aséptica, pero otras, como la miocarditis y pancreatitis pueden ser enfermedades de mayor gravedad. Existe también una relación etiológica putativa entre CVB y la diabetes humana tipo 1 (T1D), que recientemente ha encontrado apoyo en evidencia experimental de modelos murinos (Tracy et al. 2008).

3. Miocarditis y cardiomiopatía dilatada

La miocarditis puede tener diversas causas, sobresaliendo las infecciosas y las autoinmunes. Entre las primeras, en nuestro país se asocia a infección por *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas) y a diversas infecciones virales, principalmente por los CVB (Perrone et al. 2003). La miocarditis es una inflamación del miocardio, generalmente autolimitada. Sin embargo, a veces, la inflamación persiste produciéndose una miocarditis crónica que, a su vez, puede conducir a la CMD, entidad caracterizada por un corazón dilatado donde puede no observarse inflamación, pero sí insuficiencia cardíaca y una significativa remodelación de la matriz extracelular (MEC) (Kawai 1999; Saffitz 1999; Perrone et al. 2003; Pauschinger et al. 2004). La CMD tiene una gran prevalencia ya que ocurre en dos de cada cien personas y, aunque con mayor frecuencia es idiopática o de causa desconocida, puede asociarse a enfermedades o circunstancias previas incluyendo alteraciones metabólicas, toxicológicas, nutricionales, y autoinmunes, embarazo, consumo de alcohol o miocarditis (Follath 1999). La CMD es la principal razón de trasplante cardíaco en EEUU y Europa (Manolio et al. 1992).

Los CVB pueden causar miocarditis viral (MV) (Pallansch et al. 2001). La MV puede presentarse clínicamente como una disfunción aguda de miocardio de diversa severidad que puede evolucionar a CMD, en especial en su estadio crónico (Feldman et al. 2000; Yajima et al. 2009). Sugerida inicialmente en base a datos serológicos, la conexión entre MV y CMD ha sido difícil de establecer ya que con la excepción de algunos casos pediátricos, ha sido imposible detectar virus infectivo en muestras de tejido cardíaco de necropsias o biopsias. Sin embargo, con los procedimientos moleculares actuales, se han podido detectar RNA virales en muestras de tejido cardíaco de pacientes con MV o CMD (Feldman et al. 2000; Ellis et al. 2007). Actualmente, se acepta que los virus pueden infectar el corazón y que CVB es uno de los virus

más frecuentes (Feldman et al. 2000). No existe todavía un tratamiento específico para la MV (Feldman et al. 2000).

La CMD parecería ocurrir como resultado de una MV aguda o crónica (Noren et al. 1977; Woodruff 1980; O'Connell 1987; Chow et al. 1992; Dec et al. 1994). En el caso agudo sería por pérdida directa de miocitos y en la crónica tanto por la persistencia del virus (Chow et al. 1992; Yajima 2011) como por fenómenos autoinmunes que ocurrirían luego de la exposición al virus (Huber 1997). Los principales virus que han sido asociados etiológicamente a MV y CMD son los enterovirus y, en menor medida, los adenovirus humanos. Distintos estudios han demostrado la persistencia del RNA enteroviral en el miocardio de pacientes con miocarditis (Bowles et al. 1986; Kandolf et al. 1987; Bowles et al. 1989; Kandolf et al. 1991). Entre los enterovirus, el más frecuentemente asociado a estas patologías es CVB, particularmente el serotipo CVB3 (Grist et al. 1993).

La comprensión de la patogénesis de MV/CMD es escasa (Bowles et al. 1998; Maisch et al. 2005). Gran parte del conocimiento actual se basa en el estudio de modelos experimentales como el de MV murina inducida por inoculación intraperitoneal de CVB3, que produce una MV aguda que puede progresar a CMD en ciertas cepas de ratones susceptibles (Rose et al. 1996; Fairweather et al. 2007). La infección murina por CVB se caracteriza por una replicación viral temprana en páncreas que se correlaciona con la viremia, seguida de replicación y necrosis focal de cardiomiocitos con infiltración linfomonocitaria (Gomez et al. 1991; Tracy et al. 2000) y posterior remodelación de la MEC (Gomez et al. 1992). El modelo murino de MV inducida por CVB comparte muchos parámetros biológicos de la enfermedad cardíaca aguda y crónica humana y muestra que las alteraciones patológicas resultan tanto de efectos virales directos (ej. lisis celular) así como también de reacciones del huésped (ej. respuesta inmune) en los tejidos cardíacos (Gauntt et al. 2003). Más tardíamente, un evento estructural fundamental en la progresión del fallo cardíaco es la remodelación de la MEC, que incluye cambios significativos en el radio de los colágenos tipo I/III (Pauschinger et al. 1999). Los fibroblastos desempeñan un papel esencial tanto en la síntesis como en la remodelación de la MEC cardíaca, particularmente luego de su diferenciación en miofibroblastos activos (Lijnen et al. 2000; Petrov et al. 2002). En este sentido, es interesante destacar que CVB3 puede replicar en fibroblastos cardíacos sin inducir lisis y en forma persistente pero modificando la síntesis de algunas citoquinas (Heim et al. 2000). Por otra parte, en cepas de ratones que desarrollan MV crónica, se observó persistencia del RNA viral en las células infectadas aún sin la producción de

virus infeccioso (Klingel et al. 1992). Esta persistencia podría desencadenar una respuesta inmune que contribuiría a la enfermedad (Kandolf et al. 1999; Calabrese et al. 2003), ya que tanto la respuesta humoral como celular están asociadas con la progresión de la MV hacia la CMD (Furukawa et al. 2001).

4. Etapas de la infección

Etapas de la infección viral

La patogénesis viral es un proceso en el cual los virus producen enfermedad en el huésped. Mucho del conocimiento existente al momento se basa en el estudio de modelos animales de infecciones humanas. La virulencia de un virus es su capacidad, al compararlo con otros virus relacionados, de causar enfermedad en el huésped. Si la infección produce muerte en el huésped, la virulencia se suele medir en DL₅₀. La virulencia de CVB depende de una amplia variedad de factores virales y del huésped, como la cantidad de virus o su vía de ingreso, y la edad del huésped, el sexo, el estado inmunológico y la especie (Tracy et al. 2008).

Los CVB, como otros enterovirus, generalmente ingresan al cuerpo por la ruta oral e infectan células de la mucosa orofaríngea y el tejido linfoide (amígdalas) donde replican y se distribuyen en el tracto digestivo. Debido a su estabilidad a pH ácidos, estos virus pueden atravesar el intestino y establecer infecciones en la mucosa intestinal y en el tejido linfoide, desde donde es eliminado en las heces. A continuación, ocurre una viremia “menor” con invasión subsiguiente del sistema retículo endotelial. En la fase virémica primaria, el virus también ingresa al torrente sanguíneo a bajos niveles, lo que puede ocasionar una viremia “mayor” que permitiría al virus alcanzar el tejido cardíaco. Más del 95% de los individuos infectados con enterovirus controlan la infección con anterioridad a la viremia “mayor” desarrollando una infección asintomática, aún cuando la eliminación del virus por materia fecal persista por semanas (Pallansch et al. 2001). Los tejidos que serán infectados dependerán de la expresión de los receptores virales adecuados (Racaniello 2006) (Figura 10).

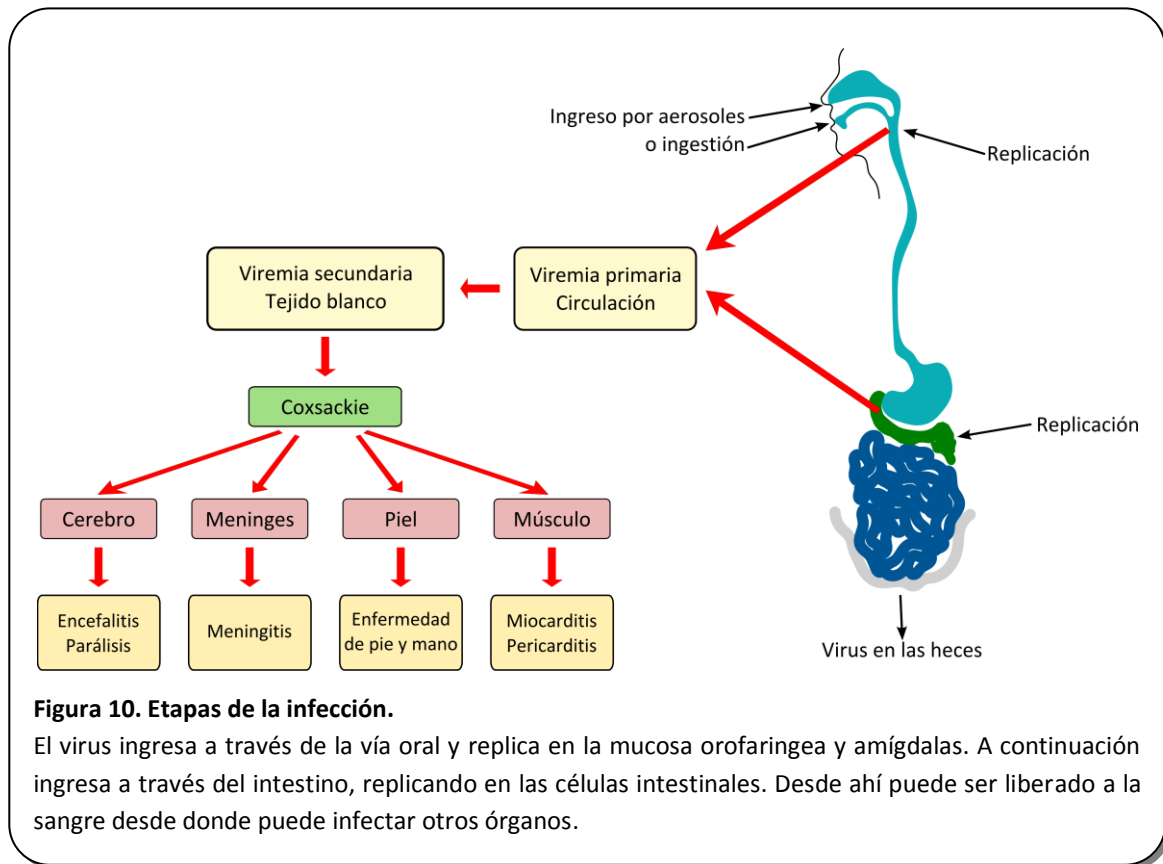


Figura 10. Etapas de la infección.

El virus ingresa a través de la vía oral y replica en la mucosa orofaríngea y amígdalas. A continuación ingresa a través del intestino, replicando en las células intestinales. Desde ahí puede ser liberado a la sangre desde donde puede infectar otros órganos.

Etapas de la miocarditis viral por CVB

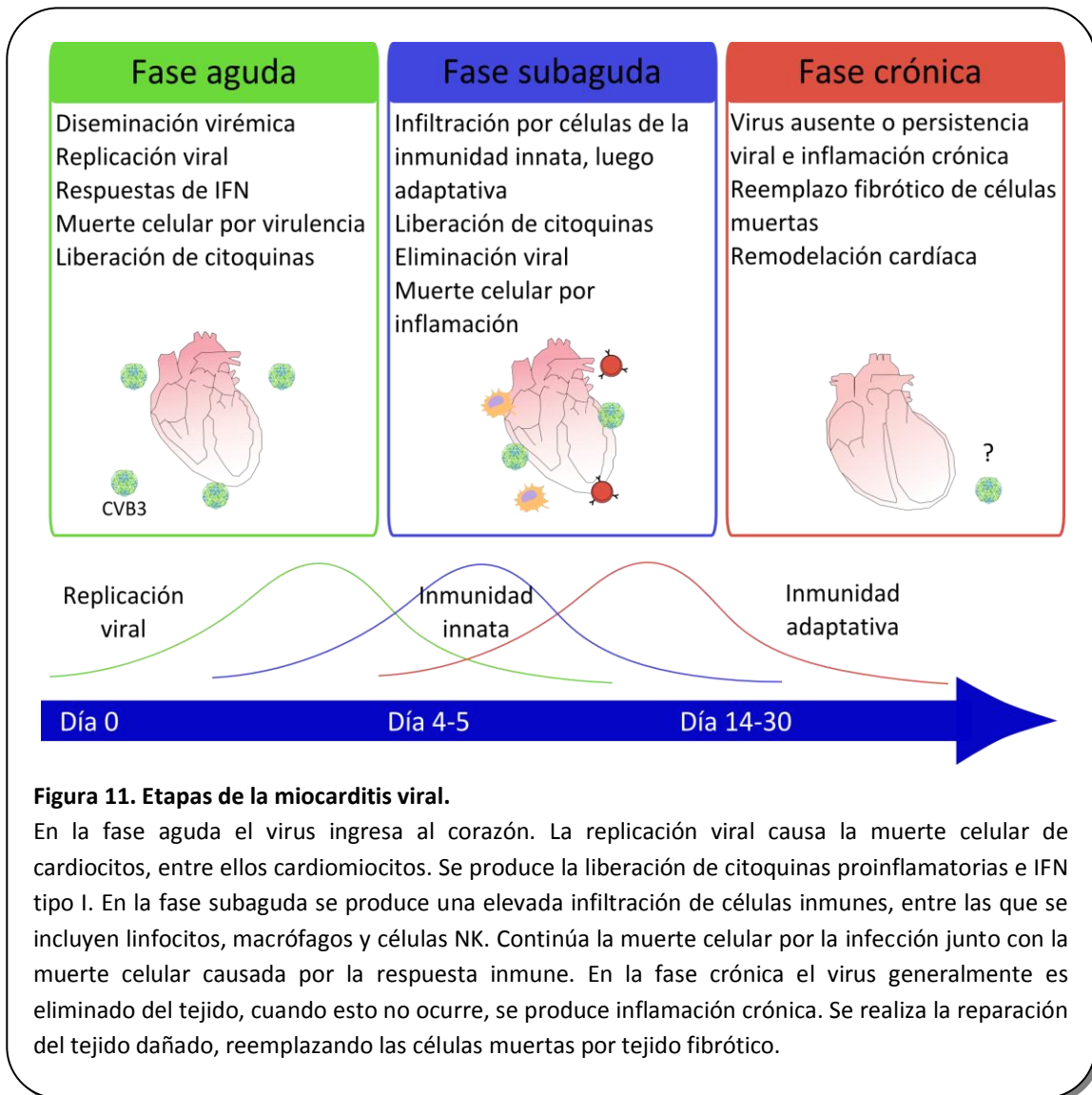
La evolución de la miocarditis viral murina puede ser dividida en tres fases: una fase virémica aguda, una fase subaguda de infiltración y un estadio crónico (Esfandiarei et al. 2008; Corsten et al. 2012).

La etapa aguda comienza con la unión del virus a los receptores en la superficie de los cardiocitos y otras células blanco y su internalización. Tanto el daño proteolítico directo por el virus y el reconocimiento de motivos virales a través de receptores de la inmunidad innata como los receptores tipo Toll (TLRs, del inglés *Toll like receptors*), contribuyen a un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias y antivirales (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e interferones tipo I y II). Estas citoquinas son producidas por células cardíacas residentes, incluyendo miocitos, fibroblastos, células endoteliales y células dendríticas o DCs (del inglés *dendritic cells*) (Fuse et al. 2005) (Figura 11). Los interferones de tipo I (IFN- α e IFN- β) son especialmente importantes en la respuesta antiviral temprana y cumplen varias funciones en las células infectadas. En conjunto, esta señalización de citoquinas activa los macrófagos residentes y aumenta la expresión de moléculas de adhesión endoteliales, así como quimoquinas y sus

receptores, que conducen al reclutamiento de células de la inmunidad innata (Papageorgiou et al. 2012) como DCs, células NK y macrófagos (Yajima 2011).

La etapa subaguda se caracteriza por la migración de células inmunes al miocardio, predominantemente linfocitos T antígeno específicos (Yajima 2011). La eliminación del virus comienza con el reconocimiento y la eliminación de células infectadas a partir de la presentación de antígenos virales reconocidos por células T CD8⁺ citotóxicas. Se cree que este proceso se ve favorecido por la generación de anticuerpos neutralizantes por células B activadas (Mena et al. 1999). En esta etapa hay una elevada pérdida de cardiomiocitos, sea a través de la acción viral o del sistema inmune. La producción y liberación de citoquinas proinflamatorias en esta etapa se mantiene elevada (Esfandiarei et al. 2008) (Figura 11). A pesar de que estas respuestas inmunes son esenciales para la eliminación del virus, las reacciones inmunes exacerbadas a través de los linfocitos T citotóxicos o la generación de autoinmunidad contra proteínas cardíacas pueden finalmente dañar a los cardiomiocitos remanentes.

Finalmente, en la fase crónica la infección viral activa ha sido eliminada en su totalidad, el mecanismo inflamatorio está controlado y comienza el proceso de reparación del miocardio. Citoquinas antiinflamatorias como TGF- β e IL-10 secretadas por células T regulatorias y macrófagos promueven la resolución de la respuesta inmune y el reemplazo del tejido muerto por cicatrices fibróticas (Papageorgiou et al. 2012). Esto incluye la restauración de las estructuras de la MEC que permiten normalizar la función ventricular. Sin embargo, en algunos casos el RNA y las proteínas virales pueden persistir en el corazón. Esto puede ser asociado a una inflamación crónica del tejido que conduce a una fibrosis extensa y disfunción ventricular, que podría eventualmente evolucionar en CMD (Westermann et al. 2010) (Figura 11). Un trabajo de Klingel y col., demuestra la persistencia de CVB3 en células B y macrófagos hasta los 42 dpi (Klingel et al. 1996), lo que indicaría que estas células tendrían un rol importante en la persistencia del RNA viral y la inflamación crónica.



5. Replicación de CVB en células especializadas

Cardiomiocitos

Se han publicado relativamente pocos estudios sobre la replicación de CVB en cardiomiocitos humanos. Sin embargo, se sabe que el virus replica en cardiomiocitos y que si bien usualmente generaría necrosis en los mismos, en ciertas circunstancias, su genoma persistiría en ausencia de virus infeccioso y de lisis celular (Kawai 1999; Saffitz 1999). Aunque se observaron resultados similares en el modelo murino (Klingel et al. 1992), se desconoce cuál es el mecanismo implicado en ambos casos. La utilización de cultivos de células cardíacas para el estudio de la interacción CVB-célula cardíaca en ausencia de la respuesta inmune, entre otros factores contaminantes presentes en el animal, data de poco más de 20 años. En 1985, Kandolf

y col., demostraron por primera vez que el virus CVB3 podía replicar en células cardíacas fetales humanas cultivadas (Kandolf et al. 1985). Posteriormente, fue demostrado que dos CVB3 con distintas propiedades patogénicas inducían lisis en forma similar cuando infectaban cardiomiocitos murinos en cultivo (Gomez et al. 1993).

Fibroblastos cardíacos

Los fibroblastos cardíacos tienen un papel esencial en la arquitectura y remodelación de la MEC cardíaca. Se ha publicado que CVB3 puede replicar en fibroblastos cardíacos humanos en forma persistente sin producir efecto citopático (Kandolf et al. 1985), pero alterando la expresión de ciertas moléculas que podrían tener un papel en la patogénesis de MV/CMD (Heim et al. 2000). Sin embargo, se desconoce si la infección de fibroblastos cardíacos por CVB3 modifica la síntesis y expresión de las moléculas de la MEC y si existen diferencias en este sentido teniendo en cuenta el fenotipo viral.

Macrófagos

En modelos murinos de infección por CVB, se ha demostrado que los macrófagos son componentes importantes de la defensa del huésped en la vía de ingreso, limitando la distribución del virus a los órganos blanco. También se ha demostrado que son muy importantes para la eliminación del virus de los tejidos infectados (Mogensen 1979).

Las infecciones por CVB3 son causantes de MV aguda y crónica caracterizadas por un importante infiltrado mononuclear de leucocitos y la necrosis de cardiomiocitos. Debido a que la experiencia clínica y experimental sugiere que el daño cardíaco podría resultar de mecanismos inmunológicos además de los virales, se ha buscado caracterizar la interacción de CVB3 con las células del sistema inmune. Se ha podido comprobar la infección de monocitos por CVB3 por inmunofluorescencia y titulación viral. La infección viral no redujo la viabilidad de los monocitos, sino que por el contrario, aumentó su adherencia. En forma dosis dependiente, CVB3 estimuló la liberación de citoquinas de los monocitos. Mientras que la elevada producción de TNF- α , IL-1 β e IL-6 fue dependiente de la exposición a CVB3, la liberación de IFN I también fue inducida por el virus inactivado por UV. Los sobrenadantes de los monocitos infectados por CVB3 presentaron una actividad citotóxica contra células cardíacas, lo que sugiere que la liberación de citoquinas inducida por CVB3 de parte de los monocitos podría participar en el daño de órganos inducido por el virus, como en la miocarditis (Henke et al. 1992).

Al tomar los virus y digerir las partículas virales, los macrófagos pueden demorar o evitar la distribución de la infección a células susceptibles. Sin embargo, si el virus es capaz de replicar dentro de estas células sin lissarlas, la infección puede continuar y permitir el acceso del virus a los tejidos y el daño tisular. Dentro de este contexto, surge de vital importancia la necesidad de caracterizar la relación de los macrófagos con CVB (Mogensen 1979).

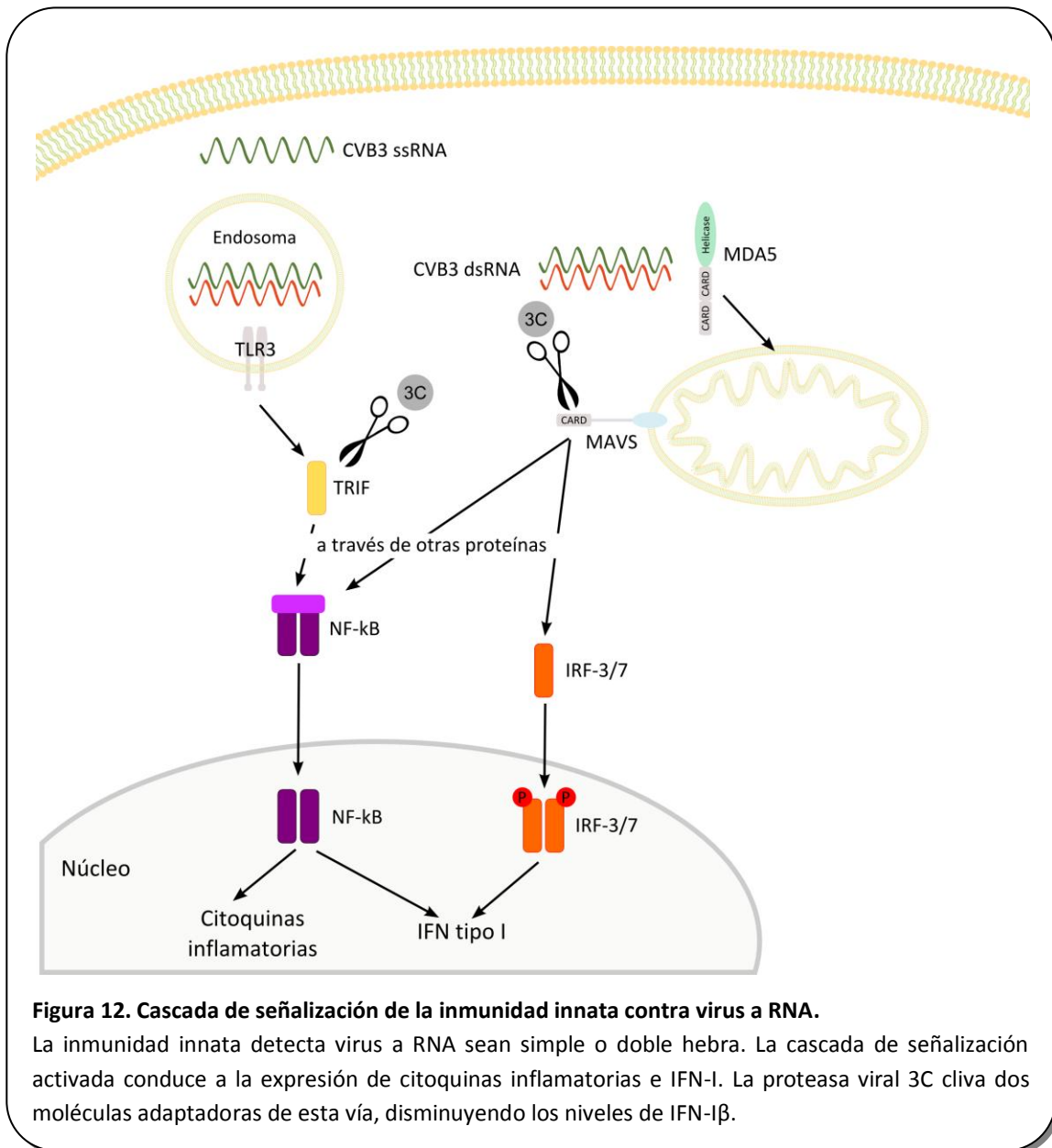
En trabajos previos se ha podido observar un aumento en la mortalidad de animales deplecionados de macrófagos con sílica e infectados con CVB3, sin embargo, aún no se ha estudiado los títulos virales en los diferentes tejidos o la asociación del título viral con la patología asociada (Rager-Zisman et al. 1973).

6. Respuesta inmune, inflamación, daño celular y fibrosis

Inmunidad innata

Cuando los virus infectan células, se inician mecanismos defensivos intrínsecos casi inmediatamente, incluidos aquellos del sistema inmune innato, que provee citoquinas para frenar la infección viral, y modular la respuesta inmune adaptativa para evitar que la infección prosiga sin control (Janeway et al. 2002). El sistema inmune innato es activado cuando los productos virales son detectados por sensores celulares que activan la producción de IFN-I con función antiviral. La detección es llevada a cabo por receptores unidos a membrana del tipo TLR (del inglés, *toll-like receptor*), o por sensores citoplasmáticos como los receptores tipo RIG-1 o MDA-5 (Yoneyama et al. 2004; Kato et al. 2005; Yoneyama et al. 2007). Por ejemplo, TLR3 reconoce RNA doble hebra, así como el análogo sintético poly I:C (Akira et al. 2006). La señalización por TLR3 activa el factor de transcripción factor regulador de interferón 3 o IRF3 (del inglés, *interferon regulatory factor 3*) y la molécula adaptadora de la vía NF- κ B, TRIF (Hoebe et al. 2003; Yamamoto et al. 2003). La señalización por TRIF conduce a la fosforilación de IRF3 y el IRF3 activado trasloca al núcleo e induce la expresión IFN- β (Uematsu et al. 2007).

A pesar de estos mecanismos de defensa innatos, las infecciones virales aún se producen debido a que los virus codifican en sus genomas proteínas que antagonizan esta y muchas otras medidas de defensa del huésped. Como ejemplos se pueden nombrar la degradación de RIG-1 y MDA-5 en células infectadas por diversos enterovirus (Barral et al. 2007; Barral et al. 2009) y para el caso particular de CVB3, la degradación de MAVS (otra molécula adaptadora) y TRIF por la proteasa 3C (Mukherjee et al. 2011) (Figura 12).



IFN-I

El IFN-I comprende, en realidad, a un grupo de citoquinas que en el humano incluye 13 subtipos de IFN α , un subtipo de IFN- β y otros menos caracterizados (Gough et al. 2012). El IFN-I fue originalmente descrito como un factor secretado por células expuestas a virus que tornaban a otras células resistentes a la infección viral [revisado en (Borrow et al. 2010)]. Hoy se acepta que el IFN-I induce la expresión de cientos de genes como parte de un elaborado programa antimicrobiano para combatir infecciones en todas las células nucleadas, proceso denominado inmunidad autónoma celular (Macmicking 2012). A partir de hallazgos recientes

se han comenzado a asignar propiedades funcionales a nuevas proteínas efectoras del IFN-I, que no solo restringen virus sino también bacterias y protozoos en diferentes compartimientos subcelulares y en diferentes estadios del ciclo vital del patógeno (Brass et al. 2009; Kumar et al. 2010; Schoggins et al. 2011). El IFN-I media estas actividades a través de un receptor heterodimérico (IFNAR), que se expresa en la superficie de la mayoría de las células y gatilla una cascada de señales intracelulares que resultan en la expresión de múltiples genes estimulados por IFN o ISGs (del inglés, *interferon stimulated genes*).

En relación a su rol en la MV, la administración de IFN-I β reduce las lesiones en miocardio cuando es administrado en la fase aguda de la miocarditis inducida por CVB3 (Lutton et al. 1985). Por el contrario, la inhibición de IFN-I β disminuye la enfermedad cuando se realiza en un estadio más tardío, sugiriendo que los efectos favorables del IFN-I son dependientes del tiempo (Lutton et al. 1985). En animales *knock out* (KO) del gen de IFN-I β (Deonarain et al. 2004) o del receptor de IFN-I (Wessely et al. 2001) se observó una disminución en la supervivencia. Llamativamente, a pesar de que los KOs también presentaron mayor daño cardíaco, los niveles virales cardíacos no se ven alterados a pesar de una elevada replicación en hígado, que podría ser la causa de la elevada mortalidad. En trabajos previos se observó que los niveles de IFN-I β en ratones C57BL/6 justificaban su menor susceptibilidad a la infección por CVB3 al compararlos con ratones de la cepa A.BY/SnJ (Jakel et al. 2009).

Células de la respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata provee una respuesta rápida no específica al daño tisular y las infecciones. Reconoce patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs (del inglés *pathogen associated molecular patterns*) sea por proteínas circulantes del Complemento, que neutralizan patógenos extracelulares, o por TLRs celulares, llevando a la activación de cascadas de señalización. Las células no inmunes o las células de la inmunidad innata (incluyendo monocitos-macrófagos, DCs o células NK) interactúan entre ellas a través de una amplia variedad de citoquinas, incluyendo IFN tipo I y II. Muchos de estos aspectos han sido manipulados experimentalmente con una amplia variedad de efectos protectivos o dañinos en el contexto de la miocarditis viral (Corsten et al. 2012).

Las proteínas del Complemento, como efectores inmediatos de la defensa innata antimicrobiana, parecen tener efectos protectores en el corazón, ya que ratones deficientes en receptores de las mismas muestran un aumento en el daño cardíaco y la infiltración de

macrófagos durante la infección por CVB3 (Fairweather et al. 2006). Las células NK son también importantes para la protección del corazón al eliminar selectivamente las células infectadas y la depleción de las mismas antes de la infección por CVB3 conduce a un aumento en los títulos virales en el corazón, junto con una agravada degeneración de miocitos (Godeny et al. 1986). Por el contrario, la depleción de varias células de la inmunidad innata por administración de anticuerpos contra Mac-1 (expresado en monocitos, macrófagos y células NK) reduce tanto los niveles virales como la inflamación cardíaca luego de la infección por EMCV (Hirasawa et al. 1996), indicando que las células del sistema inmune distintas de las NK no serían tan beneficiosas para el huésped. Los macrófagos, que representan las células más abundantes en lesiones inflamatorias durante la fase aguda (Klingel et al. 1992) podrían ser responsables de este efecto. Es importante destacar que el óxido nítrico o NO (del inglés, *nitric oxide*), el cual es secretado en grandes cantidades por macrófagos y neutrófilos, participa en la patogénesis de la MV ya que el bloqueo genético o farmacológico del mismo resulta en títulos virales aumentados y una enfermedad agravada (Lowenstein et al. 1996; Zaragoza et al. 1998).

Macrófagos en la respuesta inmune

Los macrófagos tienen un rol crucial en la respuesta inmune innata y adaptativa a patógenos, y son mediadores críticos de los procesos inflamatorios. Durante la infección, los procesos inflamatorios son cruciales para la eliminación de patógenos. Sin embargo, la inflamación también se asocia a procesos deletéreos en el ambiente tisular, y por lo tanto debe ser reprimida para permitir una cicatrización completa. Los macrófagos, también participan en la resolución de la inflamación al producir citoquinas y quimioquinas anti-inflamatorias (Tabla 1) y eliminando los restos celulares. Los macrófagos por lo tanto, pueden exhibir propiedades pro y antiinflamatorias, dependiendo del estadio de la enfermedad y las señales recibidas, como por ejemplo el balance inflamatorio en el microambiente (Laskin et al. 2011).

Desde la introducción del concepto de macrófagos alternativamente activados en 1992 (Stein et al. 1992), los macrófagos han sido clasificados en dos grupos, macrófagos tipo I, clásicamente activados o CAM Φ (del inglés, *classically activated macrophages*), que son efectores proinflamatorios, y los macrófagos tipo II, alternativamente activados o AAM Φ (del inglés, *alternative activated macrophages*) que exhiben propiedades antiinflamatorias.

Los macrófagos constituyen una población muy diversa en relación a su función y fenotipo. Tradicionalmente, se aceptaba que el IFN- γ derivado de respuestas Th1 era el principal

activador de respuestas de macrófagos inducidas por células T, conduciendo a un aumento en los niveles de diversas moléculas, incluyendo MHC clase II, iNOS, e IL-12, para la destrucción de microorganismos (Adams et al. 1984). En contraste a la activación por IFN- γ , las citoquinas, IL-4 e IL-13, asociadas a respuestas Th2, inducen la expresión de otras moléculas como Arginasa, YM1, o el receptor de manosa. Los AAM Φ contrastan con los CAM Φ , no sólo en el fenotipo sino también en la función (Cihakova et al. 2008) (Figura 13) (Tabla 1) ya que catalizan la reparación de la MEC dañada, un proceso que ocurre en las fases finales de la inflamación (Classen et al. 2009).

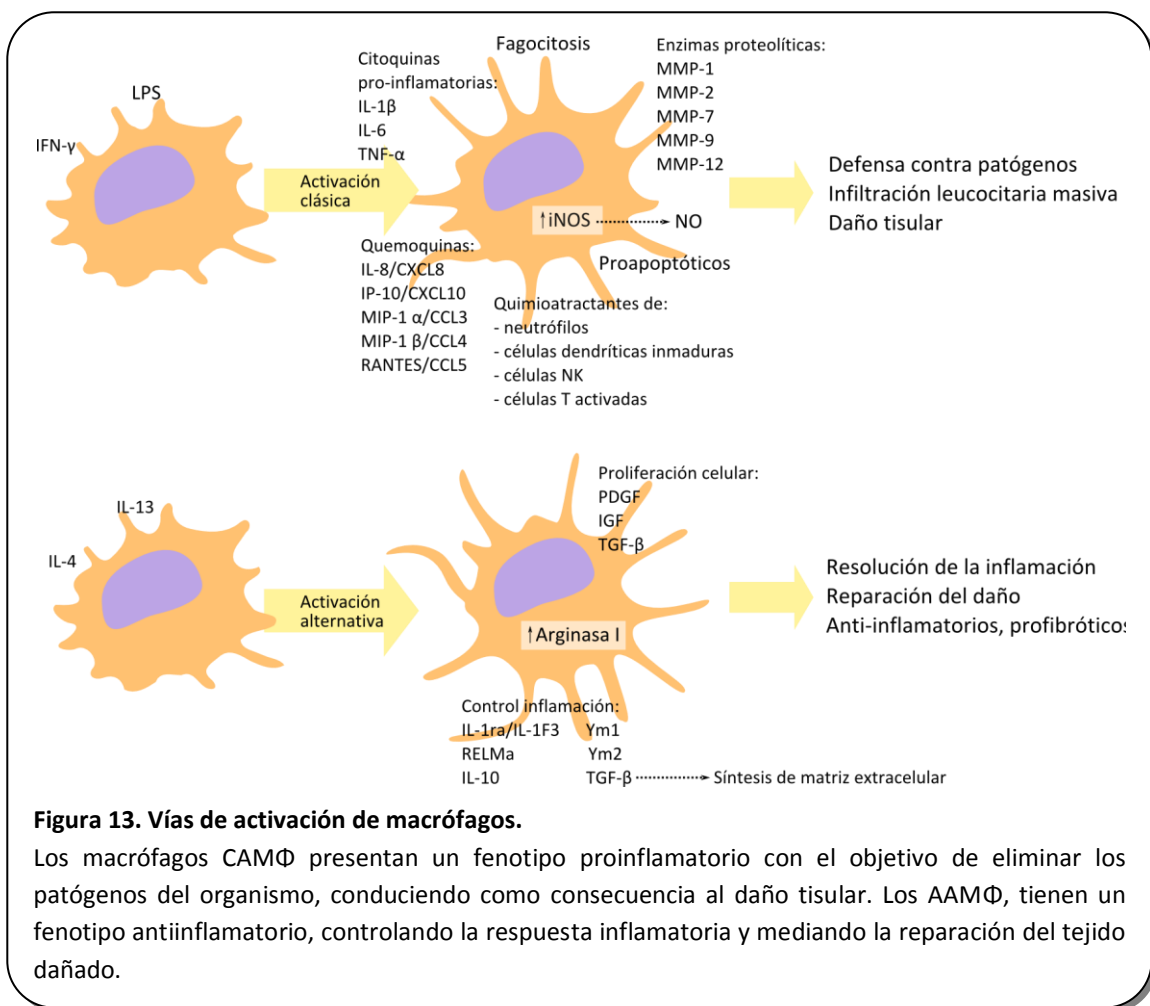


Figura 13. Vías de activación de macrófagos.

Los macrófagos CAM Φ presentan un fenotipo proinflamatorio con el objetivo de eliminar los patógenos del organismo, conduciendo como consecuencia al daño tisular. Los AAM Φ , tienen un fenotipo antiinflamatorio, controlando la respuesta inflamatoria y mediando la reparación del tejido dañado.

Tabla 1. Vías de activación de macrófagos y citoquinas asociadas.

Activación	Citoquinas	Función
Clásica Fenotipo Th1 Promueven la inflamación, la destrucción de ECM y la apoptosis	IFN- γ	Señal de activación a través de IFN γ R
	IL-8	Factor quimiotáctico
	TNF- α	Actividad pro-apoptótica
	iNOS	Efector citotóxico
	MMP-1, -2, -9 and -12	Enzimas proteolíticas que degradan colágenos, elastina, fibronectina y otros componentes de la ECM.
Alternativa Fenotipo Th2 Promueven la generación de ECM, la proliferación celular y la angiogénesis	MDC/CCL22	Citoquinas anti inflamatorias
	PARC/CCL18	
	TARC/CCL17	
	IL-1ra	
	IL-10	
	TGF- β	Promueve la generación de ECM al activar fibroblastos a producir componentes de ECM
	Arginasa I	Produce prolina y poliaminas que promueven la generación de ECM y la proliferación celular

Los AAM Φ expresan un repertorio molecular que conduce a la tolerancia y a la resolución de la inflamación, y presentan una elevada capacidad fagocítica (Stein et al. 1992). Estas células pueden ser observadas durante la fase de recuperación de la inflamación aguda (Topoll et al. 1989), en enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide (Szekanecz et al. 1994), psoriasis (Djemadji-Oudjijel et al. 1996), y en cicatrización de heridas (Goerdts et al. 1993). Los AAM Φ se encuentran abundantemente en la placenta humana (Mues et al. 1989), donde contribuyen a la protección del feto, y en el pulmón (Van den Heuvel et al. 1999), donde evitan reacciones inflamatorias no deseadas a microorganismos no patogénicos. Se ha sugerido que los AAM Φ participarían en las tres fases de la cicatrización: la disminución de la inflamación, la angiogénesis y la eliminación de restos de tejido y cuerpos apoptóticos (Fadok et al. 1998; Goerdts et al. 1999).

En el tejido inflamado, no se sabe si los AAM Φ que aparecen durante la fase de recuperación (Goerdts et al. 1999) se originan de nuevos monocitos reclutados o surgen de un cambio en el estado de activación de macrófagos previamente proinflamatorios. De hecho, una plasticidad en la activación permitiría el involucramiento, en la fase de recuperación, de las mismas células que participaron en la inflamación, con una ventaja obvia de la eficiencia y velocidad de recuperación (Porcheray et al. 2005).

Recientemente fue demostrado que los macrófagos, que producen abundantes citoquinas proinflamatorias, contribuyen significativamente a la inflamación cardíaca y el daño durante la miocarditis en ratones BALB/c, justificando la susceptibilidad aumentada en machos (con mayor proporción de CAMΦs en corazón) comparado con las hembras (Li et al. 2009).

La depleción de macrófagos mediada por liposomas se basa en la introducción y acumulación de moléculas pequeñas y altamente hidrofílicas en macrófagos con ayuda de liposomas. El diclorometileno bifosfonato disódico (clodronato) es una molécula muy hidrofílica de carga negativa que puede ser disuelta en agua a altas concentraciones. Como consecuencia, puede ser encapsulada en liposomas con alta eficacia. Una vez encapsulado, no puede escapar fácilmente del liposoma, al ser incapaz de cruzar la bicapa lipídica. Luego de la administración de estos liposomas *in vivo*, estos son fagocitados por los macrófagos. La fusión con lisosomas conducirá a la digestión del liposoma por las enzimas lisosomales, liberando el clodronato dentro de la célula. A medida que los macrófagos ingieran más liposomas, irá aumentando la concentración de clodronato dentro de la célula, hasta que conducirá a la muerte del macrófago por apoptosis (Van Rooijen et al. 1994; van Rooijen et al. 1997; van Rooijen et al. 2010) (Figura 14).

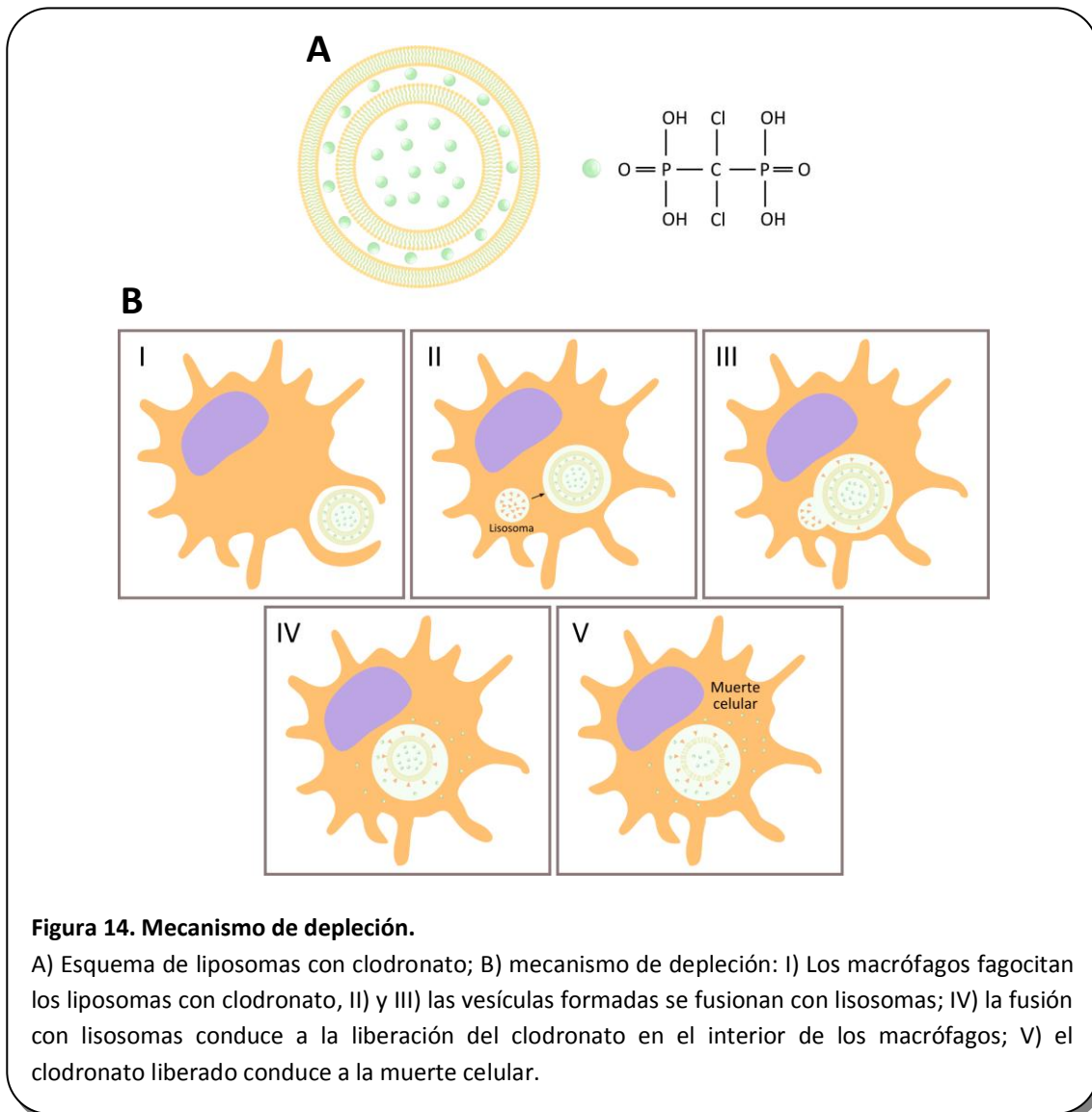


Figura 14. Mecanismo de depleción.

A) Esquema de liposomas con clodronato; B) mecanismo de depleción: I) Los macrófagos fagocitan los liposomas con clodronato, II) y III) las vesículas formadas se fusionan con lisosomas; IV) la fusión con lisosomas conduce a la liberación del clodronato en el interior de los macrófagos; V) el clodronato liberado conduce a la muerte celular.

Fibroblastos y fibrosis

En el corazón de los mamíferos, la función cardíaca es regulada por la interacción dinámica coordinada entre dos tipos celulares principales, los cardiomiocitos y los fibroblastos cardíacos, que en conjunto representan el 90% de las células presentes en el miocardio. Los fibroblastos, que representan un 60-70% del total de las células en el corazón humano, son la fuente principal de componentes de la MEC que regula la estructura del corazón, y en consecuencia, las diversas señales mecánicas y químicas entre los componentes celulares y no celulares. Los cardiomiocitos, a pesar de ser menos numerosos, ocupan mucho más volumen en el corazón y son las células contráctiles que proveen la fuerza mecánica. A su vez, los fibroblastos son críticos no solo para la función normal del miocardio, sino también en la remodelación que

ocurra en respuesta a cambios patológicos, como la hipertensión, el infarto de miocardio o la falla cardíaca (Fowler et al. 2006; Porter et al. 2009).

Mucho de los efectos funcionales de los fibroblastos están mediados a través de su diferenciación a miofibroblastos, células que expresan proteínas contráctiles, incluyendo alfa actina de músculo liso o α -SMA (del inglés, *smooth muscle actin*), y presentan propiedades migratorias, proliferativas y secretorias aumentadas. Asimismo, los miofibroblastos responden a citoquinas proinflamatorias (incluyendo TNF- α , IL-6), TGF- β , péptidos vasoactivos y hormonas (Porter et al. 2009).

La fibrosis cardíaca, que se caracteriza por el depósito en exceso principalmente de colágeno tipo I, comienza a observarse en ratones susceptibles infectados con CVB3 a partir del día 12-15 pi (Lang et al. 2008). Los fibroblastos tendrían un rol muy importante en la formación de MEC durante esta patología, ya que la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos conduce a que estas células aumenten la síntesis de proteínas de la MEC, entre las que figuran Colágeno I y α -SMA.

Los miofibroblastos y TGF- β son probablemente elementos claves en el desarrollo de la fibrosis cardíaca. Los miofibroblastos normalmente pueden observarse a nivel pericárdico, perivascular, y endomiocárdico, en los lugares de infarto de miocardio, y en la fibrosis cardiaca inducida en animales mediante la infusión de angiotensina II o aldosterona (Petrov et al. 2002).

Se ha observado un aumento en la concentración de TGF- β en los sitios de fibrosis cardíaca y una disminución de la fibrosis en ratones deficientes de TGF- β o durante el tratamiento de ratas con anticuerpos contra TGF- β . Estos datos, junto con el hecho de que TGF- β estimula la producción de colágeno en fibroblastos cardíacos en cultivo sugieren que TGF- β y los miofibroblastos pueden implicarse en el recambio de colágeno tisular sin importar el sitio o la naturaleza del daño dentro del corazón (Petrov et al. 2002).

Daño cardíaco

La compleja patofisiología de la miocarditis viral involucra tanto un daño y disfunción directo, mediado por el virus, e indirecto, mediado por la respuesta inmune. La respuesta inmune es esencial para la eliminación del virus y la recuperación de la homeostasis tisular. Sin embargo, durante este proceso, el sistema inmune contribuye a la inflamación cardíaca, la necrosis y la disfunción ventricular, directamente a través de la eliminación de células cardíacas inflamadas,

así como indirectamente a través de la acción de citoquinas proinflamatorias en la función de los cardiomiocitos (Westermann et al. 2010).

Galectina 3

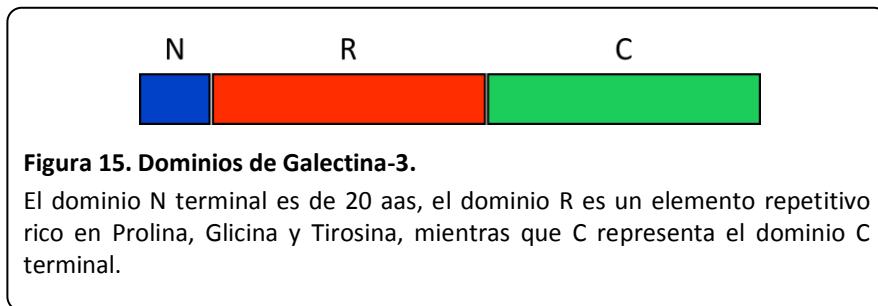
Diversos mecanismos celulares y moleculares están involucrados en la respuesta inmune innata. Entre estos mecanismos se incluye la identificación de un amplio repertorio de receptores asociados a reconocimiento de patrones o PRRs (del inglés *pattern recognition receptors*), que son capaces de discriminar entre PAMPs y patrones moleculares asociados al peligro o DAMPs (del inglés *danger associated molecular patterns*) que ayudan a iniciar las respuestas inmunes (Trinchieri et al. 2007). Estos diversos receptores comprenden un amplio rango de PRRs de señalización, como los TLRs, y PRRs endógenos, que promueven la unión, fagocitosis y destrucción de organismos.

Dentro de este escenario complejo, las galectinas han surgido como lectinas solubles capaces de identificar hidratos de carbono presentes en microorganismos y tumores. Las galectinas son proteínas de unión a glúcidos con múltiples roles en las respuestas inmunes innata y adaptativa. Se han identificado al menos 15 galectinas en mamíferos, la mayoría de amplia distribución tisular (Rabinovich et al. 2007). Dentro del sistema inmune, las galectinas se expresan en casi todas las células inmunes, sea de forma constitutiva o regulada en macrófagos inflamatorios, DCs, mastocitos, células NK y células T regulatorias (McChesney et al. 1987; Hiraoka et al. 1996; Koopman et al. 2003). Las galectinas comparten al menos un sitio de reconocimiento de carbohidratos conservado o CRD (del inglés, *carbohydrate recognition domain*) de unos 130 aas que media la unión a carbohidratos. Una clasificación tradicional basada en similitudes estructurales incluye: galectinas prototipo (galectina-1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 y 15) que tienen un CRD y se encuentran en forma de monómeros o dímeros; galectinas del tipo repetición en tándem (galectina-4, 6, 8, 9 y 12) que incluyen dos CRDs separados por una unión de hasta 70 aas; y el tipo quimera (galectina 3 o Gal-3) que contiene un CRD conectado a una región N terminal no lectina (Cerliani et al. 2011).

A pesar de que las galectinas no contienen una señal de secreción clásica, algunas galectinas se encuentran en el compartimiento extracelular y son liberadas a través de vías poco comunes que necesitan de la actividad de unión a carbohidratos intacta. Una vez externalizadas, las galectinas pueden unirse a múltiples patrones de glicosilación diversos en patógenos o células y activar la respuesta inmune innata (Cerliani et al. 2011). Dada la habilidad de Gal-3 de

asociarse con macrófagos (Dong et al. 1997), la interacción de Gal-3 con diferentes patógenos podría no solo facilitar la activación de la respuesta inmune sino también mediar el reconocimiento por células fagocíticas y la eliminación.

La Gal-3 es una lectina animal de 30 kDa que une β -galactosidos (Ho et al. 1982) altamente expresada y secretada por macrófagos (Sato et al. 1994; Liu et al. 1995). Su expresión aumenta cuando los monocitos se diferencian a macrófagos (Liu et al. 1995) y disminuye cuando los macrófagos se diferencian a DCs (Dietz et al. 2000). Más aún, se ha podido observar que Gal-3 es un potente mitógeno de fibroblastos *in vitro* (Moutsatsos et al. 1987; Inohara et al. 1998; Sasaki et al. 1999) y trabajos previos han demostrado que esta proteína regula la activación de fibroblastos a miofibroblastos *in vivo* en modelos de fibrosis hepática y renal (Henderson et al. 2006; Henderson et al. 2008). Gal-3 consiste en un CRD de tipo galectina C-terminal, un pequeño dominio N-terminal, y un dominio repetido en el medio rico en prolina, glicina y tirosina (Figura 15). Gal-3 se une a laminina, IgE, y algunos otros ligandos a través de su CRD. El N terminal y los dominios repetidos de Gal-3 le confieren su habilidad de agregarse y entrecruzar ligandos (Mey et al. 1996). Recientemente se ha descrito la capacidad de Gal-3 de unir dos tipos de lipopolisacáridos (LPS) a través de sitios de interacción diferentes en los extremos N y C terminal (Mey et al. 1996).



La amplia expresión de galectinas por macrófagos junto con su localización en ambientes inflamatorios sugieren que estas proteínas jugarían un rol en modular el funcionamiento de los macrófagos. Por ejemplo, la exposición de macrófagos a Gal-1 induce un fenotipo de AAM Φ con un aumento en la expresión de Arginasa y una disminución en los niveles de IL-12 (Correa et al. 2003) y aumenta los niveles de IL-10 en macrófagos infectados por parásitos (Zuniga et al. 2001). Por el otro lado, Gal-3 juega un rol multifacético en relación con los macrófagos (Liu et al. 1995), viéndose aumentada tanto en CAM Φ (Novak et al. 2011) como en AAM Φ (MacKinnon et al. 2008). De hecho, Gal-3 actúa como quimioattractante para macrófagos (Sano

et al. 2000) e induce la producción de especies reactivas de oxígeno por macrófagos y monocitos (Liu et al. 1995; Greenwald et al. 2009). Por lo tanto, las galectinas pueden afectar las funciones antimicrobianas, proinflamatorias o regulatorias de los macrófagos en la conjunción entre las respuestas inmunes innata y adaptativa (Cerliani et al. 2011).

B. Objetivo general

Estudiar los mecanismos patogénicos moleculares en tipos celulares claves en la infección experimental por CVB3.

Objetivos específicos e hipótesis de trabajo

1. Estudiar la expresión de los receptores celulares y su correlación con la susceptibilidad a la infección por virus Coxsackie B (CVB) en células cardíacas murinas y humanas y en ratones de distintas cepas

Acorde a trabajos previos (Kandolf et al. 1985; Gomez et al. 1993), los cardiomiocitos murinos y humanos son susceptibles a la infección por CVB. Partiendo de la hipótesis que la susceptibilidad a la infección correlaciona con la expresión del o los receptores virales, se propone estudiar en modelos *in vitro* de cardiomiocitos humanos derivados de células embrionarias madres totipotenciales (hESC-C) y en cardiomiocitos murinos recién nacidos y adultos, la infección con CVB a nivel de la replicación viral, y la sobrevivencia celular y su correlación con los niveles de expresión del receptor viral CAR y DAF, en el caso humano.

Asimismo se buscará determinar si existen cambios en los niveles de CAR entre distintas cepas de ratones y la asociación de estos eventuales cambios con la susceptibilidad a la infección viral. Para ello se procederá a inocular ratones de distintas cepas con CVB3 para determinar en los mismos los niveles de replicación viral en corazón; el grado de injuria tisular y los niveles tisulares de CAR.


Estos estudios podrán determinar la susceptibilidad de hESC-C a la infección por CVB3, la correlación con la expresión de los receptores y las eventuales diferencias en el sistema murino donde DAF no es utilizado y clarificar el rol de la expresión de CAR en la miocarditis y si aquellas cepas de ratones que expresan más o menos CAR son más o menos susceptibles a la replicación viral y a la subsecuente enfermedad.

2. Estudiar la infección de macrófagos por CVB

Considerando como hipótesis de trabajo que los macrófagos juegan un rol esencial en la miocarditis y sus secuelas, se intentará caracterizar la infección de CVB3 en macrófagos teniendo en cuenta los niveles de replicación viral, el estado de activación y/o diferenciación celular y el efecto en la síntesis de moléculas con eventual rol en la patogénesis de la infección por CVB3.

3. Estudiar el rol de macrófagos en la miocarditis viral y la fibrosis

Partiendo de la hipótesis ya mencionada, se analizará el rol de los macrófagos en la replicación de CVB3 *in vivo* y su estado de activación en los distintos estadios de la infección viral. Asimismo se buscará correlacionar la activación de macrófagos, la expresión de Gal-3 y la activación de fibroblastos con la fibrosis cardíaca y las consecuencias por la depleción de macrófagos.



II. Materiales y métodos

Materiales y métodos

Materiales, reactivos, soluciones

Bacterias

Para la amplificación de los plásmidos se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 α [™], que posee el siguiente genotipo: F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1 tonA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Líneas celulares

La línea celular HeLa fue obtenida de la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC). Las células Vero fueron obtenidas del Servicio Cultivo de Tejidos INEI/ANLIS "Carlos G. Malbrán". Las células de macrófagos murinos J774.1 fueron provistas por el Dr. Martin Rumbo, LISIN, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Medios de cultivo

Para el crecimiento de bacterias se utilizó medio LB líquido o sólido. Este medio se preparó con Triptona 10 gr/lit, extracto de levadura 5 gr/lit y NaCl 10 gr/l. Para la preparación de LB sólido, se agregó además 15 gr/lit de Agar-Agar.

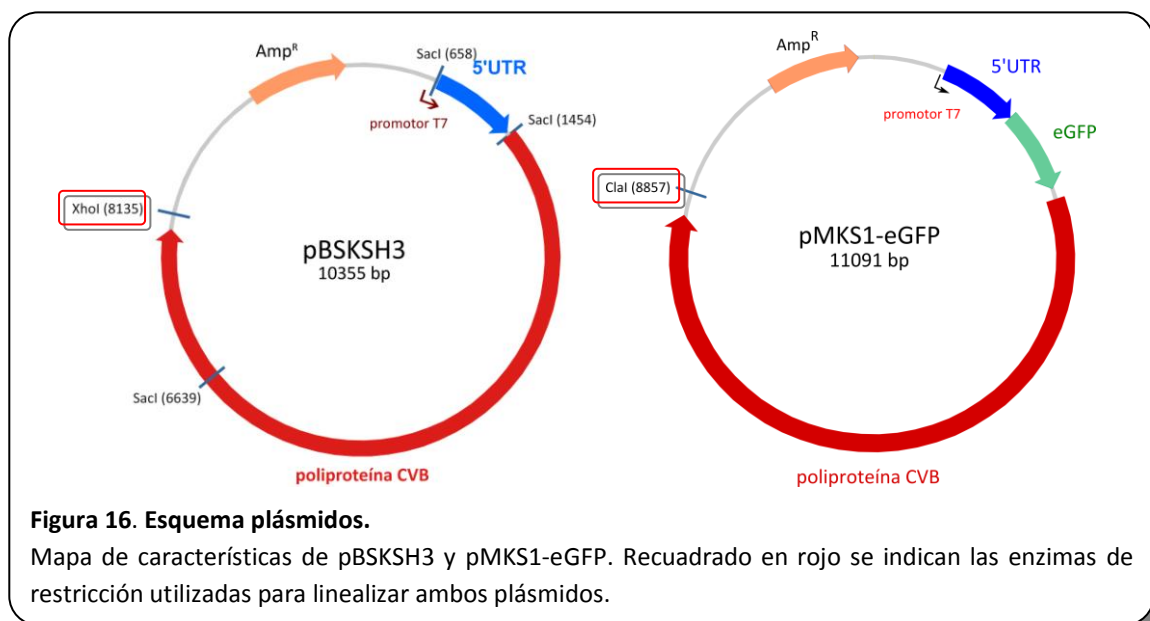
Para el cultivo de células eucariotas se utilizó el medio DMEM. Para la titulación por placa se utilizó el medio DMEM 2X. Todos fueron realizados a partir del medio comercial MEM (Invitrogen). Para el medio DMEM se utilizaron 9,61 gr/lit de MEM (Gibco), 2,2 gr/lit de NaHCO₃ (Sigma, Argentina), 3,5 gr/lit de glucosa (Gibco) y 2mM de Glutamina (Sigma, Argentina) llevando a un pH final de 7,4, mientras que para el medio DMEM 2X se duplicaron las concentraciones del medio DMEM. En caso de necesitarlo se adicionó Gentamicina 50 μ g/ml. Para permitir el crecimiento celular los medios se suplementaron con distintas concentraciones de suero fetal bovino (SFB, Bioser, Argentina), 2% o 10%, según se buscara el mantenimiento o el crecimiento del cultivo, respectivamente. Para repicar y sembrar las células se utilizó una solución de Tripsina (Invitrogen) 0,25% p/v y EDTA (Sigma, Argentina) 0,05M en PBS.

Obtención de stocks virales

MiniPrep

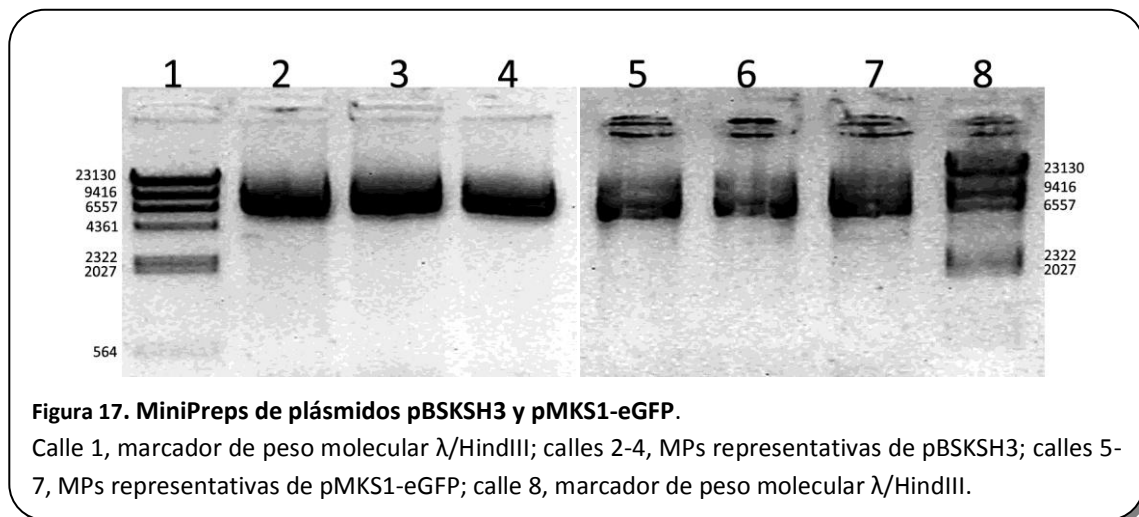
Los plásmidos pBSKSH3 y pMKS1-eGFP conteniendo el genoma completo del virus Coxsackie B3 (cepa H3) con propiedades miocárdicas (Knowlton et al. 1996) o CVB3-eGFP, con propiedades fluorescentes (Feuer et al. 2002) respectivamente, fueron provisto por el Dr. Bergelson, Instituto de Investigación del Hospital de Niños de Filadelfia, Universidad de Pensilvania, EEUU. Los stocks de virus purificados fueron producidos por transfección de los respectivos RNAs en células HeLa. Las alícuotas de los virus fueron tituladas en células Vero y mantenidas a -80°C hasta su uso.

Brevemente, los plásmidos codificantes para CVB3 y CVB3-eGFP (Figura 16) fueron electroporados en bacterias *E. Coli* DH5 α utilizando un electroporador GenePulser BioRad con un voltaje de 2,2 kV, resistencia de 200 Ω y una capacitancia de 25 μ F. Luego de la electroporación las bacterias se incubaron 1 h a 37°C y luego se sembraron en placas de LB conteniendo el antibiótico ampicilina, y se incubaron a 37°C ON. Al día siguiente, se utilizaron las colonias obtenidas para realizar estrías en otra placa de LB con ampicilina y para hacer cultivos en LB líquido con Ampicilina, los cuales se dejaron crecer toda la noche a 37°C a una agitación de 200 rpm a fin de realizar las MiniPreps de DNA.



La purificación de DNA plasmídico se efectuó por el método de lisis alcalina (Raya et al. 2008). Para ello se crecieron bacterias *E. coli* DH-5 α en medio LB hasta saturación con ampicilina. Se

centrifugó 1 ml de estos cultivos a 14.000 rpm durante 1 min en un microtubo de 1,5 ml y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió tres veces sobre el mismo microtubo. Se añadieron 200 µl de Solución I (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM (pH=8) EDTA 1 mM) al sedimento obtenido y se lo resuspendió con vortex. Se agregó 400 µl de Solución II preparada en el momento (NaOH 0,2 N; SDS 1%). Después se invirtió suavemente el tubo 3 veces o hasta observar la clarificación de la suspensión y se incubó en hielo durante 5 min. Luego se neutralizó el pH con 300 µl de Solución III (AcK 5M pH=4.8) y se incubó durante 10 min en hielo. Luego se centrifugó 20 min a 13.500 rpm y se extrajo el sobrenadante (DNA plasmídico) tratando de no tomar el sedimento de DNA cromosomal, restos celulares y proteínas acomplejadas con el SDS. Los RNAs de esta solución se degradaron por incubación con RNasa A (20 µg/ml) durante 1 h a 37°C. A continuación se agregó al sobrenadante 10 µl de una solución de Sílica (GeneClean Bio 101 Inc.) y se dejó 10 min a temperatura ambiente (TA) para permitir el pegado a la Sílica. A continuación se centrifugó la solución y se lavó el precipitado dos veces con 500 µl de la solución de lavado (NaCl, etanol y agua). Finalmente, se agregaron 20 µl de agua bidestilada estéril y se incubó por 10 min a 60°C para permitir el despegado del DNA de la Sílica. Finalmente, se corrió el DNA en un gel de agarosa 1% p/v para confirmar la integridad (Figura 17).



Los plásmidos pBSKSH3 y pMKS1-eGFP fueron linealizados con 1 µl (10 U) de las enzimas XhoI y ClaI, respectivamente, en el buffer correspondiente y con el agregado de BSA 1 mg/ml a 37°C ON. Los productos de digestión fueron analizados en un gel de agarosa 1% p/v.

A continuación las digestiones se extrajeron con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y luego se precipitó con etanol absoluto e isopropanol. Las digestiones se visualizaron en geles de agarosa 1% p/v (Figura 18), cuantificados utilizando un espectrofotómetro Spectrophotometer ND-100 (Nanodrop Technologies Inc.) y utilizadas como molde para la transcripción *in vitro*.

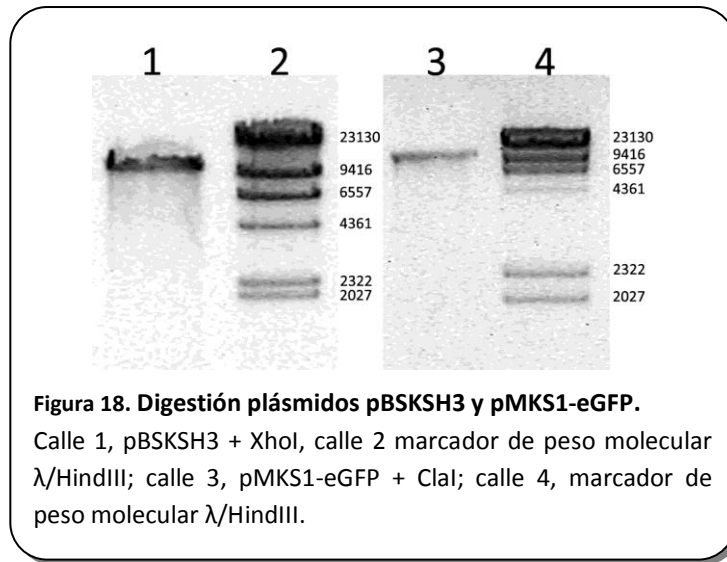
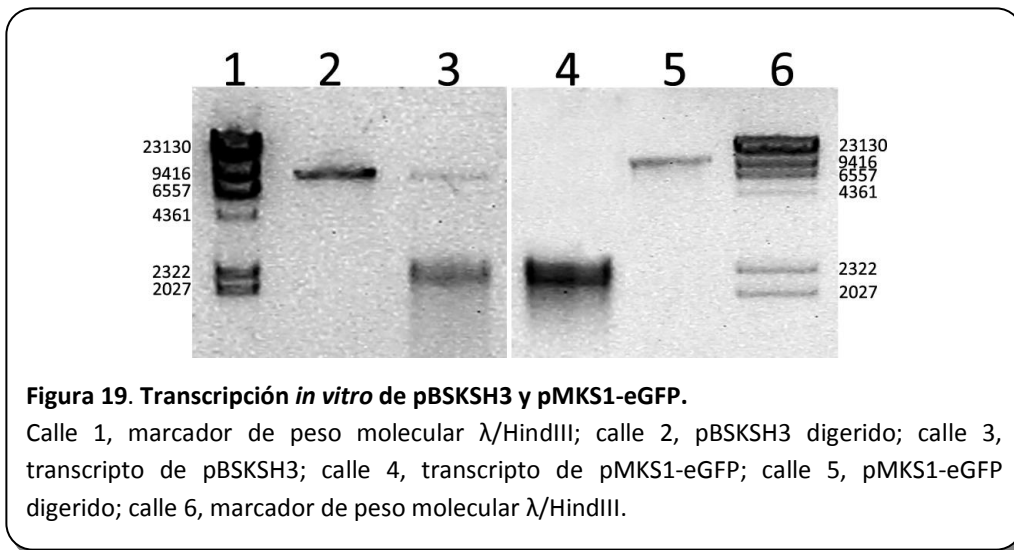


Figura 18. Digestión plásmidos pBSKSH3 y pMKS1-eGFP.

Calle 1, pBSKSH3 + XhoI, calle 2 marcador de peso molecular λ /HindIII; calle 3, pMKS1-eGFP + ClaI; calle 4, marcador de peso molecular λ /HindIII.

Transcripción *in vitro*

La mezcla de la reacción consistió en 5 μ g de DNA del plásmido linearizado, T7 RNA polimerasa (Promega) 0,4 U/ μ l, DTT 10 mM, inhibidor de RNasas RNase OUT (Invitrogen), 1 U/ μ l, Buffer de transcripción 5X (Promega), rNTPs (0,25 mM de cada uno) y agua hasta completar 50 μ l. La mezcla de la reacción se incubó por 2 hs a 37°C. La integridad del RNA obtenido fue confirmada por observación en geles de agarosa 1% p/v y semicuantificado comparando con las bandas del patrón de peso molecular (Lambda/HindIII, PB-L) utilizando el programa LabWorksTM 4.6 (Image Acquisition and Analysis Software) (Figura 19).



Transfección y electroporación

El RNA obtenido de la transcripción *in vitro* fue utilizado para transformar células HeLa utilizando Lipofectamina (Invitrogen) para CVB3 o por electroporación para el caso de CVB3-eGFP.

La transfección con Lipofectamina se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubó 1 μ l de Lipofectamina con 25 μ l de medio DMEM sin SFB ni antibiótico por 30 min a TA. Luego se agregaron a la mezcla otros 25 μ l de medio con 400 ng del RNA a transfectar y se mezcló suavemente por pipeteo. Luego de una incubación de 15 min, se le agregó a la mezcla 150 μ l del medio y se colocó sobre las células lavadas previamente con el mismo medio. Las células se dejaron por 5 hs en estufa a 37°C y con 5% CO₂ y a continuación se les agregó medio DMEM con 10% SFB.

La electroporación se realizó tripsinando las células y lavándolas dos veces con PBS antes de resuspenderlas en 500 μ l de PBS frío por tratamiento a una concentración de aproximadamente 1×10^6 cel/ml. Las células se colocaron en una cubeta de electroporación de 0,4 mm de distancia entre los electrodos y se incubaron por 10 min en hielo con el RNA (unos 4 μ g por electroporación). Transcurrido ese tiempo se electroporaron en un Electroporador Gene Pulser (BioRad) a un voltaje de 1,5 kV, una capacitancia de 25 μ F y resistencia infinita. Luego de la electroporación las células se dejaron otros 10 min en hielo para luego sembrar en placas de 6 wells con medio de crecimiento.

En ambos casos, las células transformadas se mantuvieron en cultivo hasta la aparición de efecto citopático (CPE) (Figura 20) u observación de fluorescencia (Figura 21). Aquellos sobrenadantes que indujeron CPE en las células se continuaron amplificando por sucesivos pasajes en células HeLa. Finalmente, las células se cosecharon y titularon en células Vero por el método de *dosis infectiva en cultivo de tejidos* o TCID₅₀ (del inglés, *tissue culture infective dose*), la cual evalúa la cantidad de virus que es capaz de producir cpe en el 50% de las células infectadas. Los títulos obtenidos fueron alrededor de $1,1 \times 10^5$ TCID₅₀/ml.

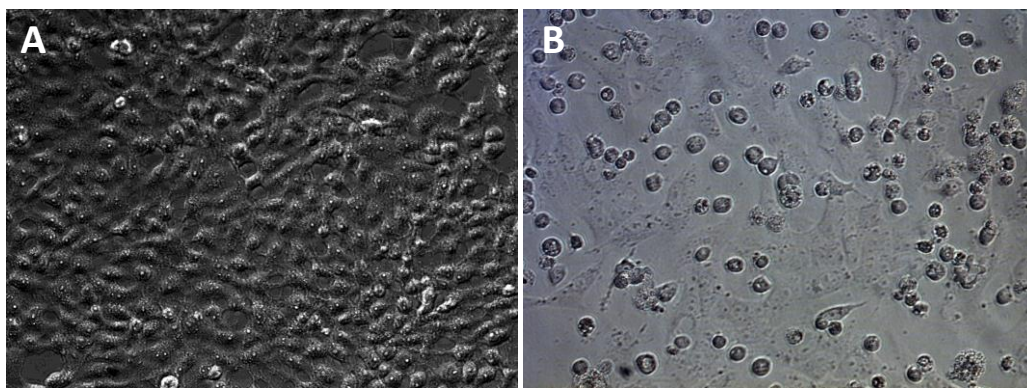
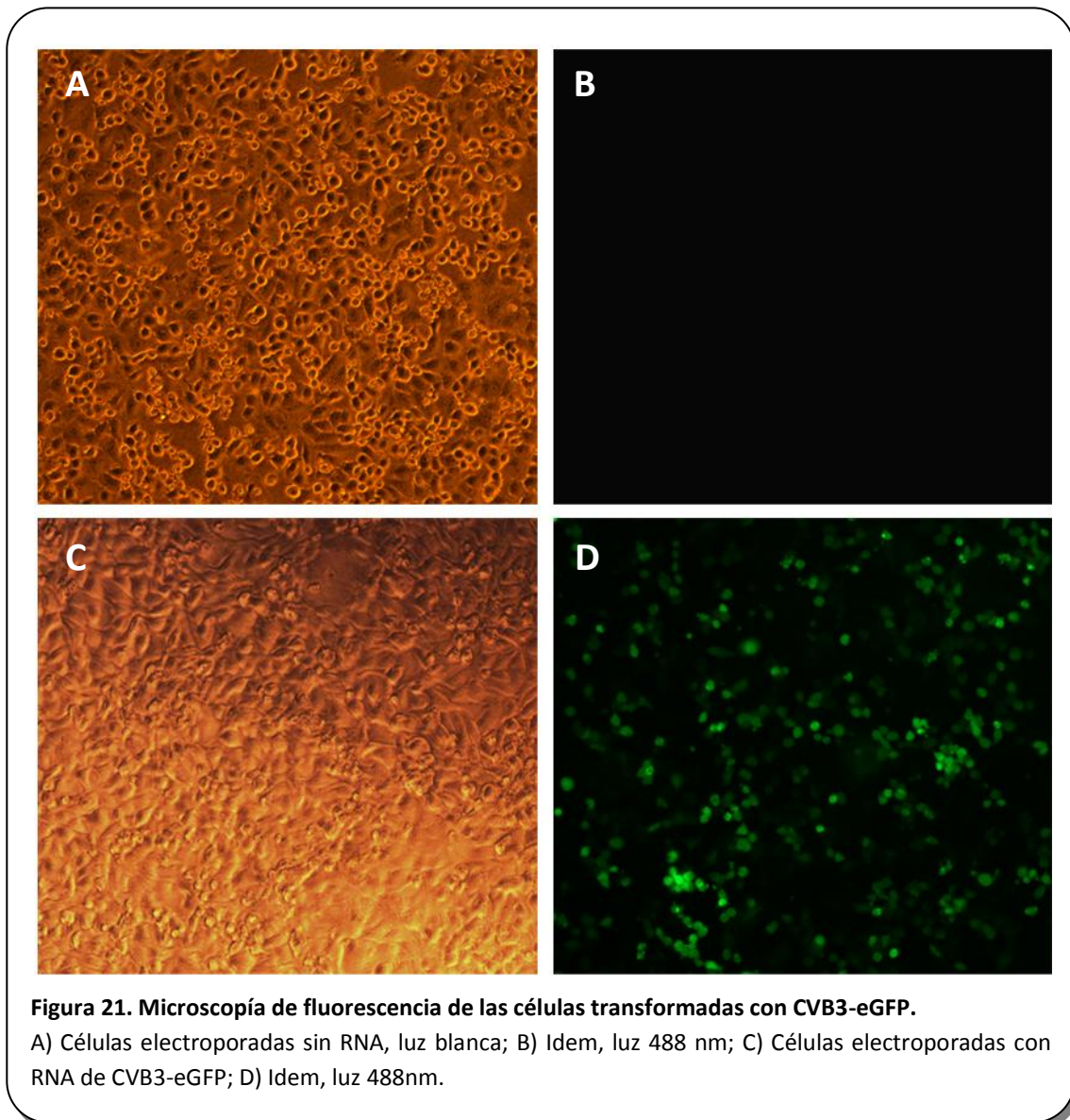


Figura 20. Efecto citopático en células transfectadas con RNA de pBSKSH3.

A) Células tratadas con Lipofectamina sin RNA, luz blanca; B) Células tratadas con Lipofectamina y RNA de pBSKSH3, las células redondeadas y de distinta refringencia son aquellas que presentan efecto citopático.



Titulación por dosis de cultivo de tejidos infectiva 50 (TCID₅₀/ml)

Para la titulación por TCID₅₀, se sembraron placas de 96 wells con 180 µl de medio con células Vero por well en una concentración de 1×10^5 cel/ml. Luego se agregaron 20 µl del virus a titular a la primera fila de células. A continuación, se mezclaron las células con el virus y 20 µl de la solución resultante se transfirieron a la siguiente fila de wells. Este proceso se repitió en las 8 filas de wells de la placa. Las placas se dejaron a 37°C hasta 7 días y se evaluó el efecto citopático (CPE) día a día. El título se expresó aplicando la siguiente fórmula (Reed et al. 1938).

$$I = \frac{\% \text{ de wells infectados en una dilución por encima del } 50\% - 50\%}{\% \text{ de wells infectados en una dilución } \leq 50\% - \% \text{ de Wells infectados en la dilución siguiente}}$$

h = factor de dilución (de 10 en 10)

Título 50% punto final (TCID50) = $10^{\log(\text{dilución} \leq 50\%) - (1 \times \log h)}$

$$\text{TCID50/ml} = \frac{1}{\text{volumen titulado} \times \text{TCID50}}$$

Titulación por placa

Para la titulación por placa se sembraron 3 ml de células Vero a una concentración de 1×10^5 cel/ml en placas de 6 wells y se dejaron adherir y crecer toda la noche. A continuación, las células se lavaron con PBS para retirar los restos de medio de cultivo, ya que el SFB disminuye la eficiencia de infección. Luego del lavado, las células se infectaron con 500 μ l de la dilución del virus a utilizar realizada en PBS durante 1 h a 37°C agitando cada 10 min. Transcurrido ese lapso, las células se lavaron nuevamente con PBS para luego incubarlas con 3 ml por well de una solución 1:1 de medio DMEM 2X con 4% SFB y metilcelulosa 1,6%. Transcurridas 48 hs, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4% y se tiñeron con una solución 1% de cristal violeta en etanol. Se contaron las placas en cada well y se expresó el título en PFU/ml corrigiendo por el volumen titulado y la dilución utilizada.

Aislamiento de cardiomiocitos murinos

La producción de cultivos de cardiomiocitos de ratones recién nacidos murinos ha sido descrita previamente (Gomez et al. 1993). Brevemente, unos 10 animales C3H/HeJ de unas 48 hs de edad fueron sacrificados en cámara de CO₂ y se les extrajo el corazón en el buffer de extracción de cardiomiocitos o CIB (del inglés *cardiomyocyte isolation buffer*) (NaH₂PO₄ 0,35 mM, MgSO₄ 1,05 mM, Hepes 10 mM, Glucosa 11 mM, KCl 4,69 mM, NaCl 146,2 mM) + EGTA (0,1 mM) y se procedió a la disgregación mecánica de los mismos. A continuación los restos celulares se centrifugaron a 500 x g por 10 min y se resuspendieron en una solución de CIB + Ca (50 μ M) + Tripsina (0,06 mg/ml) y se incubaron a 37°C por 10 min. Este paso se repitió una vez más descartando en ambos pasos el sobrenadante luego de la centrifugación.

A continuación los restos de tejido se resuspendieron en 10 ml de la solución CIB + Ca (50 μ M) + Colagenasa II (Sigma, Argentina) (0,5 mg/ml) y se incubaron a 37°C por 10 min. Transcurrido ese tiempo, y sin centrifugar, se transfirió el sobrenadante a un tubo cónico de 50 ml sobre hielo con 20 ml de la solución Cal (50 μ M) + seroalbúmina bovina (BSA, 1 mg/ml). Los pasos de disgregación con Colagenasa se repitieron 3 veces más, colectando en cada oportunidad los

sobrenadantes sobre solución de Ca. Una vez terminados los pasos de disgregación se centrifugaron las células (500 x g por 10 min) y se resuspendieron en medio DMEM con 10% de SFB. Los cardiomiocitos se sembraron en placas multiwells por 48 hs antes de ser utilizados.

Para el aislamiento de cardiomiocitos a partir de animales adultos se adaptó el protocolo anterior en combinación con protocolos para aislamiento de cardiomiocitos de ratones adultos por canulación de la aorta (Cambon et al. 1997; Zhou et al. 2000; O'Connell et al. 2007; Shioya 2007). Tres a cuatro corazones de animales C3H/HeJ adultos fueron extraídos y disgregados en la misma forma que los de animales recién nacidos. Una vez terminados los pasos de disgregación se centrifugaron las células (500 x g por 10 min) y se resuspendieron en agua bidestilada estéril por 30 seg para lizar los glóbulos rojos agregando inmediatamente solución Ca I 5X. Luego del aislamiento de las células, se restituyó lentamente el calcio a las mismas con el fin de evitar los procesos involucrados en la paradoja del calcio (Hearse et al. 1978; Acosta et al. 1983). Para la restitución del calcio, las células se incubaron en las soluciones de Ca crecientes (Ca II 120 μ M, III 240 μ M, IV 480 μ M y V 1 mM; todas con BSA 1 mg/ml) por 10 min, se centrifugaron a 500 x g por 10 min y se resuspendieron en la solución siguiente. En cada paso se tomaron muestras para verificar el número y confirmar la viabilidad celular.

Producción de cardiomiocitos humanos

Las líneas de células madre embrionarias humanas o hESC (del inglés *human embryonic stem cells*) se mantuvieron indiferenciadas cultivándolas sobre Matrigel® en medio DMEM (Gibco) condicionado por fibroblastos embrionarios murinos irradiados (MEF), y suplementado con 10% de suero sustituto KnockOut Serum Replacement (Gibco), 2 mM de aminoácidos no esenciales, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 50 μ g/ml de estreptomina, 0.1 mM de β -mercaptoetanol y 4 ng/ml de bFGF (del inglés *basic fibroblast growth factor*) (Gibco) (Scassa et al. 2011).

Para inducir la diferenciación a cuerpos embrionarios o EB (del inglés, *embryonic body*) se disociaron las células indiferenciadas de su sustrato con dispasa/colagenasa 1 mg/ml y luego se sembró la suspensión de agregados celulares obtenida en placas de cultivo no adherentes. Luego de 7 días en suspensión los EB formados se transfirieron a placas de cultivo adherentes con un *coating* de gelatina 1%, permitiendo la adherencia de los EB. Los latidos espontáneos tuvieron una frecuencia promedio de 29 ± 7.3 latidos/min. Esta tasa se

incrementó a $49 \pm 6.2\%$ comparada con la basal luego de su incubación con 10 nM de noradrenalina.

Infección de cultivos celulares

Las infecciones de células J774.1 se realizaron lavando las células con PBS e incubándolas con volumen suficiente del sobrenadante viral para que cubrir la monocapa por 1 h a 37°C. Generalmente se utilizó una multiplicidad de infección o MOI (del inglés *multiplicity of infection*) de 1 o 2. Concluido ese tiempo, las células se lavaron dos veces con PBS y luego se procedió a agregar medio de crecimiento.

Activación de macrófagos

Los ensayos de activación de macrófagos se realizaron sembrando las células a una concentración de aproximadamente 1×10^5 cel/ml. Al día siguiente se trataron las células con 100 nM de PMA (Sigma, Argentina) (Vongsakul et al. 2011) o 100 ng/ μ l de LPS (Lipopolisacárido, Sigma, Argentina) (Classen et al. 2009) 24 hs antes de realizar la infección, previo a lo cual se lavaron las células con PBS.

Análisis de viabilidad celular

Se sembraron las células en una placa de 96 wells ($\approx 10^5$ células/well) y se incubaron ON a 37°C en estufa gaseada con 5% CO₂. Al día siguiente se agregó la dilución viral por triplicado, y se dejaron células sin infectar. El volumen final fue 100 μ l por well. Luego de 24 hs se lavaron las células con PBS, y finalmente se añadieron 10 μ l de una solución de MTT (Sigma, Argentina) 5 mg/ml en PBS en 100 μ l de PBS en cada well. Las placas se incubaron a 37°C por 3 hs y se detuvo la reacción por el agregado de 100 μ l de una solución 20% SDS en dimetil formamida (Carlo Erba) 50% y se dejó la placa en agitación a TA durante 1 h. A continuación la absorbancia fue leída a 550nm y 630nm en un lector de placas (Benchmark Plus microplate spectrophotometer BioRad).

Se calcula la viabilidad como:

$$\text{Viabilidad} = \frac{(\text{Abs}_{550\text{nm}} - \text{Abs}_{630\text{nm}})_{\text{tratado}}}{(\text{Abs}_{550\text{nm}} - \text{Abs}_{630\text{nm}})_{\text{control}}} \times 100$$

Inmunofluorescencia

Para las inmunofluorescencias (IFs) se realizó la fijación de las células con PFA 4% en insertos de vidrio. A continuación se lavaron y se bloqueó el pegado inespecífico por 30 min a TA con buffer de bloqueo (PBS Tween 0,1% + 5% SFB). Transcurrido ese tiempo, se lavaron las células con PBST y se dejaron ON a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente en diluciones generalmente de 1:100 en buffer de bloqueo. Al día siguiente se lavaron las muestras con PBST y se agregó el anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo generalmente en una dilución 1:100 en buffer de bloqueo. La incubación se realizó por 1 h a TA protegido de la luz. A continuación se lavaron las células y se tiñeron los núcleos con DAPI. Luego de dos lavados, las muestras se montaron con líquido de montaje para fluorescencia. Para las tinciones dobles se combinaron los dos anticuerpos a usar al mismo tiempo.

Animales

Los ratones C57BL6/J y C3H/HeJ fueron obtenidos del Bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas, UBA y del Instituto Biológico Argentino SAIC, respectivamente. En todos los casos, los animales recibieron agua y comida *ad libitum*. Se siguieron los lineamientos establecidos por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Los animales C57BL6/J Gal-3 KO fueron provistos por el Dr. Oscar Campetella, IIB, Unsam.

Infección de animales

Las infecciones fueron realizadas por inoculación intraperitoneal (IP) de 200 µl de un stock de $1,1 \times 10^5$ UFP/ml ($2,2 \times 10^4$ UFP) de CVB3 diluído en PBS. Los animales control (Mock) fueron inyectados con 200 µl de PBS.

Depleción de macrófagos

La depleción de macrófagos se realizó por inoculación IP de clodronato encapsulado en liposomas (LipClod) (Van Rooijen et al. 1994; van Rooijen et al. 1997; van Rooijen et al. 2010) a razón de 10 µl/g de peso animal una hora antes de la inyección IP del virus. Como control se inyectaron los animales con 10 µl/g de liposomas vacíos. La depleción se mantuvo inoculando a los animales con la misma dosis cada 5 días.

Citometría de flujo

Animales tratados con liposomas conteniendo clodronato o PBS se sacrificaron con CO₂ y se extrajeron los bazos. A continuación se disgregaron a partir de mallas de acero y las células aisladas fueron incubadas con un anticuerpo anti Iba1 (Abcam) por 20 min a 4°C en PBS/SFB 0.1%. A continuación las células se lavaron y se incubaron con un anticuerpo anti conejo (Santa Cruz Biotechnology) conjugado con FITC por otros 20 min. Luego de otro lavado se analizó el porcentaje de macrófagos mediante citometría de flujo utilizando un Citómetro FACS Calibur (Academia Nacional de Medicina). Para el control de isotipo no se utilizó anticuerpo primario. Se comparó el porcentaje de monocitos de los animales tratados con liposomas vacíos con los tratados con LipClod.

Inhibición de Gal-3

La inhibición de Gal-3 se realizó por inoculación IP de ratones C3H/HeJ con 10 µl/g de peso animal de N-Acetil-D-Lactosamina (Carbosynth), un inhibidor altamente específico de Gal-3 (Demotte et al. 2010; Yu et al. 2012) a razón de 5 µg/g de peso animal diluido en PBS. Las inyecciones se realizaron cada 48 hs.

Histología e inmunohistoquímica

Secciones de tejidos fijadas en PFA 4% y embebidas en parafina de 6 µm de espesor fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) según procedimientos estándares. El procedimiento de inmunohistoquímica (IHQ) ha sido descrito previamente (Gomez et al. 2003). Brevemente, luego de la rehidratación mediante la utilización de xileno y concentraciones decrecientes de etanol, los cortes de tejido montados sobre portaobjetos Pro-Bond Plus (TNT) fueron calentados a 121°C durante 15 min en buffer citrato 10 mM para lograr el desenmascaramiento antigénico. La actividad de la peroxidasa endógena fue inhibida incubando los preparados durante 15 min con 3 % v/v de H₂O₂ en metanol y el bloqueo de sitios no específicos se realizó incubando 20 min a TA con buffer de bloqueo. Los cortes de tejidos fueron incubados con los respectivos antisueros para cada proteína, usualmente en una dilución 1:100 en buffer de bloqueo por 1 h a TA y se procedió de manera equivalente en el resto del proceso. Finalmente, se reveló con un substrato a base de 0,03% diaminobenzidina (DAB) (Sigma) y 0,02% H₂O₂ durante 2–10 min hasta alcanzar la intensidad apropiada y se frenó la reacción con agua destilada. Luego, las muestras fueron contracoloreadas con

hematoxilina por 1 min y lavadas con agua corriente primero y con agua destilada después. Para deshidratar el preparado, se utilizaron concentraciones crecientes de etanol y por último xileno (5 min cada paso). Finalmente, los preparados fueron montados con bálsamo y un cubreobjetos y observados en un fotomicroscopio Nikon E200.

Obtención de RNA total

Las muestras de RNA total derivadas de cultivo celular o tejidos de ratones fueron extraídas con el reactivo TriReagent (Molecular Research Center, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, luego de homogeneizar el tejido mediante la disgregación mecánica utilizando un homogeneizador Bio-Gen PRO200, se realizó una centrifugación durante 10 min a 12.000 x g a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se agregó 0,2 ml de cloroformo por cada ml de TriReagent. Luego de agitar vigorosamente por 15 seg e incubar a temperatura ambiente (TA) durante 2 min, se realizó otra centrifugación a 12.000 x g durante 15 min a 4°C. La fase acuosa superior fue transferida a un nuevo tubo y se agregó 0,5 ml de isopropanol por cada ml de TriReagent a fin de precipitar el RNA. Luego de una incubación a TA de 10 min, se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min a 4°C. El pellet fue lavado con etanol 70% y luego de secarse se resuspendió en 10-40 µl de agua libre de RNasas tratada con DEPC. La concentración y pureza del RNA fue obtenida utilizando un Espectrofotómetro Spectrophotometer ND-100 (Nanodrop Technologies Inc.).

Síntesis de DNA complementario

El DNA complementario (cDNA) fue sintetizado a partir de RNA total utilizando *random hexamers* (Byodinamics, Argentina) y Transcriptasa Reversa MMLV (Promega, Argentina) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se realizó una primer mezcla de reacción conteniendo: 50-250 ng de *random hexamers*, 1 µl de dNTPs (10 mM de cada uno), 0,5 a 1,5 µg de RNA y agua libre de RNasa para completar un volumen final de 13,9 µl. Esta mezcla se calentó a 65°C por 5 min y se enfrió en hielo por al menos 2 min. A continuación se agregaron 4 µl de Buffer MMLV 5X (Promega, Argentina), 1 µl de DTT 0,1 M (Invitrogen), 0,4 µl de inhibidor de RNasas RNase OUT (Invitrogen) y 140 U de Transcriptasa Reversa MMLV (Promega, Argentina). Finalmente, se incubó a 25°C durante 5 min y luego 1 h a 42°C. Las muestras fueron luego incubadas a 70°C durante 15 min a fin de inactivar la enzima y mantenidas a -20°C hasta su uso.

PCR

Las reacciones de amplificación de los ácidos nucleicos se realizaron en el ciclador térmico Mastercycler Gradient (Eppendorf, USA). Para la mezcla de reacción se utilizó buffer de Taq Polimerasa 1X, 2 mM MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP, 0,5 μM de los respectivos *primers*, 1 U de Taq Polimerasa (PB-L, Argentina) y 1 μl de molde en un volumen final de 10 μl. Esta mezcla se sometió a 94°C durante 2 min para una primera desnaturalización. Luego se realizaron de 28 a 40 ciclos de un paso de desnaturalización a 94°C, un *annealing* a la temperatura requerida para cada par de primers y uno de extensión a 72°C, siendo los tiempos de cada etapa acordes al tamaño del amplicón. Finalmente se incubaron 2 min a 72°C para la extensión final. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa. Los *primers* utilizados se encuentran detallados en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia primers utilizados para PCR.

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Producto mRNA
Actina	AACCCCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGACC GGTGATGACCTGGCCGTCAGGCAGCTCGTA	442
Entero	CGGCCCTGAATGCGGCTAA GAAACACGGACACCCAAAGTA	115
Oct -4	CTGGGTTGATCCTCGGACCT CACAGAACTCATACGGCGGG	126
Nanog	AAAGAATCTTCACCTATGCC GAAGGAAGAGGAGAGACAGT	109
GATA-4	CATCAAGACGGAGCCTGGCC TGACTGTCGGCCAAGACCAG	218
GATA-6	CCATGACTCCAACCTCCACC ACGGAGGACGTGACTTCGGC	213
c-myc	ATGAAAAGGCCCCCAAGGTAG CGTTTCCGCAACAAGTCTCT	109
cTnT	ATGATGCATTTTGGGGGTTA CAGCACCTTCTCCTCTCAG	107
MESP1	TGAGGAGCCCAAGTGACAA CTCTCCAGGAAAGGCAGTCT	111
α -MHC	GTCATTGCTGAAACCGAGAATG GCAAAGTACTGGATGACACGCT	413
Isl-1	CACAAGCGTCTCGGGATTGTGTTT AGTGGCAAGTCTTCCGACAA	201

PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR en tiempo real (qPCR), fueron realizadas según se ha descrito previamente (Jaquenod De Giusti et al. 2011). Brevemente, la amplificación de PCR y el análisis posterior fueron realizadas en un LineGene K Thermal Cyclor (Bioer, Japon). Para todas las reacciones se utilizó la mix comercial 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne), siguiendo las instrucciones del fabricante, con 1 μ l de cDNA y 0,5 μ M de cada *primer*. Las curvas de calibración para la cuantificación absoluta fueron generadas a partir de los amplicones purificados, luego de la confirmación de su secuencia. La concentración de los stocks de los estándares, expresadas como el número de copias del amplicón por unidad de volumen, fue calculada a partir de su absorbancia a 260 nm. Las soluciones stock fueron diluidas seriadamente de a 10 veces, para obtener concentraciones de los estándares de 10^7 a 10^4 copias/ μ l. A partir de los valores de ciclo umbral Ct (del inglés *cycle threshold*) de cada muestra y haciendo uso de la curva de calibración se calcularon las concentraciones de las muestras a cuantificar. La concentración del gen de interés se dividió por la del gen *housekeeping* (actina) para obtener los valores de expresión normalizados. Los *primers* utilizados se encuentran detallados en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencia primers utilizados para qPCR.

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Producto mRNA
IFNB	CACAGCCCTCTCCATCAACT TCTTGAAGTCCGCCCTGTAG	125
Actina	CGTCATCCATGGCGAACTG GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT	60
Gal-3	GACCACTGACGGTGCCCTAT GGGGTTAAAGTGGAAGGCAA	149
Entero	CGGCCCTGAATGCGGCTAA GAAACACGGACACCCAAAGTA	115
SMA	GCTCTGCCTCTAGCACACAA GCCAGGGCTACAAGTTAAGG	150
proColl	TTCACCTACAGCACCTTGTG GATGACTGTCTTGCCCAAGTT	66
TGFb1	TGCGCTTGACAGAGATTA AGGTAACGCCAGGAATTGTTGCTA	82
INOS	CAGCTGGGCTGTACAAAC CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG	94
Arginasa I	AGCAGCAGCCGCTGGAACCCAGA AGGCCAGGTCCCGTGGTCTCTCA	192

Electroforesis en geles de agarosa

Se prepararon soluciones de agarosa desde 0,8 a 2% p/v en buffer TAE suplementado con Bromuro de Etidio (0,5 µg/ml), las cuales se fundieron al momento de usar. Una vez solidificado, el gel se colocó en una cuba de electroforesis y se lo cubrió con buffer TAE. Las muestras de DNA se mezclaron previamente con buffer de siembra y se sembraron. Los productos de PCR se resolvieron aplicando un voltaje entre 90-120 V de acuerdo al tamaño.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Los lisados de células o tejidos, obtenidos luego de una homogenización en buffer Ripa (NaCl 150 mM, Triton x-100 1%, Sodium deoxycholate 1%, SDS 0.1%, EDTA 1 mM, PMSF 1mM, leupeptin 1 µg/ml en Tris-HCl 50 mM pH 7.4) fueron realizados según se ha descrito previamente (Jaquenod De Giusti et al. 2011). Brevemente, las muestras fueron centrifugadas durante 2 min a 14.000 rpm y los sobrenadantes fueron mezclados con Sample Buffer 2X (Tris-Cl 100mM, pH 6.8, DTT 200 mM, SDS 4%, bromofenol blue 0.2% y glicerol 20%) y hervidas por 10 min. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE en geles al 10% (p/v) utilizando el equipo Mini-Protean Tetra Cell Gel (Bio-Rad, USA), empleando TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) como buffer de corrida y voltajes constantes entre 90 y 200 V.

Western blot

Los *western blots* (WB) fueron realizados según se ha descrito previamente (Jaquenod De Giusti et al. 2011). Brevemente, los lisados de tejidos o células, obtenidos luego de una homogenización en buffer Ripa, fueron resueltos en geles de poliacrilamida como se describió anteriormente. A continuación, las muestras fueron transferidas a membranas de PVDF (Hybond™-P, Amersham Biosciences), utilizando el equipo Trans-Blot® SD (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, la membrana fue activada por 10 seg en metanol y 5 min en agua, a continuación tanto la membrana como el gel fueron equilibrados en el buffer de transferencia (48 mM Tris, 39 mM glicina y 20% metanol) durante 15 min. Luego, se colocaron dos papeles de filtro embebidos en el buffer de transferencia sobre el ánodo (base). Sobre éstos se colocó la membrana, el gel, otros dos papeles de filtro y el cátodo (tapa). La transferencia se realizó durante 30 min a 15 V. Las membranas fueron incubadas overnight (ON) a 4°C con PBS Tween 0,1% (PBST) y 5% de leche descremada. Al día siguiente, y luego de varios lavados con PBST, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios

correspondientes por 1 h a 37°C. Luego de sucesivos lavados, se incubaron con anticuerpos anti IgG especie específicos biotinilados o unidos a peroxidasa o HRP 1 h más a 37°C. La detección final se realizó mediante quimioluminiscencia o ECL (del inglés, *enhanced chemiluminescence*). Las soluciones utilizadas fueron: A) H₂O₂ 30 volúmenes 0,64 % (v/v) en Tris HCl 0,1 M pH = 8,5; y B) 2,5 mM de Luminol (Sigma, Argentina) y 0,4 mM de Ácido Cumárico (Sigma, Argentina) en Tris HCl 0,1 M. Estas soluciones se mezclaron en partes iguales al momento de usar y la membrana se incubó por unos segundos en la solución resultante. La adquisición se realizó utilizando el programa LabWorks™ 4.6 (Image Acquisition and Analysis Software). De las bandas obtenidas se cuantificó la intensidad de luz y los valores de expresión de las proteínas estudiadas se dividieron sobre los de actina para cada muestra de tal forma de obtener los valores de expresión normalizados.

ELISA de Galectina 3

Para la medición de los niveles de Gal-3 en los sobrenadantes celulares se utilizó el Kit DuoSet ELISA Development System (RD, USA) para Gal-3 murina de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se preparó una placa de 96 wells con 100 µl por well del anticuerpo de captura (anti Gal-3 de rata) diluido a una concentración de 200 ng/ml en diluyente de reactivos o DR, (1% BSA en PBS, pH 7,2-7,4) y se incubó ON a TA. A continuación se descartó el anticuerpo y se lavó la placa 3 veces con buffer de lavado (0.05% Tween 20 en PBS, pH 7,2-7,4). Se realizó el bloqueo del pegado inespecífico con 300 µl de DR por well y se incubó a TA por 1 h. Luego de 3 lavados sucesivos, se adicionaron 100 µl por well de las muestras por duplicado o de la solución de Gal-3 murina recombinante estándar diluidas en DR, se cubrió la placa y se incubó por 2 hs a TA. Transcurrido ese plazo, se lavó 3 veces con buffer de lavado y se adicionaron 100 µl por well de anticuerpo de detección (anti Gal-3 de cabra biotinilado) en una concentración de 200 ng/ml en DR y se incubó otras 2 hs a TA. Se lavó nuevamente como en los pasos anteriores y se adicionó 100 µl de estreptavidina-HRP. Se incubó durante 20 min a TA al resguardo de la luz. Para detener la reacción se adicionaron 50 µl de H₂SO₄ 2N y se leyó la absorbancia a 450 nm. Con las lecturas de absorbancia de las diluciones del estándar de Gal-3 se realizó una curva de calibración. Se determinó la concentración de Gal-3 de las muestras por interpolación.

The background features a repeating pattern of overlapping white circles, creating a mesh-like structure. The circles are arranged in a staggered grid, with each circle partially overlapping its neighbors. The background color transitions from a light blue at the top to a light green at the bottom.

III. Resultados

1. Expresión de los receptores celulares y su correlación con la susceptibilidad a la infección por virus Coxsackie B (CVB) en células cardíacas murinas y humanas y en ratones de distintas cepas

La mayor parte de nuestro conocimiento respecto de la patogénesis de la infección por CVB deriva de estudios realizados en modelos experimentales (Kandolf et al. 1985; Gomez et al. 1993). Utilizando modelos murinos, se ha observado que la susceptibilidad de las células a la infección por CVB está directamente relacionada con la presencia de su receptor CAR en la superficie de las mismas por lo que ha sido propuesto como un determinante mayor de patogenicidad (Shafren et al. 1997; Noutsias et al. 2001; Poller et al. 2002; Shi et al. 2009). Por lo tanto, el tropismo tisular de CVB ha sido relacionado con la expresión diferencial del receptor entre los distintos órganos (Freimuth et al. 2008). En estudios murinos se ha descrito que a nivel del SNC, CAR se expresa en forma incrementada a nivel fetal comparada con adultos con un pico cercano al nacimiento y su expresión varía respecto al área cerebral (Freimuth et al. 2008). Esta expresión aumentada en el recién nacido respecto del ratón adulto correlaciona con la mayor susceptibilidad de los primeros respecto de los segundos a la infección por CVB (Ahn et al. 2008). Por otro lado, como se ha detallado en la Introducción, la función del co-receptor DAF ha sido descrita en células epiteliales polarizadas como las del epitelio intestinal donde estos virus inician la infección del huésped (Coyne et al. 2006) pero no en células cardíacas.

Al momento de comenzar este trabajo no había sido estudiada la correlación entre la expresión de CAR y DAF y la susceptibilidad a la infección por CVB en células cardíacas. En este sentido, es importante destacar que se ha descrito en el corazón humano que la expresión de CAR se encuentra incrementada en la CMD a nivel de los discos intercalares (Shaw et al. 2004) abriendo importantes incógnitas sobre las consecuencias de este evento, incluyendo si tiene relación con una mayor susceptibilidad de esos pacientes a la infección cardíaca por CVB.

Por lo expuesto, se consideró de importancia estudiar la correlación entre la presencia de CAR y DAF y la susceptibilidad a la infección por CVB en células cardíacas. Para ello, se diseñaron diversos experimentos empleando modelos *in vitro*. Teniendo en cuenta que la obtención de cultivos de cardiomiocitos humanos adultos es inviable y que los cultivos derivados de tejidos fetales son ilegales o muy difíciles de obtener, se utilizaron cultivos de células cardíacas diferenciadas a partir de hESCs (del inglés, *human embryonic stem cells*).

Asimismo, se buscó correlacionar los niveles de CAR con la susceptibilidad diferencial observada en dos cepas de ratones utilizados como modelos de miocarditis viral.

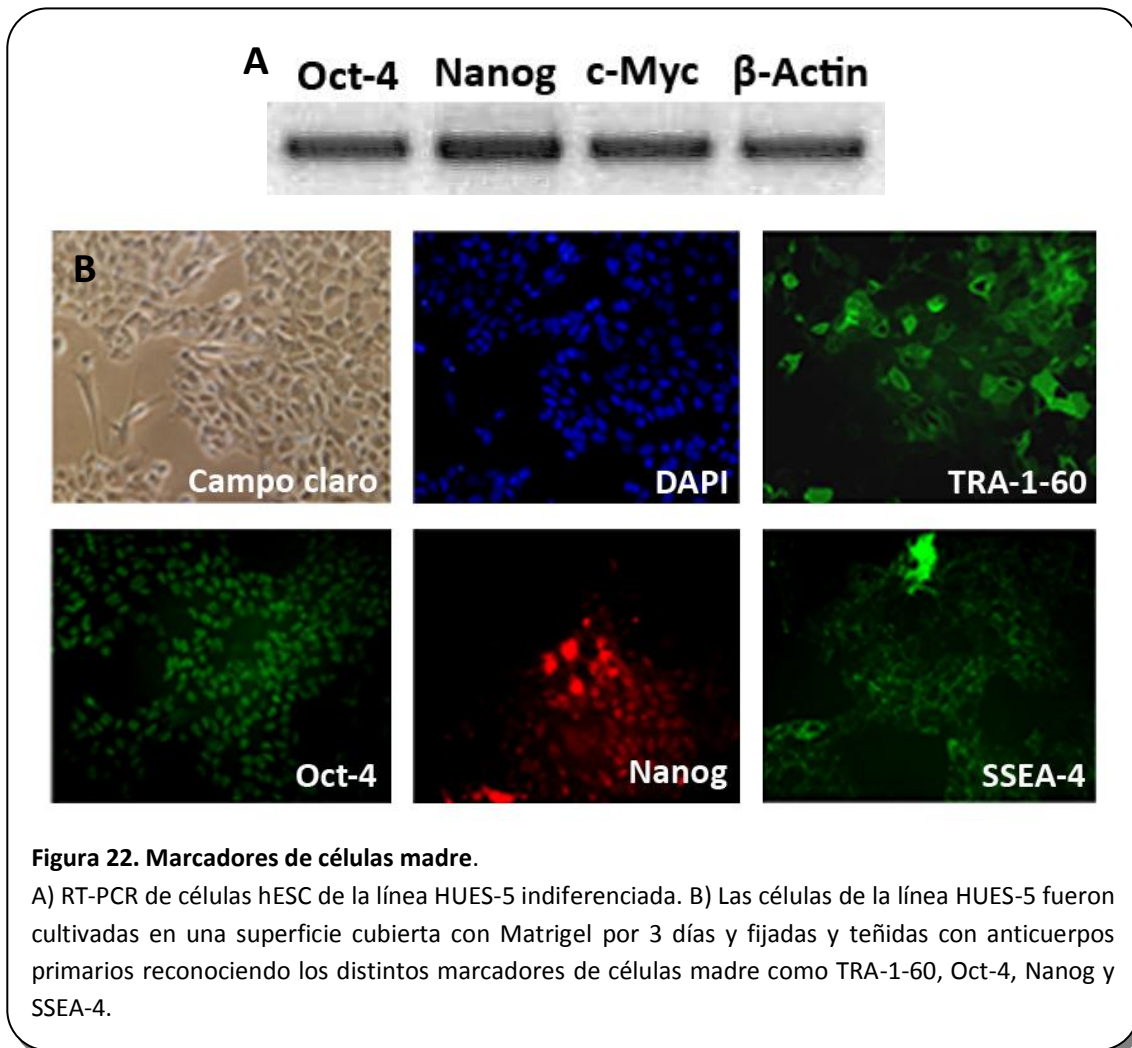
3-A. Células cardíacas humanas

Las hESCs derivan de la masa celular interna de un embrión temprano y poseen un potencial de desarrollo único. Las hESCs se definen como pluripotentes por su capacidad de poder diferenciarse en todos los tipos celulares presentes en las tres capas germinativas: endodermo, mesodermo y ectodermo (Ohtsuka et al. 2008). Las hESCs se renuevan constantemente y pueden ser cultivadas y diferenciadas a varios linajes *in vitro*. Debido a que son capaces de ser diferenciadas a células cardíacas, estas células se consideran una herramienta poderosa para estudiar distintos eventos a nivel celular y molecular que afecten al corazón (Lev et al. 2005), incluyendo patogénesis molecular y pruebas farmacológicas (Reppel et al. 2007; Steel et al. 2009).

A fin de desarrollar nuestro objetivo, se caracterizaron las células hESC de la línea HUES-5 en base a marcadores de diferenciación y luego estudiamos la expresión de CAR y DAF y la susceptibilidad a la infección por CVB en función del grado de diferenciación.

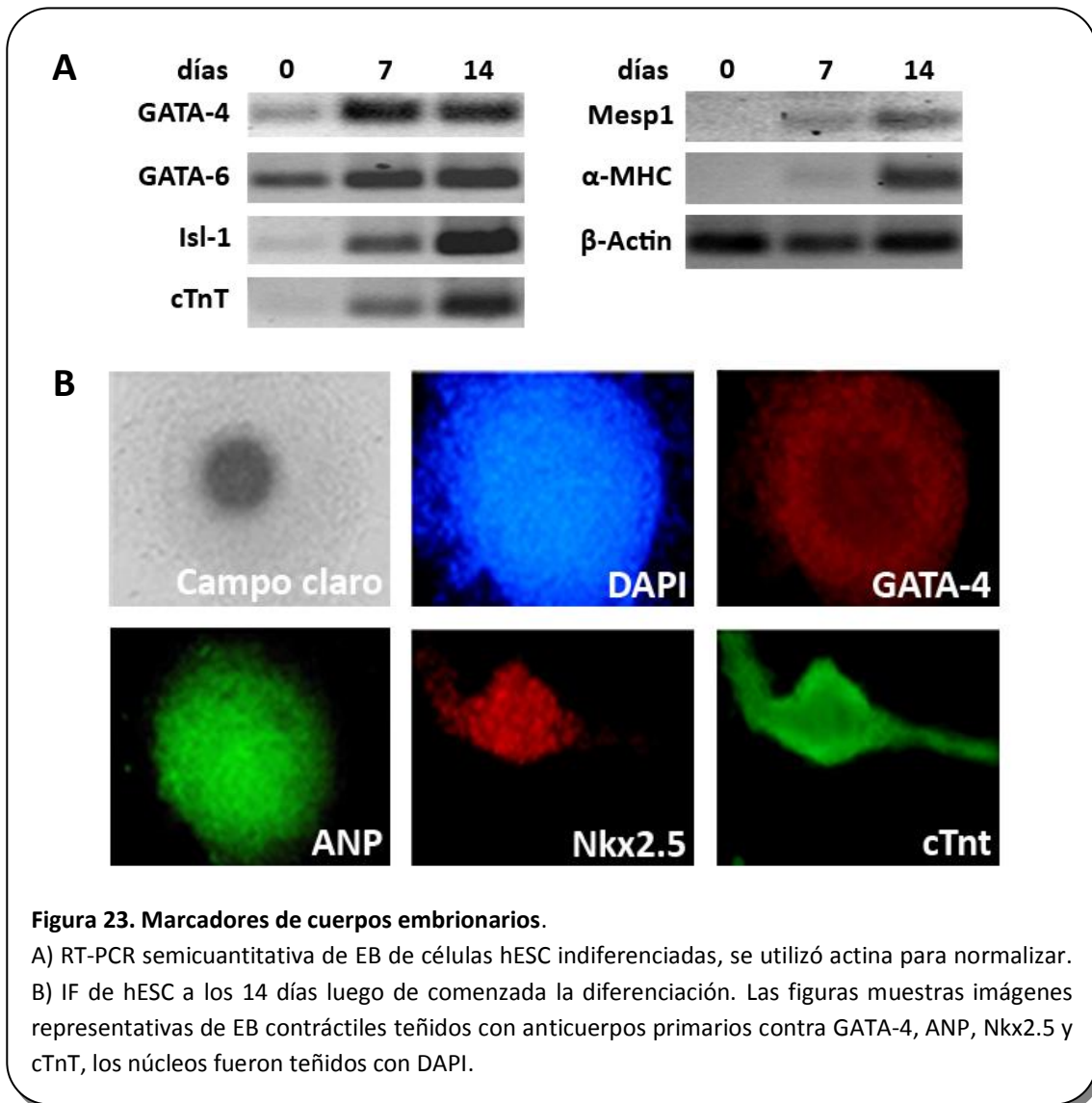
i. Las células utilizadas expresan marcadores de pluripotencialidad

Para confirmar la naturaleza pluripotente de las células hESC de la línea HUES-5 se realizó RT-PCR e IF. Los resultados mostraron que las células hESC indiferenciadas expresan transcritos asociados a la pluripotencia como Oct-4 (Octamer 4), Nanog y c-Myc (Figura 22A) y marcadores asociados a células madres como TRA1-60 (Tumor Rejection Antigen 1-60), Oct-4, Nanog y SSEA-4 (Stage-Specific Embryonic Antigen) (Figura 22B).



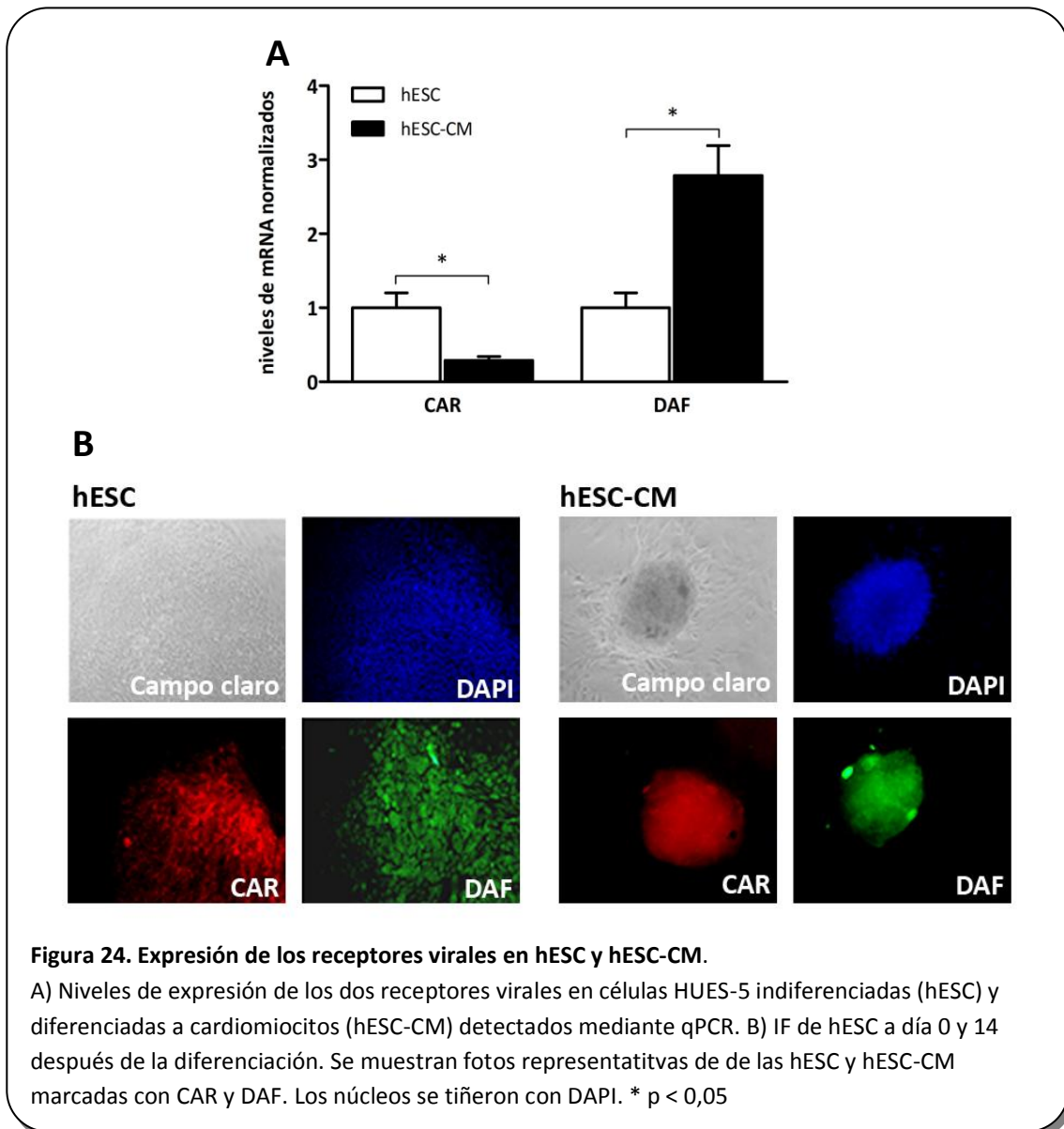
ii. Las hESC diferenciadas expresan marcadores cardíacos

A continuación se indujo la diferenciación de hESC en EB. Para confirmar que los EB habían adquirido un fenotipo cardíaco, se realizaron nuevamente RT-PCR e IF. A los 7 y 14 días luego de inducida la diferenciación se analizó la expresión de genes asociados a: a) mesodermo (Mesp1), b) mesodermo cardíaco (GATA-4, GATA-6, Nkx2.5, Islet-1), y c) genes asociados a cardiomiocitos como (ANP, cTnT y α -MHC). Los resultados demostraron que las hESC se diferenciaron efectivamente en EB conteniendo cardiomiocitos (hESC-CM) *in vitro* (Figura 23).



iii. Los niveles de los receptores CAR y DAF se modulan con la diferenciación

A continuación se estudió la expresión de los receptores virales CAR y DAF en las células hESC y en las hESC-CM (Figura 24A), observándose que el nivel de transcripto de CAR fue significativamente mayor en células indiferenciadas, mientras que los niveles de mRNA de DAF resultaron más elevados en las células diferenciadas. La presencia de ambos receptores fue confirmada por estudios de IF (Figura 24B).



iv. Tanto las hESC como las hESC-CM son susceptibles a la infección por CVB

Con el objetivo de evaluar la susceptibilidad a la infección de las hESC y las hESC-CM, las células fueron infectadas con CVB3. Se muestran los resultados representativos de la PCR y la IF para las células infectadas por CVB3 (Figura 25).

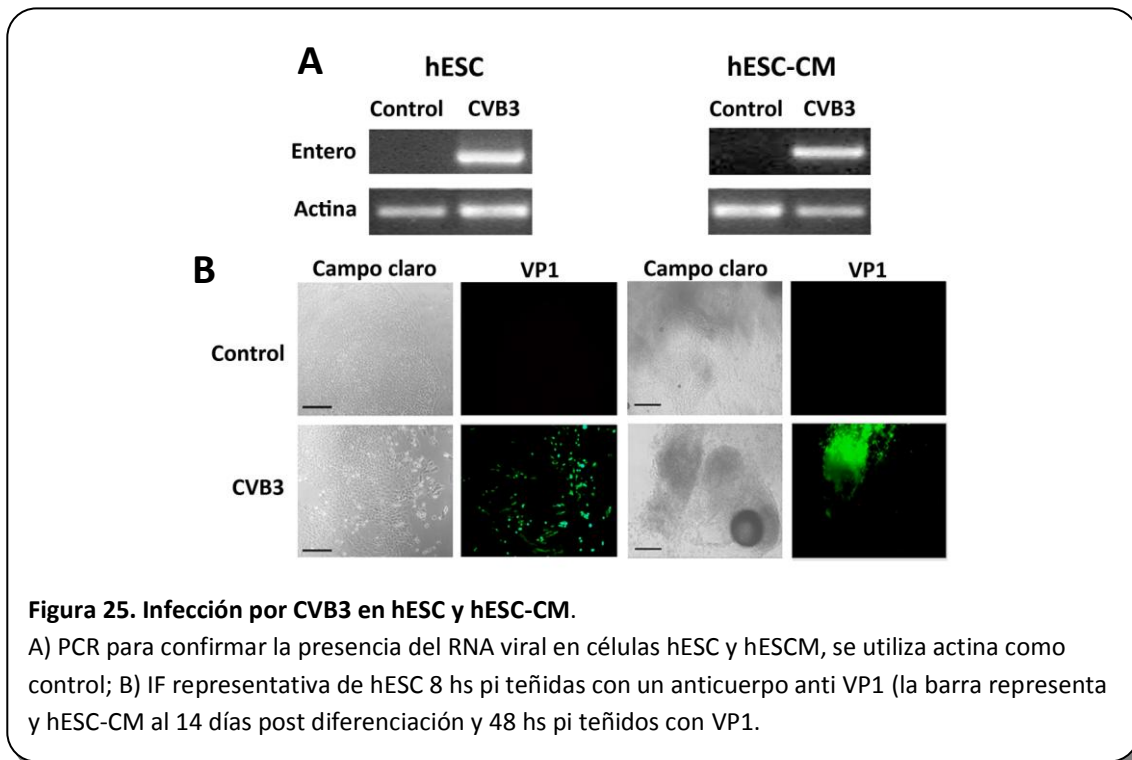


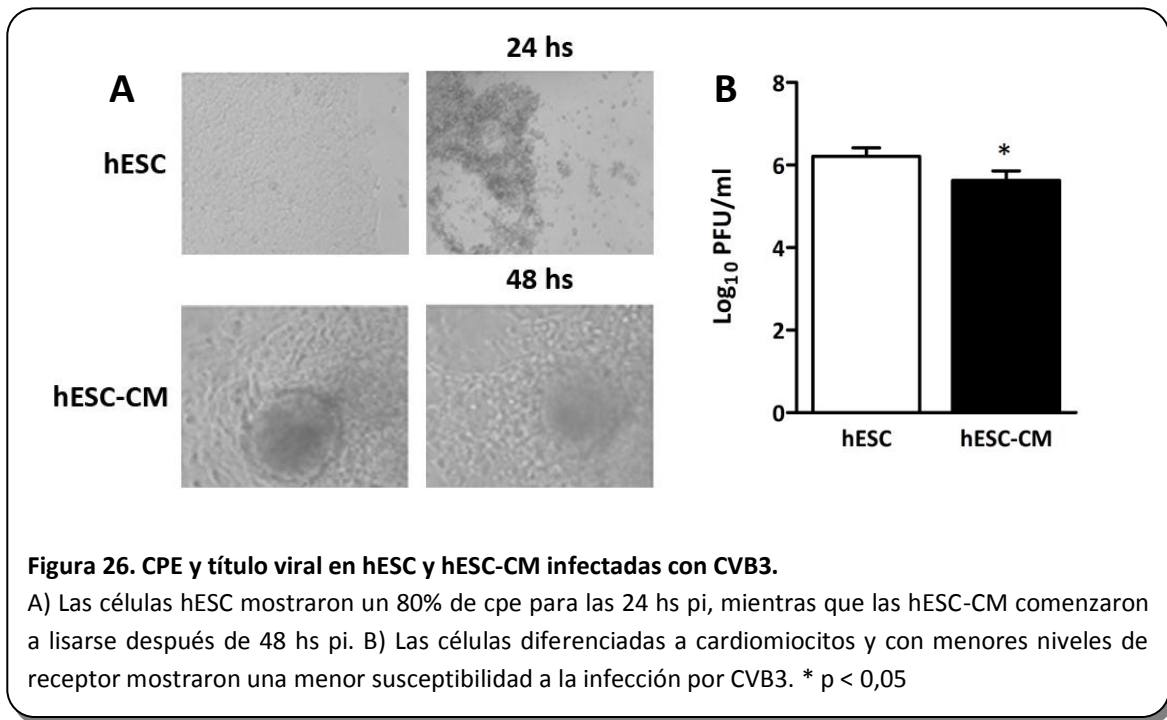
Figura 25. Infección por CVB3 en hESC y hESC-CM.

A) PCR para confirmar la presencia del RNA viral en células hESC y hESC-CM, se utiliza actina como control; B) IF representativa de hESC 8 hs pi teñidas con un anticuerpo anti VP1 (la barra representa) y hESC-CM al 14 días post diferenciación y 48 hs pi teñidos con VP1.

Como se puede observar, tanto las células hESC como las hESC-CM fueron susceptibles a la infección por CVB.

v. Se observa una menor susceptibilidad a la infección en las hESC-CM

En las células hESC se observó efecto citopático enteroviral característico (redondeamiento seguido de despegue de la superficie y muerte) en las 12 hs posinfección (pi) completando el 80% de la monocapa a las 24 h pi. Las células hESC-CM tuvieron un comportamiento similar perdiendo su capacidad contráctil a las 48 hs seguido de lisis celular (Figura 26A). La titulación de los sobrenadantes de infección de estas células demostró una menor susceptibilidad a la infección en hESC-CM respecto de las hESC (Figura 26B).



vi. La infección disminuye la viabilidad celular

Se estudió la viabilidad celular por el ensayo de MTT. El 20% de las hESC y las hESC-CM se mantuvieron viables por 24 o 48 hs luego de la infección con CVB3. La infección con tres MOI distintas condujo a una menor pérdida de la viabilidad en las hESC-CM, coherente con una menor susceptibilidad a la infección por la presencia de menor cantidad de CAR (Figura 27).

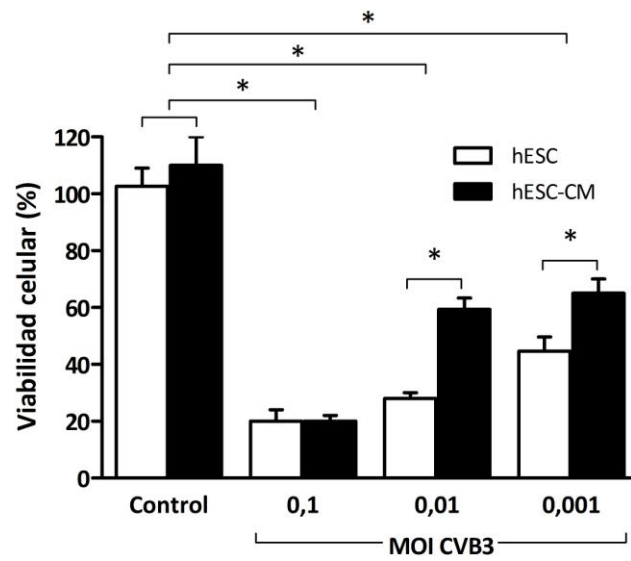


Figura 27. Viabilidad celular de las hESC y hESC-CM con la infección.

Las células hESC y hESC-CM fueron infectadas con CVB3 a distintas MOI. En ambas líneas, la infección con MOI = 0,1 condujo a una pérdida de viabilidad del 80% que se fue recuperando con las distintas diluciones, siendo mayor la recuperación en las hESC-CM.

* $p < 0,05$

3-B. Células murinas

i. Obtención de cardiomiocitos murinos

Se realizaron extracciones de cardiomiocitos murinos de ratones C3H/HeJ recién nacidos (RN, hasta 48 hs) y de animales adultos (3-6 semanas de edad). Los cardiomiocitos de RN no presentaron la morfología de cardiomiocitos diferenciados como en el caso de los derivados de los adultos; no obstante, luego de 24 hs en cultivo fueron capaces de latir (Figura 28).

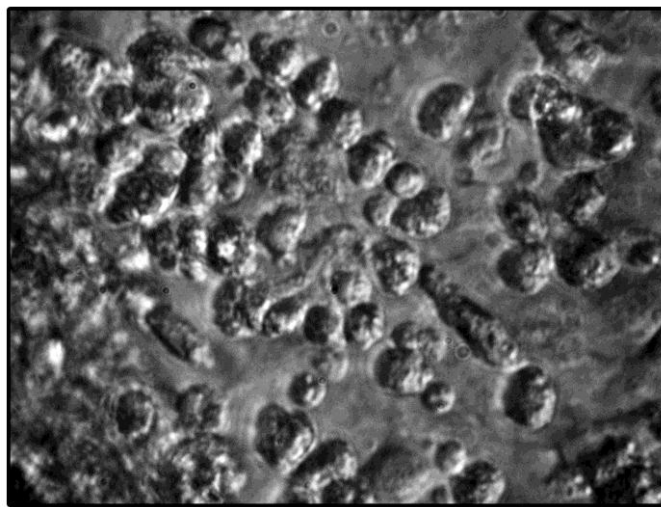


Figura 28. Aislamiento de cardiomiocitos de ratón recién nacido.
Se muestra el resultado de una extracción representativa. Las células presentaban capacidad contráctil luego de un día adheridas.

A continuación se realizó la extracción de cardiomiocitos de ratones adultos. Para ello, se adaptaron protocolos previamente descritos para cardiomiocitos de ratones RN, junto con otros protocolos para aislamiento de cardiomiocitos de animales adultos por canulación de la aorta (Cambon et al. 1997; Zhou et al. 2000; O'Connell et al. 2007; Shioya 2007) que consideran la necesidad de lavados con soluciones de Ca^{+2} crecientes. Los resultados de una extracción se muestran en la Figura 29.

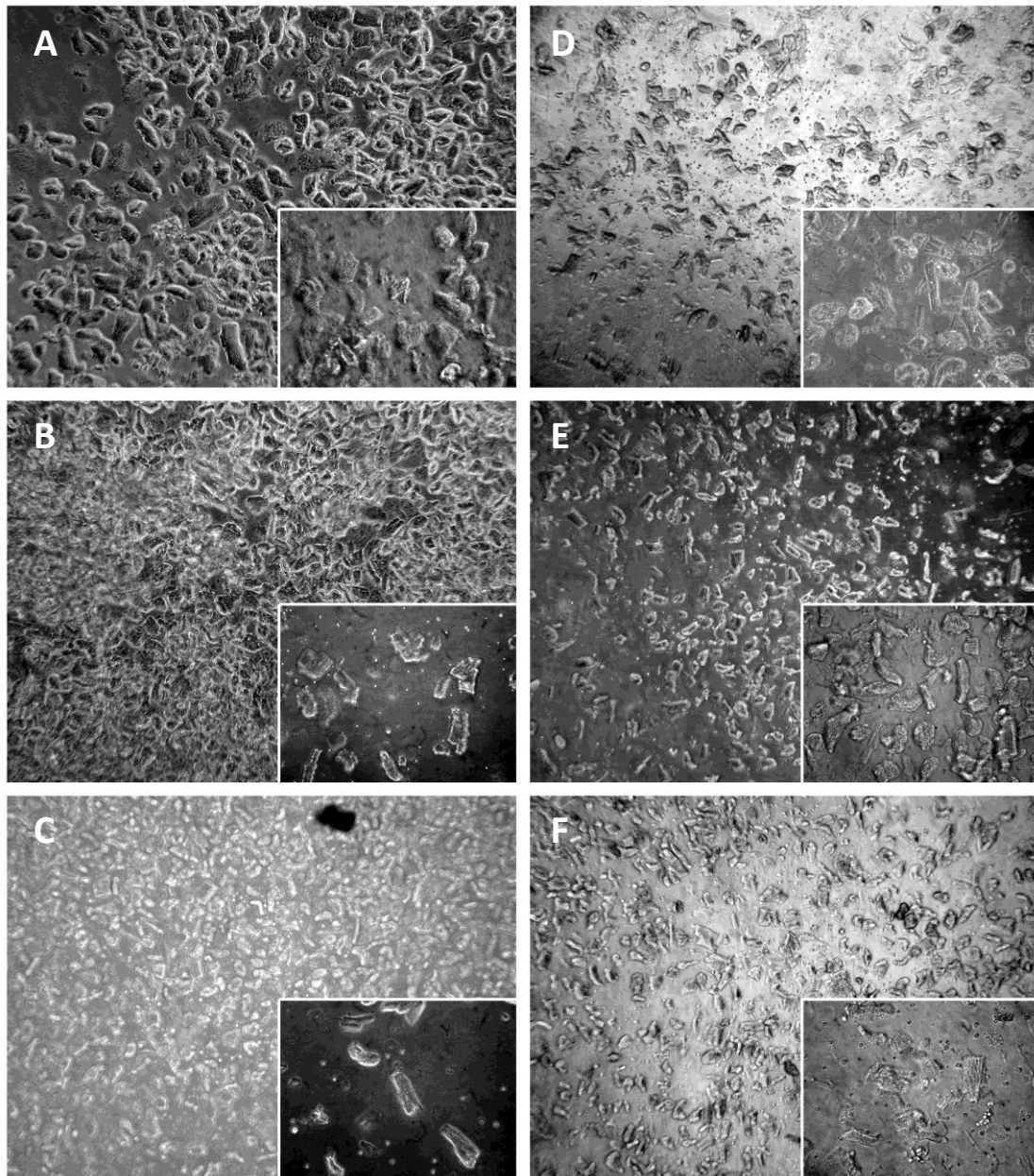


Figura 29. Pasos de la restitución de calcio hasta llegar al medio de crecimiento DMEM.

A) Sol Ca I B) Sol Ca II; C) Sol Ca III; D) Sol Ca IV; E) Sol Ca V; F) DMEM. Se muestran imágenes representativas de una extracción. Aumentos 10X y 40X.

Una vez aisladas las células adultas y de RN se procedió a su estudio en forma similar lo realizado en células humanas.

ii. **Los niveles del receptor CAR se modulan con la diferenciación celular**

Los análisis por qPCR y WB demostraron una disminución en los niveles de mRNA y proteína de CAR en los cardiomiocitos obtenidos de animales adultos comparados con los de RN (Figura 30).

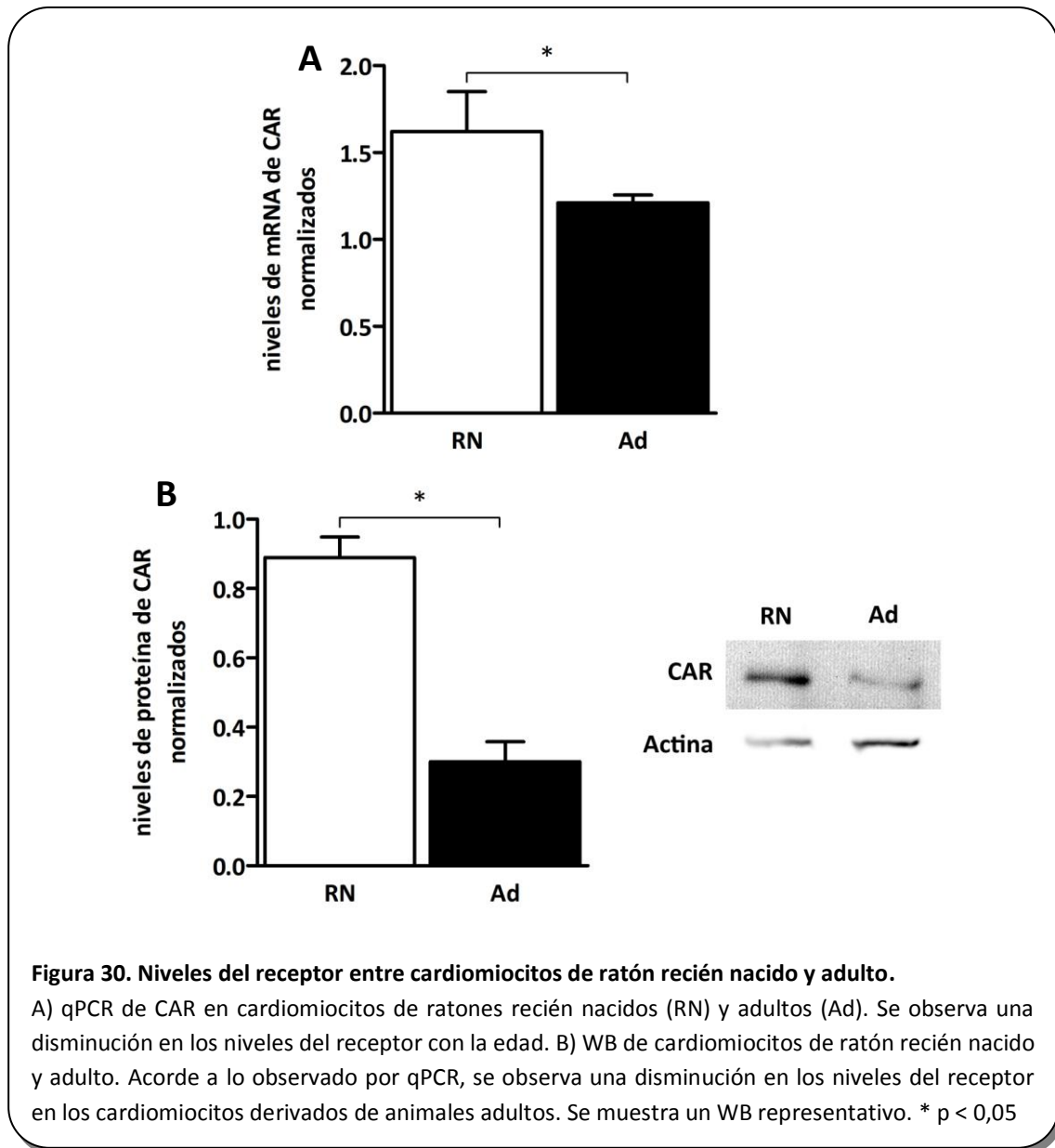


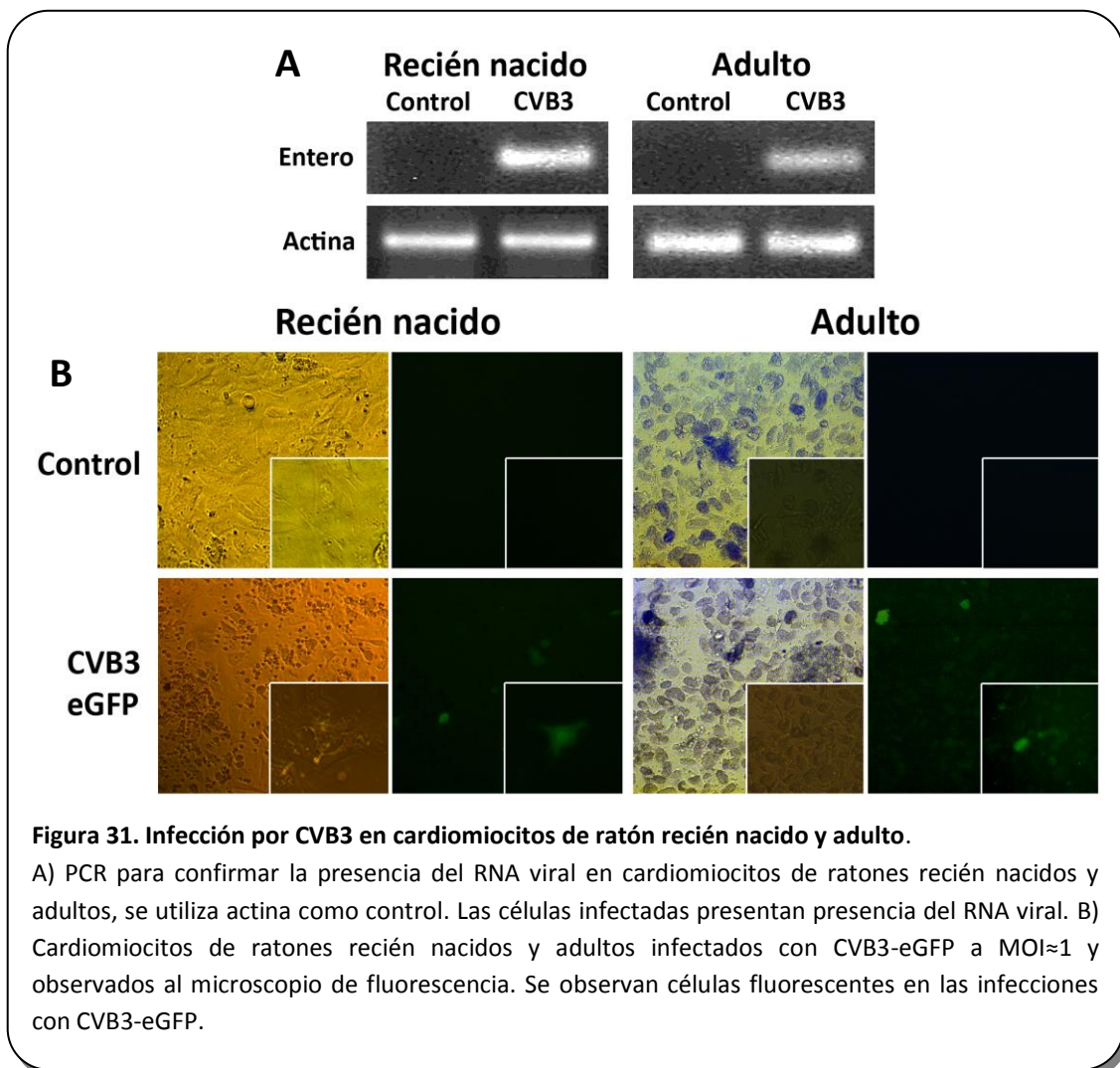
Figura 30. Niveles del receptor entre cardiomiocitos de ratón recién nacido y adulto.

A) qPCR de CAR en cardiomiocitos de ratones recién nacidos (RN) y adultos (Ad). Se observa una disminución en los niveles del receptor con la edad. B) WB de cardiomiocitos de ratón recién nacido y adulto. Acorde a lo observado por qPCR, se observa una disminución en los niveles del receptor en los cardiomiocitos derivados de animales adultos. Se muestra un WB representativo. * $p < 0,05$

iii. Tanto los cardiomiocitos derivados de ratones recién nacidos como de ratones adultos son susceptibles a la infección por CVB3

Con el objetivo de evaluar la susceptibilidad a la infección de los cardiomiocitos murinos, las células fueron infectadas con CVB3 a una MOI ≈ 1 y a las 24 hs pi se realizó una RT-PCR para confirmar la presencia del RNA viral (Figura 31A).

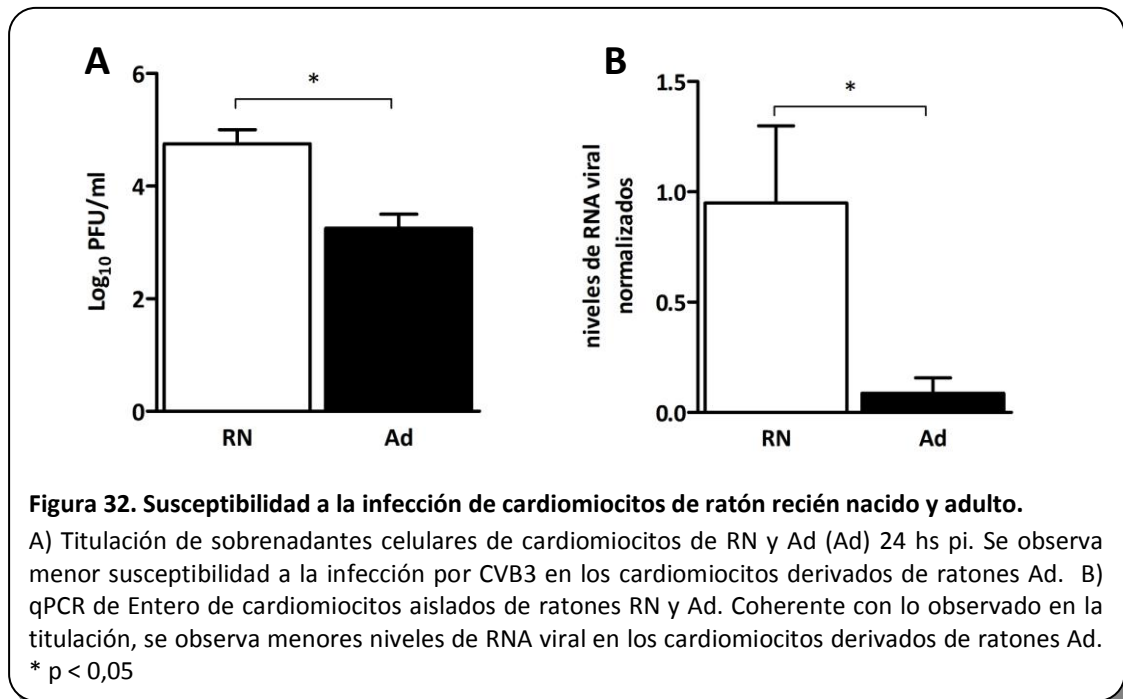
A su vez, las mismas células fueron infectadas a una MOI similar con CVB3-eGFP. Tanto los cardiomiocitos de ratones recién nacidos como de ratones adultos (Figura 31B), presentaron fluorescencia verde al ser iluminadas con luz UV, confirmando su susceptibilidad a la infección viral.



Como se puede observar, ambos tipos celulares permitieron la infección viral.

iv. Se observó una menor susceptibilidad a la infección en los cardiomiocitos de animales adultos

A continuación se analizó si la disminución en los niveles del mRNA de CAR en los cardiomiocitos derivados de ratones adultos correlacionaría con una disminución en la susceptibilidad a la infección de estas células. La titulación de los sobrenadantes celulares y la cuantificación del RNA viral de estas células demostró una menor susceptibilidad a la infección en los cardiomiocitos derivados de animales Ad al compararlos con los RN (Figura 32).



3-C. Análisis de la susceptibilidad en ratones de cepas distintas.

Como ya se ha mencionado, los modelos murinos son de mucha utilidad para el estudio de la miocarditis viral inducida por CVB3. Sin embargo, existen variaciones entre las cepas murinas que determinan la patología resultante. Se conoce que la susceptibilidad varía con la cepa del ratón utilizada (Hsu et al. 2000; Ahn et al. 2008; Jakel et al. 2009; Li et al. 2009), mientras que en resultados ya mostrados pudimos observar una variación en los niveles de CAR con la edad (Figura 30). Fue en este contexto que surgió el interés de analizar los niveles de CAR como eventual causa de la susceptibilidad diferencial entre ratones de la misma edad de las cepas C3H/HeJ y C57BL/6.

i. Menor susceptibilidad a la infección viral en ratones C57BL/6

Se analizó la susceptibilidad a la infección viral en ratones de las cepas C3H/HeJ y C57BL/6. Animales de 5 semanas de edad fueron inoculados con $2,2 \times 10^4$ UFP de CVB3 y las muestras de corazón se cosecharon a 3 dpi para evaluar el título viral. Los resultados mostraron un aumento en el título viral en corazones de los animales C3H/HeJ comparados con los C57BL/6 (Figura 33).

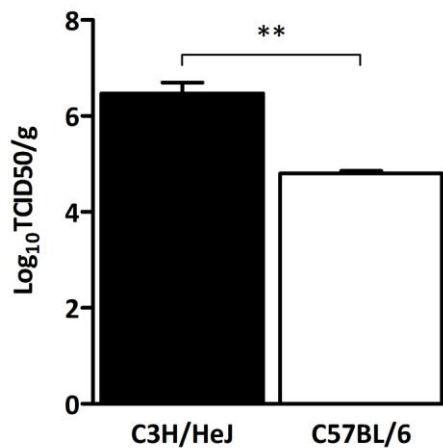
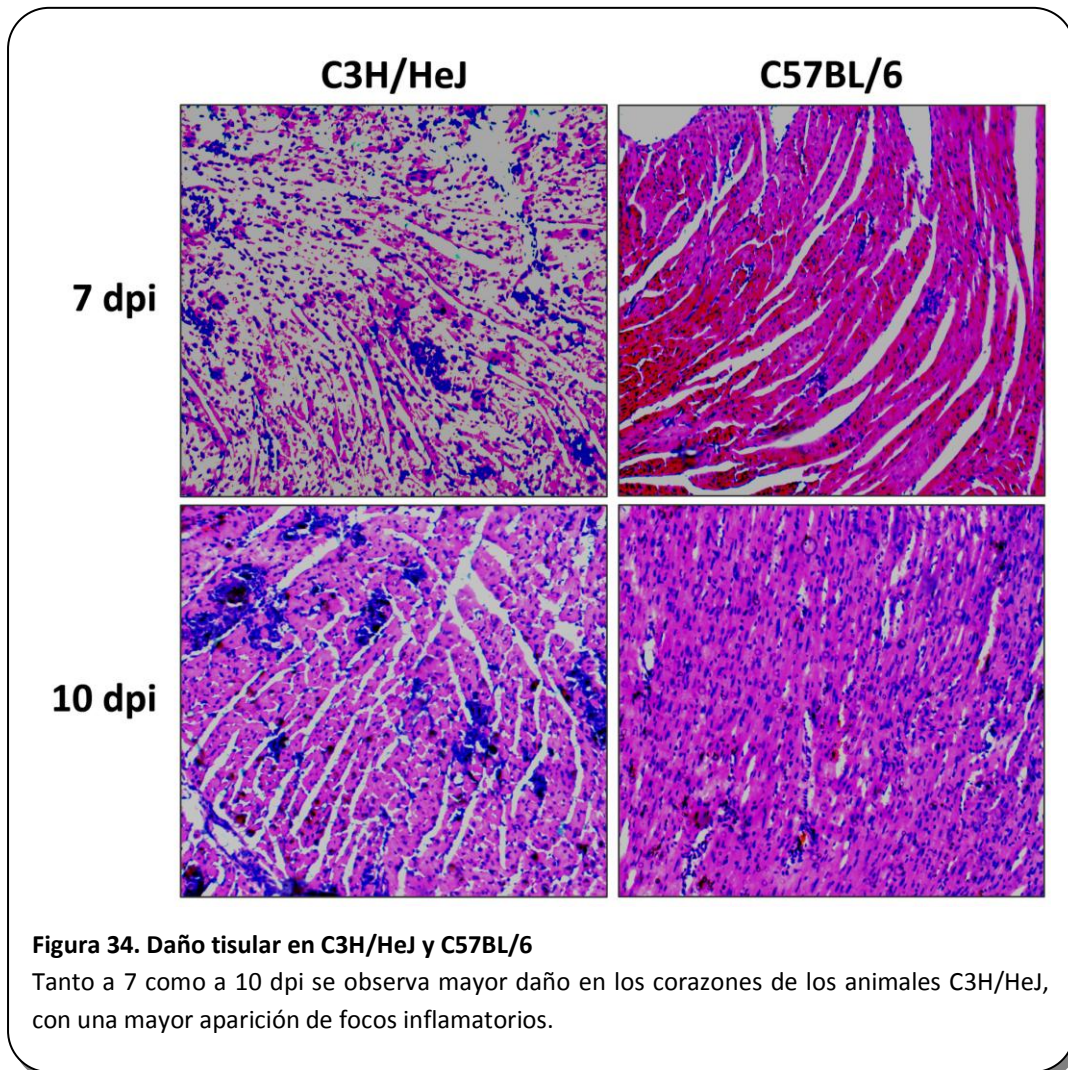


Figura 33. Título viral en las dos cepas de ratones a 3 dpi.

Titulación de corazones aislados de ratones C57BL/6 y C3H/HeJ a 3 dpi luego de la infección con CVB3. Se observa menor título viral en corazones aislados de ratones de la cepa C57BL/6. ** $p < 0,01$

ii. Menor grado de injuria tisular en ratones C57BL/6

Se analizaron los niveles de injuria tisular en ratones de las cepas ya mencionadas a 7 y 10 dpi. Los resultados mostraron un aumento en la patología en los animales C3H/HeJ comparados con los C57BL/6, en correlación con la mayor susceptibilidad a la infección de esta cepa (Figura 34).



iii. Menores niveles de CAR en ratones C57BL/6

Habiéndose observado diferencias en la susceptibilidad a la infección por CVB3 entre ratones C3H/HeJ y C57BL/6 se procedió a evaluar en los mismos los niveles del receptor en el tejido cardíaco. Los resultados obtenidos mostraron que los ratones de la cepa C3H/HeJ presentaron mayores niveles del mRNA de CAR en corazón (Figura 35), lo que podría justificar su mayor susceptibilidad a la infección.

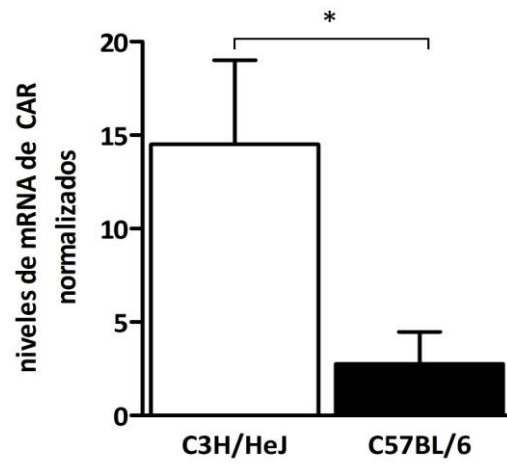


Figura 35. Niveles de CAR en ratones de las cepas C3H/HeJ y C57BL/6
Se observa mayores niveles del receptor en la cepa C3H/HeJ. * $p < 0,05$

Discusión

Aunque las células madres embrionarias murinas han sido cultivadas por casi 20 años, las condiciones de cultivo para las hESC han permanecido elusivas y han tomado de los investigadores mucho más tiempo para definir estas complejas condiciones. Las células madres embrionarias humanas fueron descubiertas hace una década, luego que Thomson y col. desarrollaron un sistema de cultivo que podía mantener a las hESC en un estado indiferenciado indefinidamente (Thomson et al. 1998). En años recientes, múltiples protocolos se han desarrollado para producir células adultas *in vitro*. Kehat y col., fueron los primeros en demostrar que las hESC pueden diferenciarse a cardiomiocitos (Kehat et al. 2001). Múltiples publicaciones posteriores probaron que estas células eran cardiomiocitos maduros, como definían a los mismos sus expresiones génicas y proteicas, así como sus propiedades fisiológicas (Xu et al. 2002; He et al. 2003). Aunque los cardiomiocitos derivados de hESC probablemente retienen aspectos relacionados a su origen fetal son, no obstante, lo suficientemente maduros para latir espontáneamente y para responder a señales de su superficie celular, tales como la incubación con noradrenalina, que rápidamente incrementa su tasa de latidos.

Relativamente pocos estudios han evaluado la expresión de CAR en las hESC. Un trabajo reciente ha reportado diferencias significativas en las tasas de infección de adenovirus entre distintas líneas de hESC, correlacionando estas diferencias con los niveles de expresión de CAR (Brokhman et al. 2009). En la línea celular estudiada en este trabajo HUES-5, los niveles del transcripto de CAR fueron encontrados siempre en forma más abundantes en hESC que en las hESC-CM, un hallazgo que concuerda con los niveles de expresión encontrados en los tejidos cardíacos embrionarios y adultos (Freimuth et al. 2008).

Con respecto a DAF, una proteína presente en la superficie de los cardiomiocitos normales (Zimmermann et al. 1990), su respectivo mRNA fue expresado en la línea celular estudiada. Sin embargo, en contraste a CAR, los niveles de mRNA fueron superiores en hESC-CM que en las hESC, menos diferenciadas.

Tanto CAR como DAF han sido implicadas en la infección por CVB. Los eventos moleculares subyacentes al ingreso de CVB han sido descritos para células polarizadas (Coyne et al. 2006) y no polarizadas (Patel et al. 2009) y la ausencia de CAR específicamente en corazón ha demostrado proteger contra la miocarditis viral inducida por CVB3 (Kallewaard et al. 2009; Shi

et al. 2009). Sin embargo, los mecanismos exactos involucrados en la infección de cardiomiocitos por CVB permanecen desconocidos.

Más aún, algunos aspectos de la infección podrían ser específicos para las células humanas. Por ejemplo, CVB puede interactuar con CAR humano y murino. Sin embargo, a diferencia del DAF humano, los CVB no se unen a la proteína análoga al DAF murino (Spiller et al. 2000) excluyendo el uso de un modelo murino apropiado. Adicionalmente, el diseño de un sistema modelo *in vitro* humano ha sido obstaculizado por dificultades con el cultivo de cardiomiocitos humanos derivados de tejido cardíaco adulto así como también por la baja disponibilidad de cultivos de células cardíacas de origen fetal (Kandolf et al. 1999). El surgimiento de las células madres embrionarias y los protocolos para su diferenciación a cardiomiocitos ha permitido la investigación moderna al superar estos problemas. Luego de verificar la presencia de los receptores virales en nuestra línea celular, hemos subsecuentemente demostrado la susceptibilidad a la infección por CVB. Estudios pioneros por Feuer y col., realizados en ratones revelaron que CVB3 infecta de forma preferencial a las células madres neurales proliferativas localizadas en el sistema nervioso central neonatal (Feuer et al. 2003; Feuer et al. 2005). En nuestro estudio, hemos extendido estas observaciones demostrando que tanto las hESCs como las hESC-CM presentaban susceptibilidad a la infección por CVB.

Varios trabajos sugieren que el estado de la célula huésped puede jugar un rol en el resultado de la infección por CVB. En este sentido, la proliferación aparece como favorecedora de la infección productiva de CVB (Tabor-Godwin et al. 2010), y quizás también contribuye a aumentar la replicación de CVB observada en las hESC cuando son comparadas con las hESC-CM.

Los datos presentados aquí concuerdan con previos estudios realizados con cardiomiocitos derivados de tejido fetal humano (Kandolf et al. 1985) o de ratón recién nacido (Gomez et al. 1993).

Recientemente, se ha reportado la caracterización de la infección de cardiomiocitos murinos utilizando la línea de cardiomiocitos relativamente reciente HL-1 (Pinkert et al. 2011). Si bien estos resultados son muy interesantes y podrán aportar concretos avances en ciertas áreas, el hecho que sea una línea originalmente derivada de aurícula hacen prever que existan importantes diferencias, ya que la aurícula es solo infrecuentemente afectada en la miocarditis murina inducida por CVB3. Existen muy pocos trabajos que han utilizado cardiomiocitos

murinos provenientes de animales recién nacidos para caracterizar la infección de CVB (Seko et al. 1990; Gomez et al. 1993; Pinkert et al. 2011) y ninguno, en lo mejor de nuestro conocimiento, que haya utilizado cardiomiocitos provenientes de animales adultos. Con respecto a los resultados observados en nuestros modelos murinos *in vitro*, ambos modelos resultaron ser útiles a fin de caracterizar la variación en los niveles de receptor CAR encontrados entre los cardiomiocitos obtenidos de animales recién nacidos y los adultos y su correlación con la susceptibilidad a la infección por CVB3. Más aún, observamos que ambos tipos celulares fueron susceptibles a la infección por CVB3-eGFP y que esta infección pudo ser observada, hecho esperable pero no garantizado, ya que CVB3-eGFP replica en forma mucho más lenta que su variante parental CVB3. Estudios utilizando estos modelos podrán contribuir a detallar los mecanismos y las eventuales diferencias que podrían existir entre cardiomiocitos adultos y de animales recién nacidos, logrando un mejor entendimiento de los mecanismos que generan la susceptibilidad diferencial observada con la edad tanto en la patogénesis de la miocarditis viral murina como en última instancia, en la humana. Por otro lado, es de esperar que el contar con un virus CVB3 fluorescente nos permitirá caracterizar el mecanismo utilizado por este virus para ingresar en los cardiomiocitos, desconocido hasta el presente así como la interacción del RNA viral con sensores dentro del cardiomiocitos que podrían estar involucrados en mecanismos antivirales tales como la producción de IFN-I.

En el modelo *in vivo*, los resultados obtenidos mostraron una variación en los niveles del receptor CAR entre las dos cepas estudiadas, el cual se vio acompañado a una susceptibilidad diferencial a la infección. Por lo tanto, considerando que tanto los resultados en el modelo *in vitro* humano y murino, como a resultados previos en los cuales se analizó la susceptibilidad a la infección por CVB en el SNC acorde al desarrollo y la disminución en los niveles del receptor (Feuer et al. 2003; Feuer et al. 2005) y que la eliminación cardiospecífica de CAR conduce a una ausencia de MV inducida por CVB3 (Kallewaard et al. 2009; Shi et al. 2009), la expresión del mismo parecería ser un determinante mayor de la susceptibilidad de las células cardíacas a la infección por CVB3.

Dentro de este contexto, es importante mencionar que otros factores pueden contribuir además de los niveles de CAR a la susceptibilidad a la infección por CVB3, incluyendo, por ejemplo, los niveles de IFN-I, que como mencionamos previamente es una importante citoquina antiviral.

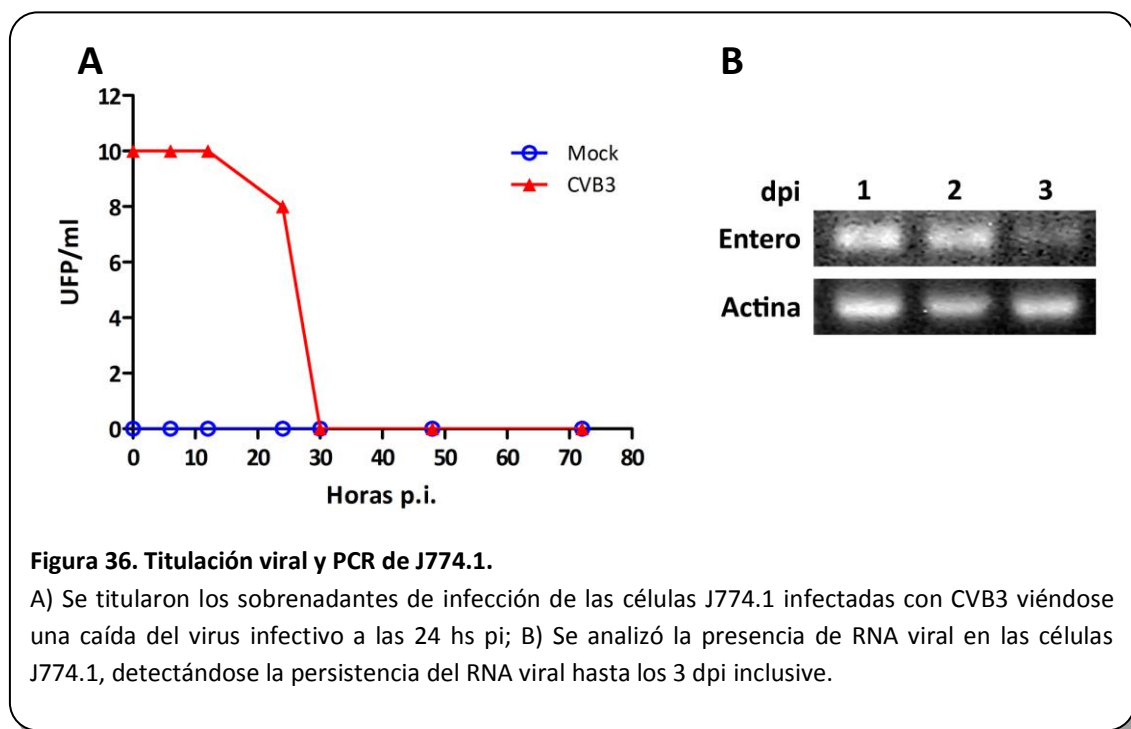
La posibilidad de realizar estudios con cardiomiocitos aislados en los que se altere la expresión de CAR o de las diversas citoquinas antivirales (como IFN- β) y se evalúe la susceptibilidad a la infección, permitirán determinar la importancia de estos parámetros en la susceptibilidad a la infección por CVB3.

2. Infección de macrófagos por CVB

Como se mencionó en la introducción, los macrófagos serían células claves en las patologías cardíacas asociadas a CVB. Es por eso que se buscó analizar la susceptibilidad a la infección de éstas células, su grado de activación y las moléculas asociadas a dicha activación.

i. Susceptibilidad a la infección

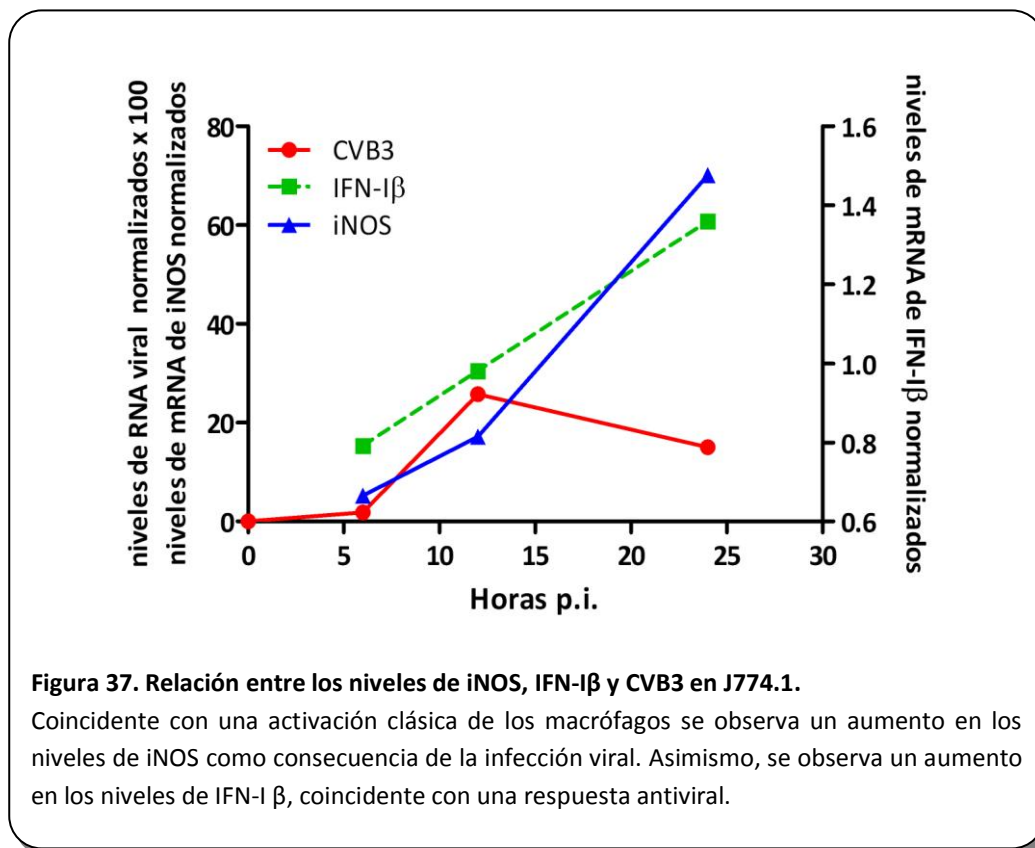
Se analizó la susceptibilidad a la infección viral por macrófagos murinos de la línea celular J774.1. Las células fueron infectadas a una MOI ≈ 1 y se evaluó la infectividad de los sobrenadantes celulares (Figura 36A) y la presencia de RNA viral en las mismas (Figura 36B).



Los resultados mostraron una baja susceptibilidad a la infección por CVB3 medida en el sobrenadante hasta las 30 hs pi. Sin embargo, el RNA viral podría permanecer dentro de la célula por más tiempo, pudiendo detectarse a bajos niveles hasta el día 3 pi inclusive.

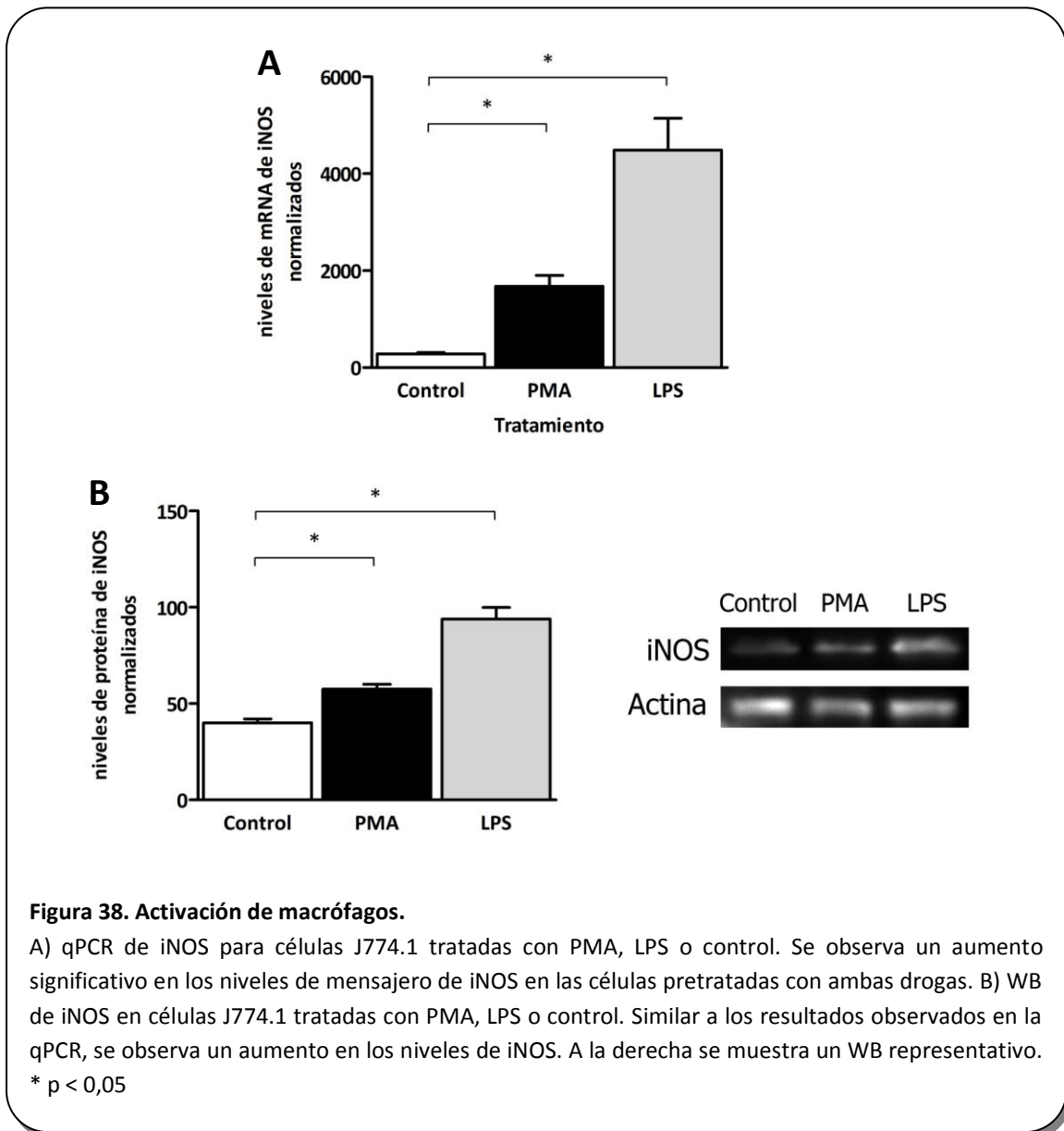
ii. Citoquinas y marcadores de activación en la infección

A continuación se analizaron los niveles de expresión del mRNA de IFN- β e iNOS. Muestras de J774.1 infectadas por 1h a 37°C con una MOI ≈ 1 se cosecharon desde las 6 a las 24 hs pi. De acuerdo a lo esperado, se observó un aumento en los niveles de iNOS e IFN- β en forma paralela a la disminución de los niveles de RNA viral en función del tiempo pi (Figura 37).

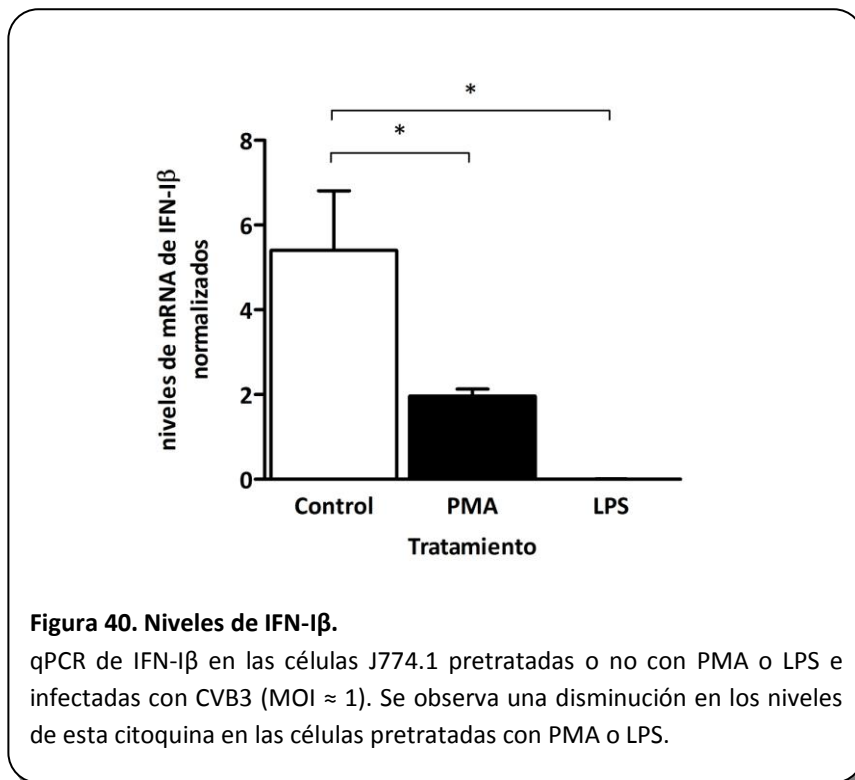
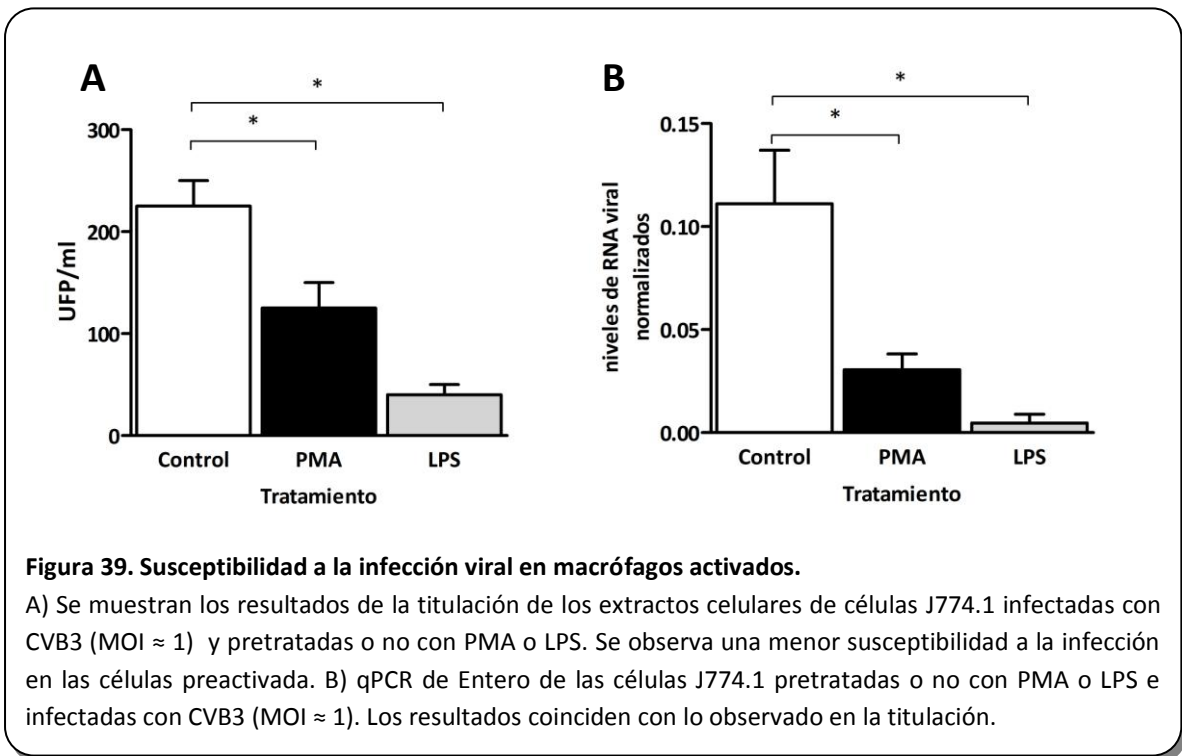


iii. Estado de activación y susceptibilidad a la infección

Para analizar la relación entre el estado previo de activación de los macrófagos y la susceptibilidad a la infección viral, se trataron las células con PMA o LPS disueltos en DMEM con 10% de SFB. Como control se trataron células solo con DMEM con 10% de SFB. La activación de los macrófagos se confirmó por qPCR de iNOS (como marcador de CAMΦ) (Figura 38) en forma previa a la infección viral.



Confirmada la activación de las células se procedió a la infección de las mismas a las 24 hs de la activación a $MOI \approx 1$. La titulación de los lisados celulares mostró una disminución significativa en la susceptibilidad a la infección en las células pretratadas con PMA o LPS (Figura 39), mientras que mostraron menores niveles de IFN- β (Figura 40) acorde a la menor cantidad de virus.



iv. La infección de los macrófagos por CVB3 produce cambios en los niveles de Gal-3

Como ya se mencionó en la introducción, la secreción de Gal-3 en macrófagos se ve asociada a un fenotipo AAMΦ (MacKinnon et al. 2008), aunque también se ha visto aumentada en la activación clásica (Novak et al. 2011). Con el objetivo de analizar las consecuencias de la infección de los macrófagos por CVB3 en los niveles de Gal-3 tanto a nivel transcripcional como traduccional y en la proteína secretada, se procedió a infectar las células (MOI \approx 1) como en los casos anteriores y se cosecharon muestras de células a 1 y 2 dpi para extracción de RNA y proteínas, y de sobrenadantes para evaluar mediante ELISA los niveles de Gal-3 secretados. Los resultados muestran un aumento en los niveles de Gal-3 tanto a nivel transcripcional y traduccional como en los niveles de Gal-3 secretados (Figura 41).

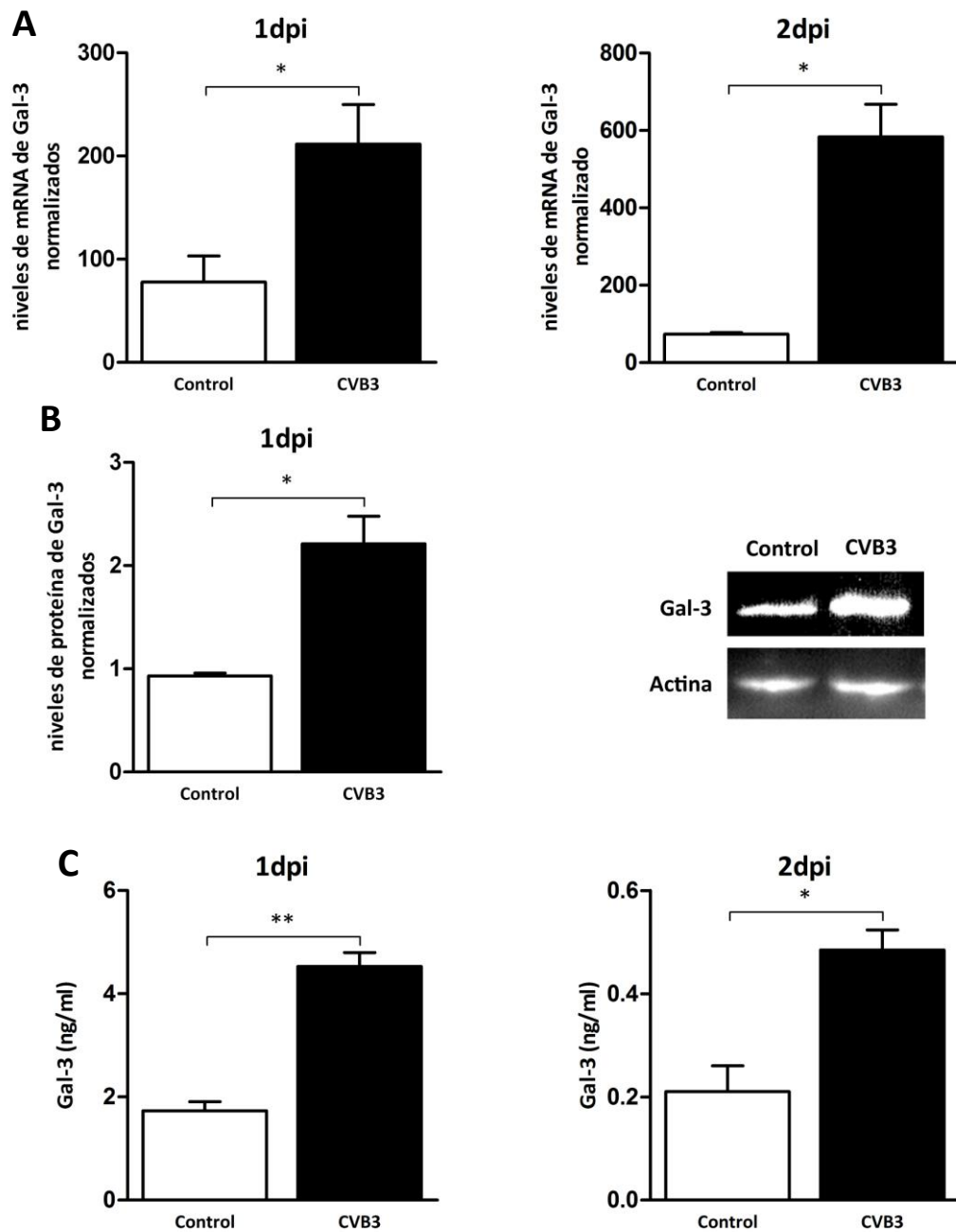


Figura 41. Aumento en los niveles de Gal-3.

A) qPCR de Gal-3 a 1 y 2 dpi, se observa un aumento en los niveles de mRNA de Gal-3 en las células infectadas; B) WB a 1 dpi de Gal-3, se observa un aumento en los niveles proteína de Gal-3 y un WB representativo; C) ELISA de sobrenadantes de Gal-3 a 1 y 2 dpi, los resultados coinciden con los antes mostrados para el mRNA y las proteínas, viéndose un aumento a ambos tiempos en las células infectadas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Discusión

La vasta mayoría de las infecciones virales resultan en una alteración del funcionamiento del sistema inmune del huésped ya sea porque tienen como blanco principal para su replicación a algunos de sus componentes celulares o bien porque como consecuencia de su replicación se genera la inducción de diversas citoquinas, quimioquinas y otros factores que son capaces de afectar la respuesta inmune (McChesney et al. 1987). En este sentido, en el caso de CVB, trabajos pioneros utilizando técnicas de hibridización *in situ* para la detección de RNA enteroviral en un modelo murino de infección experimental por CVB3, pudieron precisar que durante la fase aguda el virus podía ser detectado en varios órganos incluyendo bazo y ganglios linfáticos. En el bazo, la gran mayoría de las células infectadas se localizaban en la periferia de los folículos linfoides y expresaban un fenotipo característico de células pre B y de linfocitos B. Si bien el RNA viral también pudo ser detectado en menor cantidad en otras células incluyendo linfocitos helper CD4⁺ y células Mac-1⁺, el genoma enteroviral no pudo ser detectado en células identificadas como linfocitos citotóxicos/supresores CD8⁺ (Klingel et al. 1996). Pocos años después, el rol de los linfocitos B durante la infección con CVB3 pudo ser precisado y más allá de confirmar que los linfocitos B son susceptibles a la infección por CVB3 pudo ser demostrado que era a través de una infección productiva que involucraba aproximadamente entre el 1 al 10% de las células. Sorprendentemente, dado el nivel de detección de RNA viral en estas células, y el hecho de que los linfocitos B expresan niveles apenas detectable de CAR, se sugirió que debía existir otra forma de entrada en estas células por parte de este virus. El mismo estudio demostró que había ausencia de depleción de linfocitos B consecutiva a la infección, indicando que estas células no explicarían la inmunodepresión transitoria que había sido reportada previamente. Interesantemente, la replicación viral y su subsecuente diseminación fueron detectadas retrasadas en ratones carentes de linfocitos B, consistente con que los linfocitos B juegan un importante rol en la inicial multiplicación y/o distribución del virus a diferentes órganos (Mena et al. 1999).

Ha sido reportado que CVB3 es incapaz de replicar en una línea celular de origen monocitario o en células mononucleares de sangre periférica indicando que la susceptibilidad a la replicación viral podría depender del estado de diferenciación y maduración de las células. A fin de confirmar esta hipótesis, los investigadores estudiaron la susceptibilidad a la infección por CVB3 utilizando unidades formadoras de colonias macrofágicas-granulocíticas y en líneas celulares hematopoyéticas con varios estadios de diferenciación y maduración simultáneos.

Los resultados fallaron en establecer una correlación con el estadio madurativo de este tipo celular y la susceptibilidad a la infección por CVB3 (Vuorinen et al. 1996). Por otro lado, y con respecto a la eventual susceptibilidad y alteración de la funcionalidad de los macrófagos por la infección con CVB, también ha sido publicado que CVB3 es capaz de multiplicarse en monocitos humanos sin afectar su viabilidad, en forma similar a lo observado en linfocitos B murinos y en contraste con el efecto lítico observado en la mayoría de los tipos celulares estudiados a la fecha, y que como resultado de la replicación viral, se producía inducción y secreción de diversas citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, IL-6 y TNF α (Henke et al. 1992). Quizás, por un relativamente corto período de tiempo, las citoquinas inducidas por CVB3 podrían ser beneficiosas para el huésped ya que estas moléculas representan factores esenciales requeridos para una respuesta antiviral efectiva. Sin embargo, si los monocitos/macrófagos que llegan al corazón se mantienen infectados y continúan liberando citoquinas, las consecuencias podrían resultar en el daño tisular, incluyendo al tejido no infectado. Más aún, varias de estas moléculas incluyendo IL-1, TNF α , y NO afectan deletereamente y en forma marcada, el funcionamiento de las células cardíacas (Gulick et al. 1989; Henke et al. 1992; Balligand et al. 1993).

En el caso específico del rol de los macrófagos durante una infección viral, estos tienen un rol crucial en la respuesta inmune innata y adaptativa a los virus y son mediadores críticos en los procesos inflamatorios cruciales para la contención y eliminación del patógeno viral. Sin embargo, la inflamación también se asocia a procesos deletéreos en el ambiente tisular, y por lo tanto debe ser reprimida para permitir una curación completa. Los macrófagos, entonces, también participan en la resolución de la inflamación al producir otras citoquinas y quimioquinas, ahora anti-inflamatorias, y eliminando los restos celulares. Los macrófagos por lo tanto, pueden exhibir propiedades pro y antiinflamatorias, dependiendo del estadio de la enfermedad y las señales recibidas, como por ejemplo el balance inflamatorio en el microambiente (Laskin et al. 2011).

Ante la escasez de estudios previos, fue que se decidió en este trabajo caracterizar la infección de macrófagos murinos por CVB3 utilizando la línea J774.1 como modelo. En base a los resultados obtenidos, se pudo comprobar la susceptibilidad de los macrófagos murinos a la infección por CVB3. Sin embargo, los títulos virales en los sobrenadantes se detectaron a niveles relativamente bajos e incluso no pudieron ser detectados después de las 24 hs pi. En contraste, la detección de RNA viral en las células continuó al menos hasta 3 dpi, fin de la

etapa en estudio. Por otro lado, la infección por CVB3 fue capaz de inducir la expresión de mRNA de iNOS e IFN- β , cuyas respectivas proteínas podrían participar en la respuesta proinflamatoria y antiviral. Como se mencionó previamente en la Introducción, la persistencia del genoma y proteínas virales en células presentadoras de antígenos podría generar *in vivo* una respuesta inflamatoria crónica, la cual, en el caso del miocardio infectado por CVB3, se podría asociar a la CMD (Mogensen 1979). La inducción de la expresión de iNOS en macrófagos había sido confirmada previamente *in vivo* en la miocarditis experimental inducida por CVB3 como un factor crítico en la inhibición de la replicación viral ya que la inhibición farmacológica de iNOS o su ausencia en ratones KO conduce a elevados títulos virales cuando comparados con ratones sin tratamiento o WT (Lowenstein et al. 1996; Zaragoza et al. 1998). Por otro lado, se observó que el tratamiento de macrófagos con un inhibidor específico de iNOS (N^G-nitro-L-arginina metil éster) en condiciones *in vitro*, conducía a una susceptibilidad aumentada en células de la línea de macrófagos murinos RAW264.7, demostrando la importancia de esta proteína en controlar la infección de macrófagos por CVB3 (Hiraoka et al. 1996). Con respecto al IFN- β , es sabido que este induce la expresión de cientos de genes para combatir infecciones virales en todas las células nucleadas (Macmicking 2012).

El hecho de que la infección de la línea de macrófagos murinos J774.1 por CVB3 induzca la expresión de iNOS e IFN- β , ambos asociados al control de la infección viral, sugieren la importancia de este tipo celular en la patogénesis de la infección viral, y en particular, en la miocarditis viral. Considerando que el IFN- β y la iNOS muy probablemente sean sólo algunos dentro de una variedad de citoquinas pro-inflamatorias producidas en la infección viral por estas células, es que puede especularse que los macrófagos infectados podrían tener un rol perjudicial en el tejido miocárdico infectado. Por lo tanto, la infección de macrófagos por CVB3, la persistencia de su genoma y la liberación de citoquinas y otras moléculas podrían contribuir al daño cardíaco observado en la miocarditis murina inducida por CVB3.

Con respecto a las consecuencias que tendría el estado de activación previo sobre la susceptibilidad a la infección por CVB3, el tratamiento de las células J774.1 con PMA o LPS condujo a una subsecuente disminución en la susceptibilidad a la infección por CBV3 medida tanto por la caída del título de infectividad viral en los sobrenadantes celulares como por la cantidad de RNA viral presente en las células. Esta disminución en la susceptibilidad viral correlacionó positivamente con un aumento en los niveles de iNOS, asociados a un fenotipo CAM Φ , y negativamente con los niveles de mRNA de IFN- β respecto de los valores obtenidos

en las células sin tratar utilizadas como controles. Es decir que la disminución en la susceptibilidad a la infección viral no se asoció a mayores niveles de IFN- β , sino de iNOS. Por lo tanto, en el contexto de la infección de macrófagos activados por CVB3, el NO derivado de iNOS parecería ser más importante en regular la replicación de CVB3 que el IFN- β .

La Gal-3 es una lectina animal inicialmente conocida por ser altamente expresada y secretada por macrófagos (Sato et al. 1994; Liu et al. 1995). Posteriores trabajos han demostrado que numerosos patógenos de distintos géneros pueden inducir cambios en la expresión, actividad y secreción de Gal-3 en diversos tipos celulares. En este sentido, se ha reportado que la expresión génica de Gal-3 es inducida por *Helicobacter pylori* (Fowler et al. 2006), mientras que la expresión génica y proteica es inducida en respuesta a infecciones HIV, virus Junín y *Trypanosoma cruzi* (Schroder et al. 1995; Vray et al. 2004; Jaquenod De Giusti et al. 2011). La secreción de Gal-3 por células epiteliales gástricas aumenta en respuesta a la infección por *H. pylori* (Fowler et al. 2006) y en neutrófilos por *Streptococcus pneumoniae* (Sato et al. 2002; Nieminen et al. 2008) y en el modelo murino de infección por *S. pneumoniae* induce el reclutamiento de neutrófilos (Sato et al. 2002; Nieminen et al. 2008). En la infección por HSV-1 se pudo comprobar que Gal-3 tiene efectos proinflamatorios en monocitos, macrófagos y neutrófilos, células involucradas en regular la severidad y duración de las infecciones (King et al. 2009).

Se han demostrado una amplia variedad de actividades biológicas de Gal-3 *in vitro*. Esta lectina activa varios tipos celulares, incluyendo mastocitos (Frigeri et al. 1993), neutrófilos (Yamaoka et al. 1995), monocitos/macrófagos (Liu et al. 1995) y linfocitos (Dong et al. 1996; Hsu et al. 1996). También se la asoció a procesos de adhesión celular (Sato et al. 2002; Fowler et al. 2006). Estas funciones extracelulares sugieren un posible rol de esta proteína en las reacciones inmunes y respuestas inflamatorias. Por lo tanto, las funciones de Gal-3 parecerían ser multifacéticas extendiéndose tanto al compartimiento intracelular como extracelular. Debido a su amplia distribución tisular y sus efectos variados en muchos sistemas, Gal-3 parecería estar involucrada en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos.

Con el fin de elucidar en forma más precisa las funciones biológicas de Gal-3 en el contexto de la infección por CVB3 y la patología asociada, analizamos la regulación en la expresión de esta lectina en macrófagos como consecuencia de la infección por CVB3.

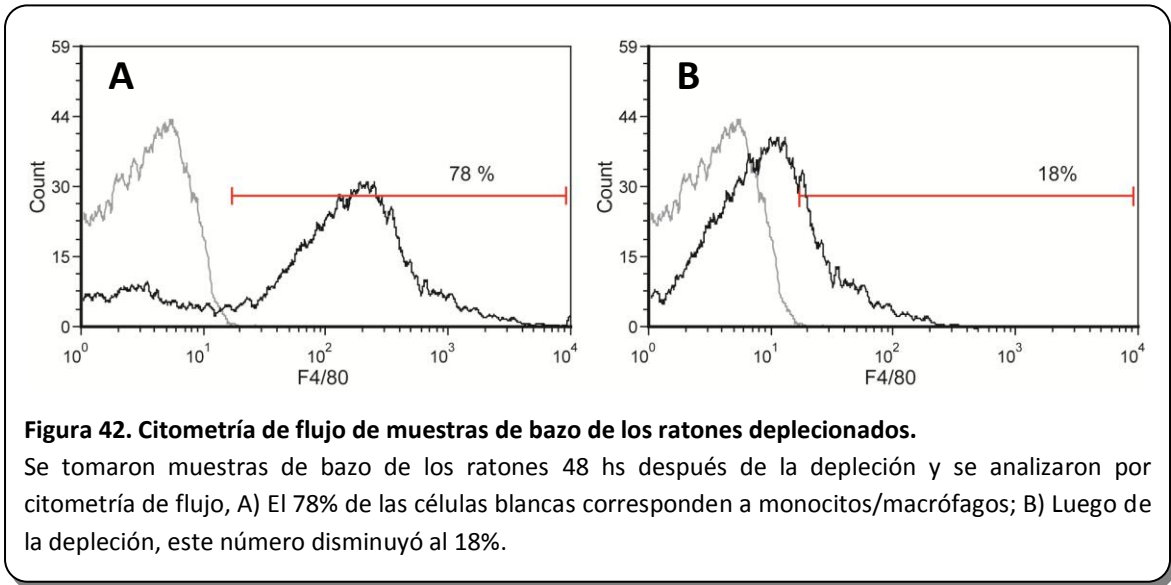
En lo mejor de nuestro conocimiento, creemos que este trabajo es el primero en estudiar la expresión de Gal-3 asociada a la infección por CVB3. Nuestros resultados mostraron que la infección de la línea de macrófagos J774.1 por CVB3 condujo a un aumento de Gal-3 a nivel transcripcional, traduccional y de proteína secretada al sobrenadante. Es interesante notar que aunque en ocasiones la expresión de Gal-3 se ha visto asociada a la activación alternativa de macrófagos (Li et al. 2008; MacKinnon et al. 2008), otros estudios le otorgan a esta lectina un rol pro-inflamatorio (Hsu et al. 2000; Zuberi et al. 2004; Novak et al. 2011), sugiriendo que la asociación de su expresión puede variar en cada situación particular. Para el caso de la infección de macrófagos por CVB3, nuestros resultados muestran que su inducción se encuentra acompañada de una sobreexpresión de iNOS, marcador de CAM Φ , indicando que esta lectina estaría asociada a una respuesta proinflamatoria en la infección por CVB3.

Estos resultados muestran la importancia de integrar este tipo celular y las citoquinas y moléculas estudiadas en la infección por CVB3 y los mecanismos patogénicos involucrados que conducen a MV y CMD. Por ello, fue de interés estudiar el rol de los macrófagos, su depleción y la ausencia de Gal-3 durante la infección murina por CVB3 y sus consecuencias en la fibrosis cardíaca inducida.

3. Rol de los macrófagos en la miocarditis viral y la fibrosis

Como se mencionó en la Introducción los macrófagos son células de la inmunidad innata importantes en la eliminación de patógenos y la presentación antigénica (Mogensen 1979). Sin embargo, el proceso inflamatorio generado puede conducir a un elevado daño tisular (Henke et al. 1992). Hasta el momento, aquellos trabajos que analizaron el rol de los macrófagos y Gal-3 en el daño y reparación de tejidos, lo hicieron a partir de la generación de daño mecánico o farmacológico (Duffield et al. 2005; Henderson et al. 2006; Henderson et al. 2008; Dragomir et al. 2012). Trabajos anteriores demostraron que la depleción de macrófagos por sílica en ratones BALB/c aumentaban la mortalidad inducida por CVB3 (Rager-Zisman et al. 1973). Sin embargo, a pesar de que la sílica es capaz de bloquear la actividad fagocítica de los macrófagos, es posible que muchos macrófagos encontraran partículas de sílica en concentraciones subletales. Esto conduciría a la activación de los mismos, aumentando la producción y secreción de diversas citoquinas proinflamatorias y NO. Estos eventos podrían aumentar el daño producido por los macrófagos en la infección siendo por lo tanto incierto el rol de los mismos en la MV (van Rooijen et al. 1997).

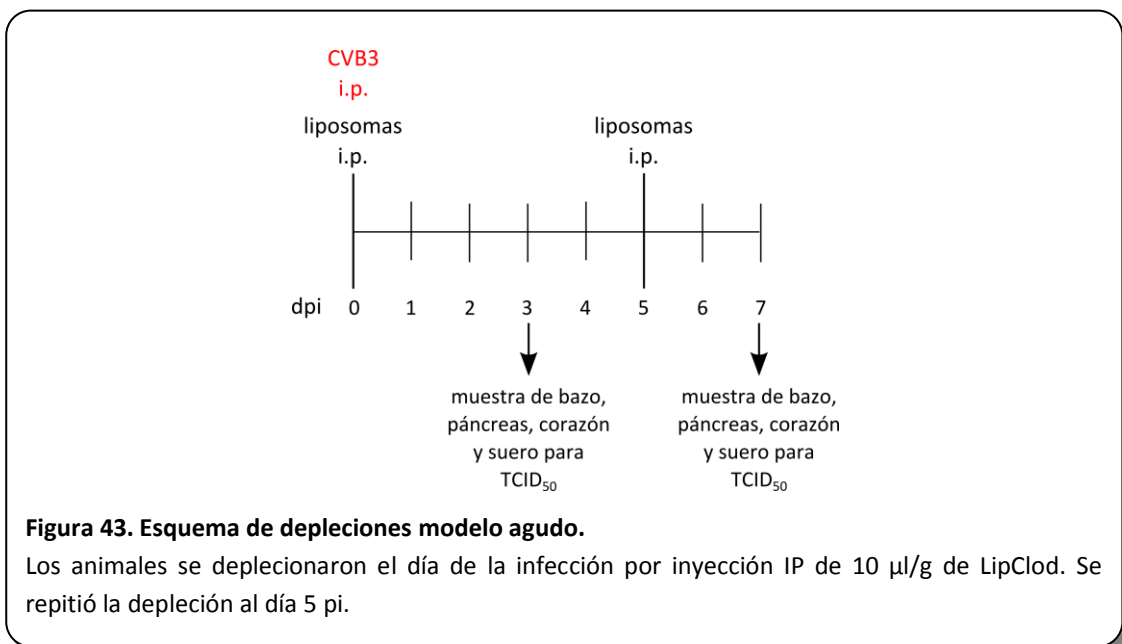
Dentro de este contexto, surgió el interés de evaluar el rol de los macrófagos y Gal-3 en la miocarditis inducida por CVB3, tanto en la etapa aguda (evaluando su capacidad de controlar la infección) como en la crónica (asociándolos a procesos fibróticos). Para ello, animales C3H/HeJ de 5 semanas de edad fueron inoculados IP con CVB3 y depletados o no de macrófagos a distintos tiempo pi. La depleción de macrófagos se realizó mediante la inyección de Liposomas con clodronato (LipClod) y fue confirmada por citometría de flujo de muestras de bazo en la que se analizó el porcentaje de células que pertenecían a monocitos, células precursoras de los macrófagos. Los resultados mostraron una disminución del 60% en el porcentaje de células blancas correspondientes a monocitos, coherente con la depleción buscada (Figura 42).



3-A. Rol de los macrófagos en las etapas aguda y subaguda de la miocarditis viral

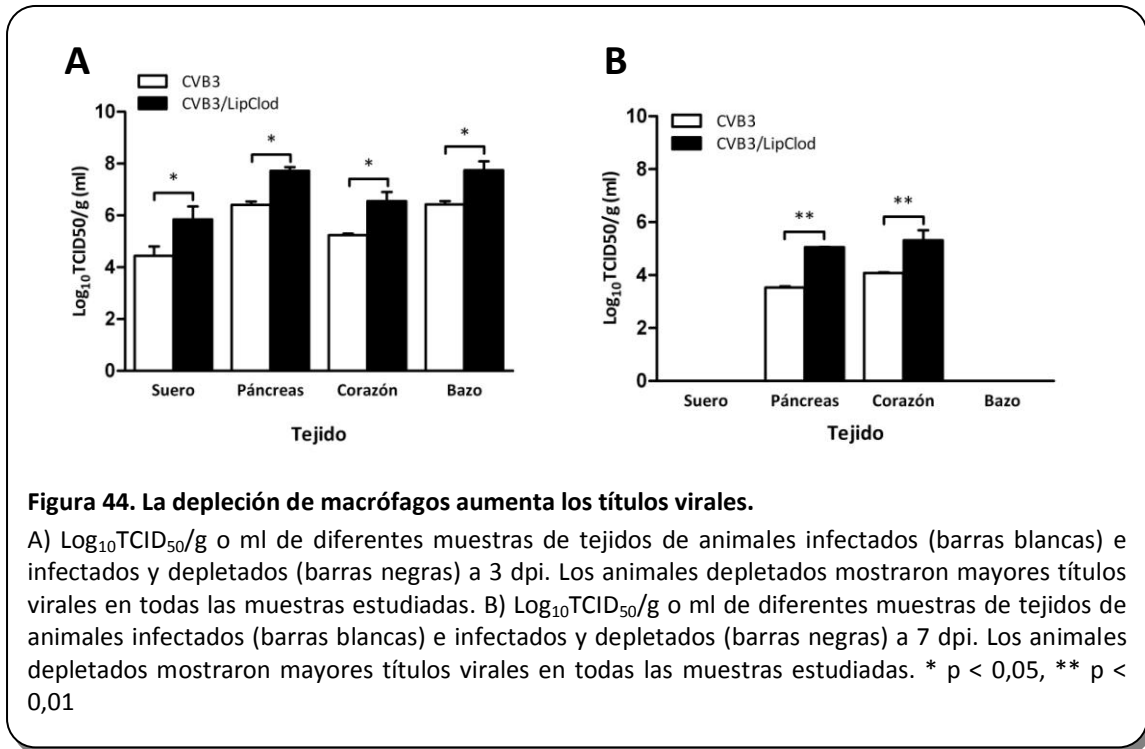
i. Esquema de depleción

Para el análisis del rol de los macrófagos en las etapas aguda y subaguda de la miocarditis viral se deplecionaron los animales desde el día 0 pi y cada 5 días con una dosis de LipClod de 10 μ l/g de peso y se inocularon con $2,2 \times 10^4$ UFP de CVB3 al día 0. Las muestras se cosecharon a 3 y 7 dpi según fueran para etapa aguda o subaguda, respectivamente (Figura 43).



ii. La depleción de macrófagos aumenta los títulos virales a 3 y 7 dpi

Con el fin de estudiar en rol de los macrófagos en la infección por CVB3 se analizó la viremia y los niveles de virus infectivo en páncreas, corazón y bazo a 3 y 7 dpi. A ambos tiempos pi los animales depletados de macrófagos presentaron significativamente más virus en todas las muestras estudiadas (Figura 44A y B, respectivamente).



iii. La depleción de macrófagos disminuye el daño tisular agudo

Se analizó el daño tisular a 7 dpi. Los animales depletados de macrófagos presentaron menos daño tisular (Figura 45) a pesar de una mayor carga viral (Figura 44B) Estos resultados otorgarían un rol importante de los macrófagos en el daño tisular en la miocarditis viral causada por CVB3.

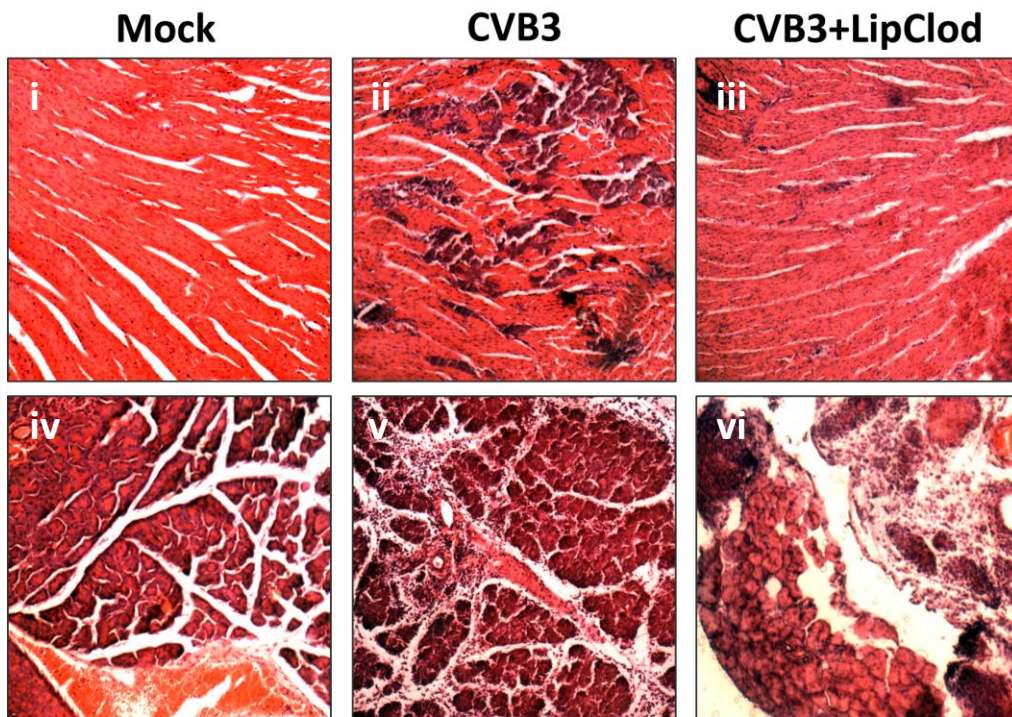


Figura 45. La depleción de macrófagos disminuye el daño tisular

Tinción HE representativa de secciones de corazón y páncreas a 7 dpi, i) corazón de animales no infectados, ii) corazón de animales infectados con CVB3, iii) corazón de animales infectados con CVB3 y deplecionados, iv) páncreas de animales no infectados, v) páncreas de animales infectados con CVB3, vi) páncreas de animales infectados con CVB3 y deplecionados. Los animales infectados muestran áreas de infiltración de macrófagos, las cuales se ven reducidas en los animales deplecionados. En cuanto al páncreas se observa menor proporción del mismo dañado.

La disminución en el daño en corazón y páncreas de los animales depletados no se atribuyó a una menor susceptibilidad a la infección por CVB3.

iv. Infiltrado inflamatorio en la miocarditis viral

Utilizando anti Iba1, un anticuerpo específico de macrófagos, se realizaron estudios IHQ con el fin de estudiar la proporción de este tipo celular en el infiltrado celular presente en la miocarditis viral murina. Los resultados mostraron una elevada proporción de macrófagos en las lesiones inducidas por CVB3 y, como se esperaba, una marcada disminución de los mismos en los animales deplecionados (Figura 46).

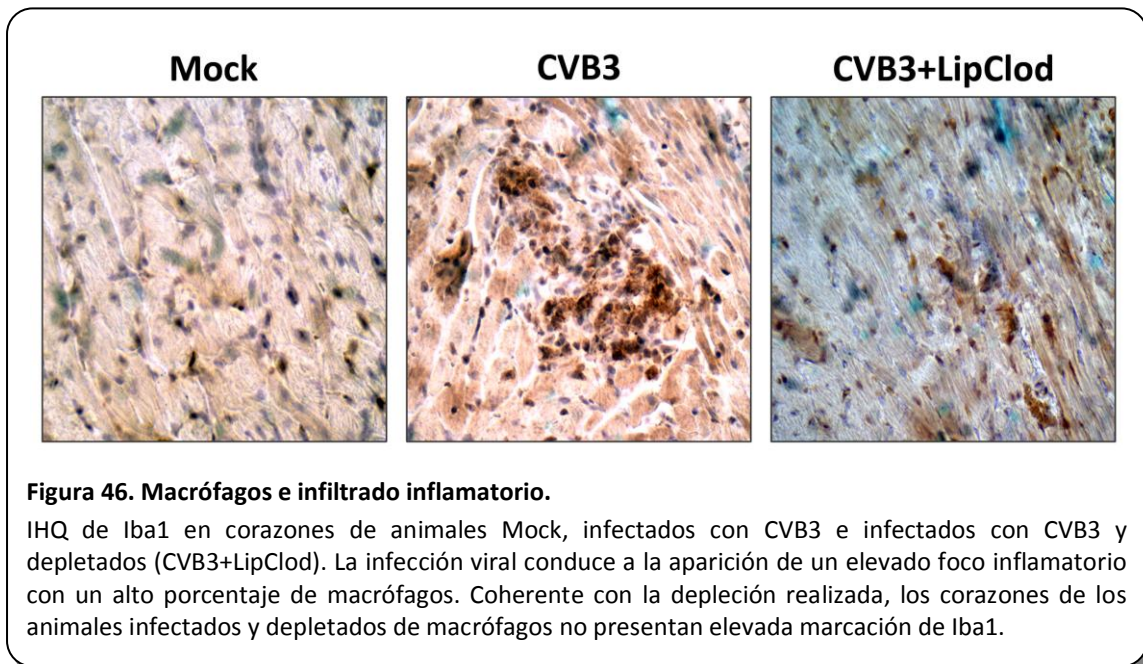
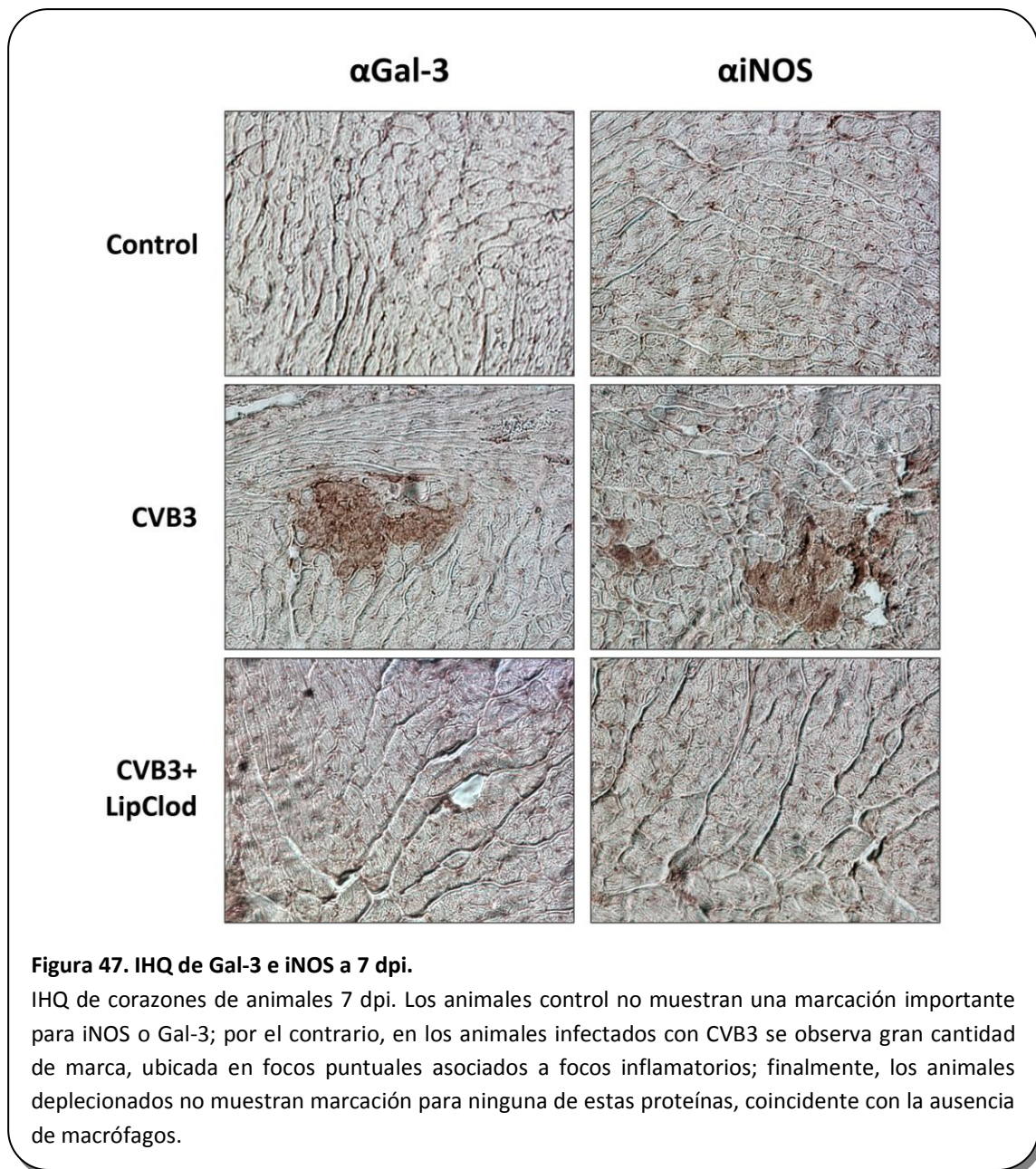


Figura 46. Macrófagos e infiltrado inflamatorio.

IHQ de Iba1 en corazones de animales Mock, infectados con CVB3 e infectados con CVB3 y depletados (CVB3+LipClod). La infección viral conduce a la aparición de un elevado foco inflamatorio con un alto porcentaje de macrófagos. Coherente con la depleción realizada, los corazones de los animales infectados y depletados de macrófagos no presentan elevada marcación de Iba1.

v. *La depleción de macrófagos disminuye la expresión de Gal-3 e iNOS cardíacas inducidas por la infección*

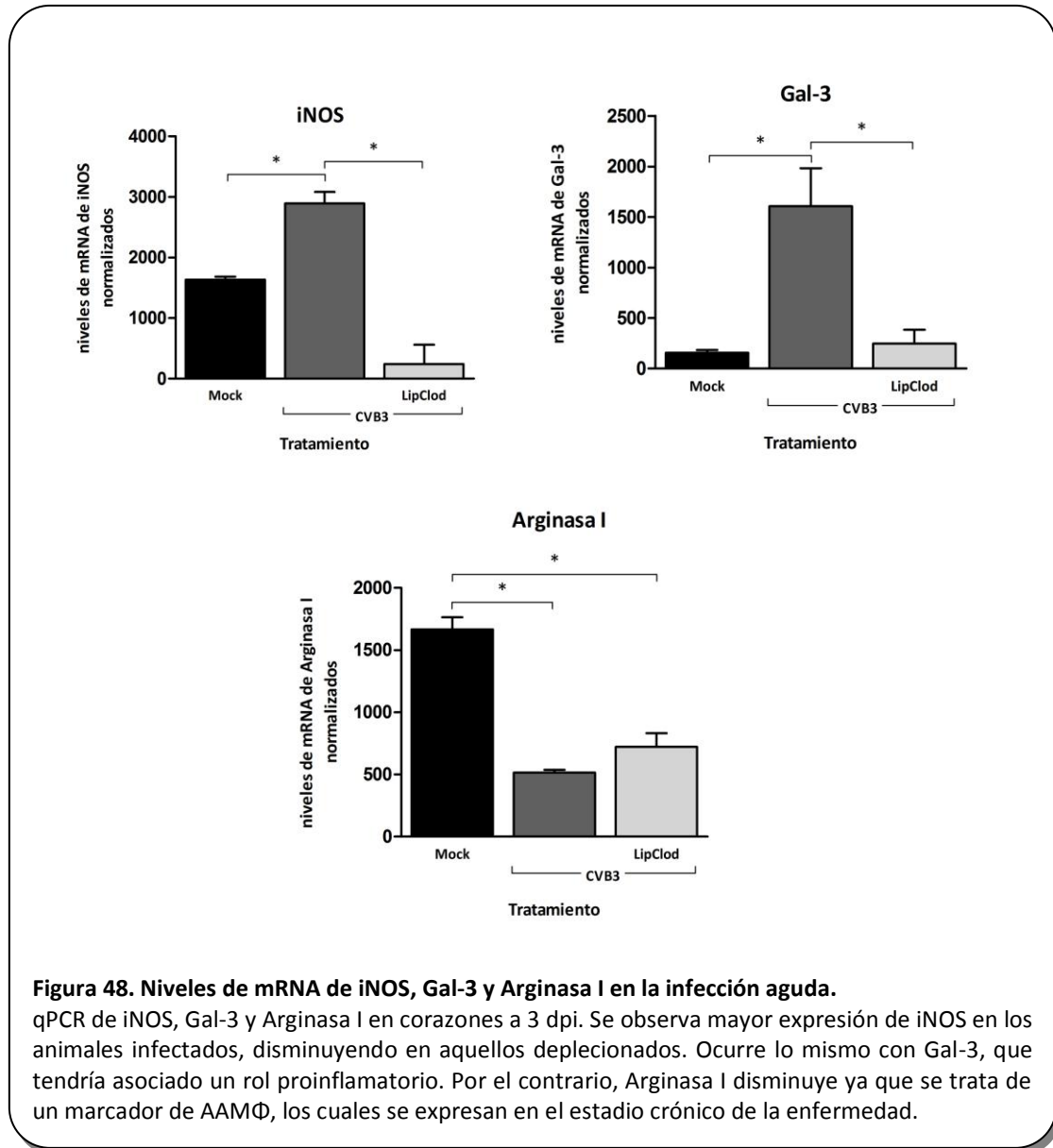
A fin de correlacionar la histología cardíaca de los animales sacrificados a 7 dpi con la expresión tisular de Gal-3 e iNOS, se realizaron estudios IHQ con anticuerpos contra Gal-3 e iNOS. Los resultados mostraron una significativa mayor marcación focal tanto para iNOS como para Gal-3 en los animales infectados y ausencia de la misma tanto en los tejidos de los animales no infectados utilizados como control como en los infectados y deplecionados. Estos resultados sugieren que la expresión de las mencionadas moléculas está restringida principalmente a los macrófagos del exudado inflamatorio (Figura 47).



vi. La depleción disminuye los niveles de señales proinflamatorias

Se evaluaron los niveles de Gal-3, iNOS (CAM Φ) y Arginasa I (AAM Φ) observándose diferencias entre los animales infectados y deplecionados y los sólo infectados. Como se podía esperar para el estadio agudo de la miocarditis, se observaron niveles elevados de mRNA de iNOS, asociado a un estadio proinflamatorio y Gal-3. Por el contrario, la Arginasa I, asociada a los AAM Φ se encontró disminuida en los animales infectados, lo que coincide con una respuesta mayoritariamente proinflamatoria a la infección por CVB3. Como se esperaba en los animales

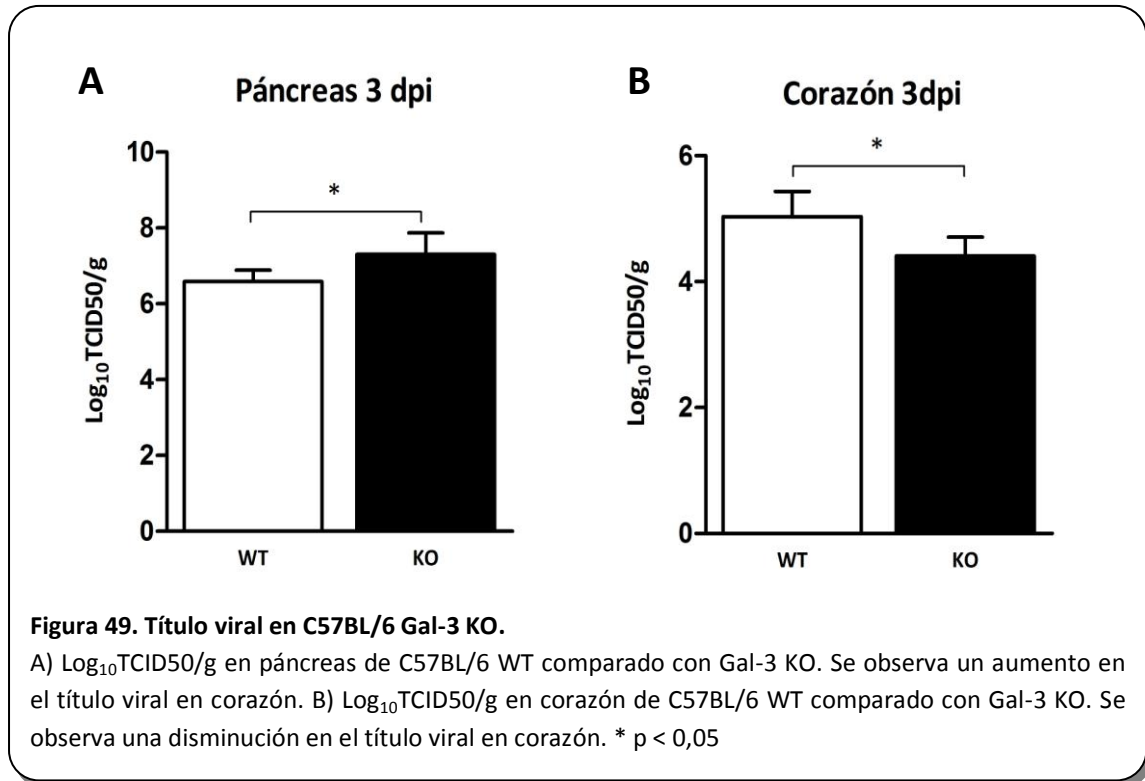
deplecionados comparados con los sin deplecionar, la depleción de macrófagos se tradujo en bajos niveles de los 3 mRNAs (Figura 48).



vii. Gal-3 modula la replicación viral en varios tejidos

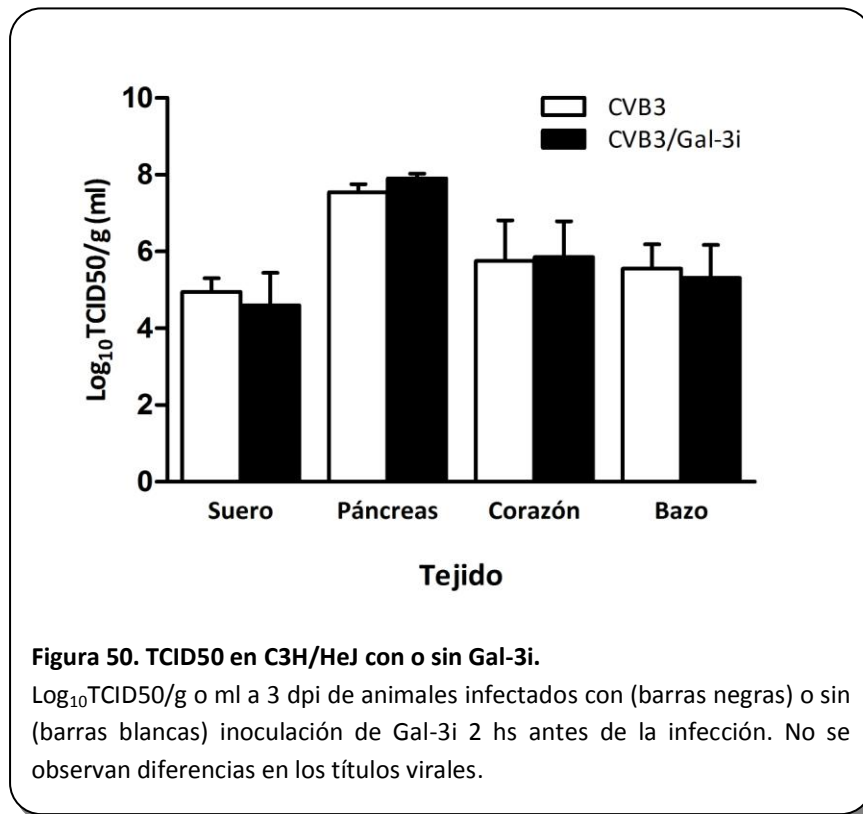
A fin de profundizar el estudio de la relación entre Gal-3 y la infección viral, se procedió a analizar el rol de Gal-3 en la replicación viral utilizando animales C57BL/6 WT y C57BL/6 Gal-3 KO. Para ello, ratones C57BL/6 Gal-3 KO de 4 semanas de edad fueron inyectados IP con $2,2 \times 10^4$ UFP de CVB3. Sin embargo, debido a una inesperada elevada mortalidad (75%) el experimento debió repetirse utilizando animales de mayor edad de forma de disminuir la susceptibilidad utilizando animales C57BL/6 Gal-3 KO de 6 semanas de edad. Los resultados

demonstraron una disminución en el título viral en corazón y un aumento en páncreas a 3 dpi (Figura 49).



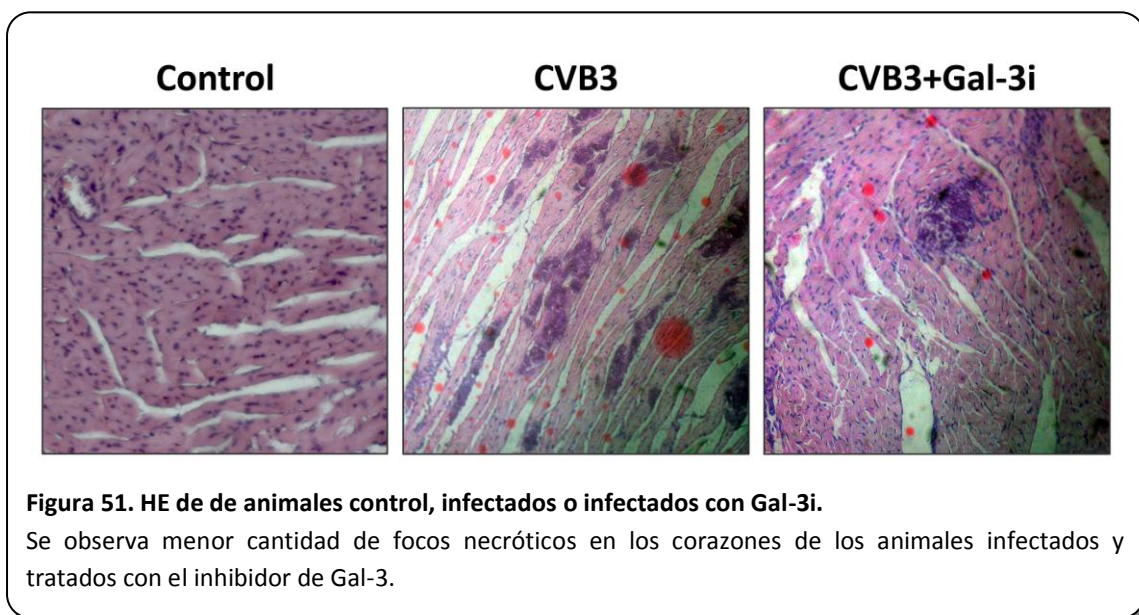
viii. La inhibición de Gal-3 no afecta la replicación viral

A fin de analizar el rol de Gal-3 extracelular en el contexto del modelo murino de miocarditis viral, animales C3H/HeJ de 5 semanas de edad fueron inoculados o no con un inhibidor altamente específico de Gal-3, N-Acetil-D-Lactosamina (Gal-3i) (Yu et al. 2012) por vía IP dos horas antes de la inoculación IP con $2,2 \times 10^4$ UFP de CVB3. A los 3 dpi se analizaron la viremia y la infectividad viral en muestras de tejidos de páncreas, corazón y bazo (Figura 50).



ix. La inhibición de Gal-3 disminuye el daño tisular

A continuación se analizó el daño tisular en corazón de ratones control, infectados e infectados e inoculados con Gal-3i a 7 dpi. Se observa menor daño en los animales infectados y tratados con el Gal-3i que en los infectados (Figura 51).



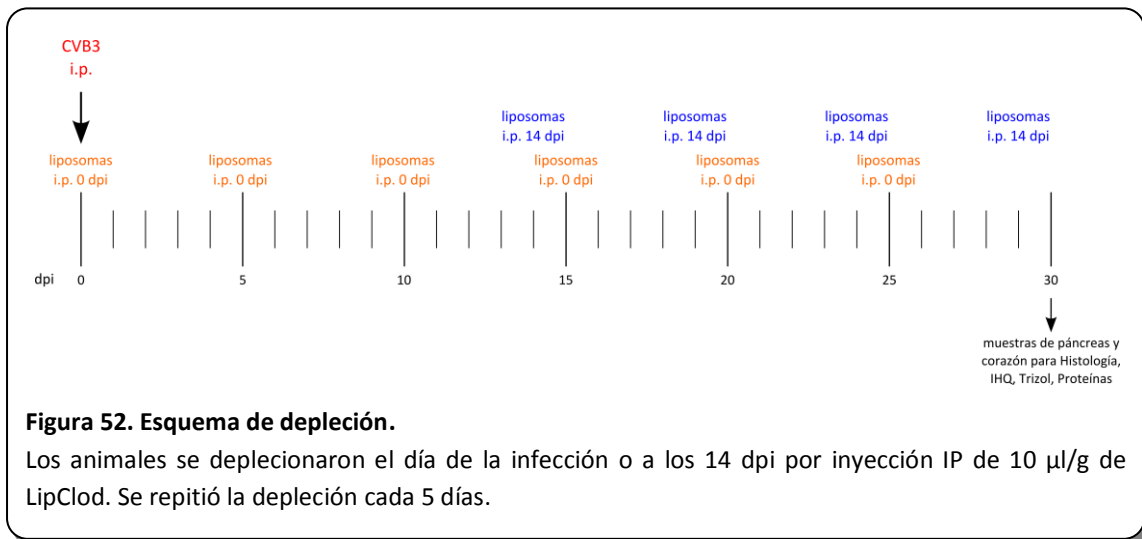
3-B. Rol de los macrófagos en la etapa crónica de la miocarditis

Como se mencionó en la Introducción, la respuesta inmune contra la infección viral se ha asociado a gran parte del daño observado en la miocarditis inducida por CVB3 (Fuse et al. 2005; Esfandiarei et al. 2008). Luego de la etapa aguda, citoquinas antiinflamatorias como TGF- β e IL-10 secretadas por células T regulatorias y AAM Φ promueven la resolución de la respuesta inmune y el reemplazo del tejido muerto por cicatrices fibróticas, mediante la activación de fibroblastos a miofibroblastos productores de colágeno (Papageorgiou et al. 2012). En un trabajo de Duffield y col. (Duffield et al. 2005), se analizó el comportamiento diferencial de los macrófagos en la fibrosis hepática, mostrando que la eliminación de los mismos en distintas etapas del daño inducido por tetracloruro de carbono, resultaba en un aumento o disminución de la fibrosis, confirmando el rol diferencial de los CAM Φ y AAM Φ en esta patología.

Teniendo en cuenta ese antecedente, se decidió analizar las consecuencias de la depleción de macrófagos en dos momentos distintos de la miocarditis viral y sus consecuencias sobre la fibrosis cardíaca. La depleción en el estadio agudo, que en el capítulo anterior mostró un aumento en los títulos virales y una disminución en la secreción de iNOS y Gal-3 junto con un menor daño tisular. Y la depleción en un estadio subagudo, luego de la eliminación completa del virus en los tejidos (14 dpi), donde los mismos tendrían un rol de AAM Φ , reparando el daño producido en la miocarditis aguda.

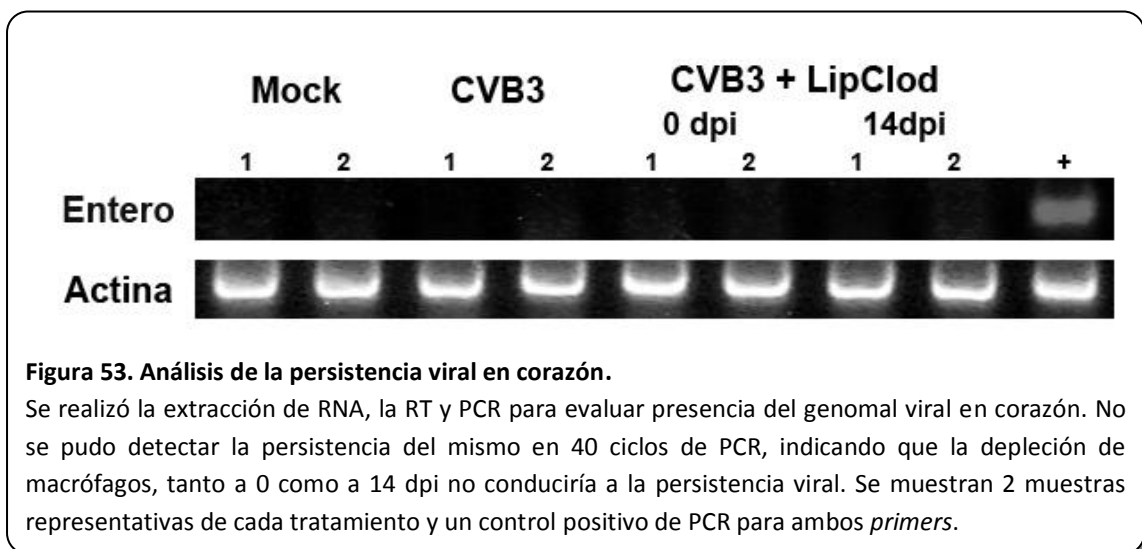
i. Esquema de depleción

Con el objetivo de analizar el rol de los macrófagos en el estadio crónico de la miocarditis viral, los animales fueron deplecionados de macrófagos por la inyección de 10 μ l/g de Liposomas con Clodronato en dos condiciones de depleción distintas (Figura 52), a partir del día 0 para evaluar la ausencia de macrófagos en toda la infección y sus consecuencias sobre la fibrosis y a partir del día 14 para evaluar el rol de los macrófagos una vez eliminado el virus del organismo e infectados con $2,2 \times 10^4$ UFP de CVB3. Para mantener la depleción se repitieron las inyecciones cada 5 días.



ii. La depleción de macrófagos no conduce a la persistencia viral

Con el objetivo de evaluar si la depleción de macrófagos en el estadio subagudo afecta la eliminación del virus del corazón generando su persistencia, proceso asociado con la inflamación crónica y la CMD, se realizó una extracción de RNA, RT y PCR para evaluar la presencia del RNA viral en las muestras de corazón a 30 dpi. Los resultados muestran ausencia del genoma viral por PCR (Figura 53), indicando que la ausencia de macrófagos no conduce a la persistencia viral.



iii. La infección conduce a la aparición de focos fibróticos en corazón y reemplazo adiposo en páncreas

Los tejidos de los animales sacrificados a 30 dpi no infectados, infectados e infectados y deplecionados a 0 y 14 dpi fueron analizados por tinción tricrómica de Masson en busca de lesiones fibróticas. No se observaron lesiones en páncreas ni corazón de los animales Mock (Figura 54A y B), mientras que en los infectados se observó un reemplazo adiposo cercano al 100% en páncreas y focos fibróticos en corazón de los animales infectados con CVB3 (Figura 54C y D). Sin embargo, los animales infectados y deplecionados a 0 dpi mostraron un menor daño en páncreas y menor cantidad de focos fibróticos en corazón (Figura 54E y F) que los animales infectados. Este resultado resultó llamativo considerando que estos animales presentaron mayor carga viral en ambos tejidos. Los animales infectados y deplecionados a 14 dpi no parecerían presentar diferencias en el daño páncreas y corazón comparados con los animales infectados (Figura 54G y H).

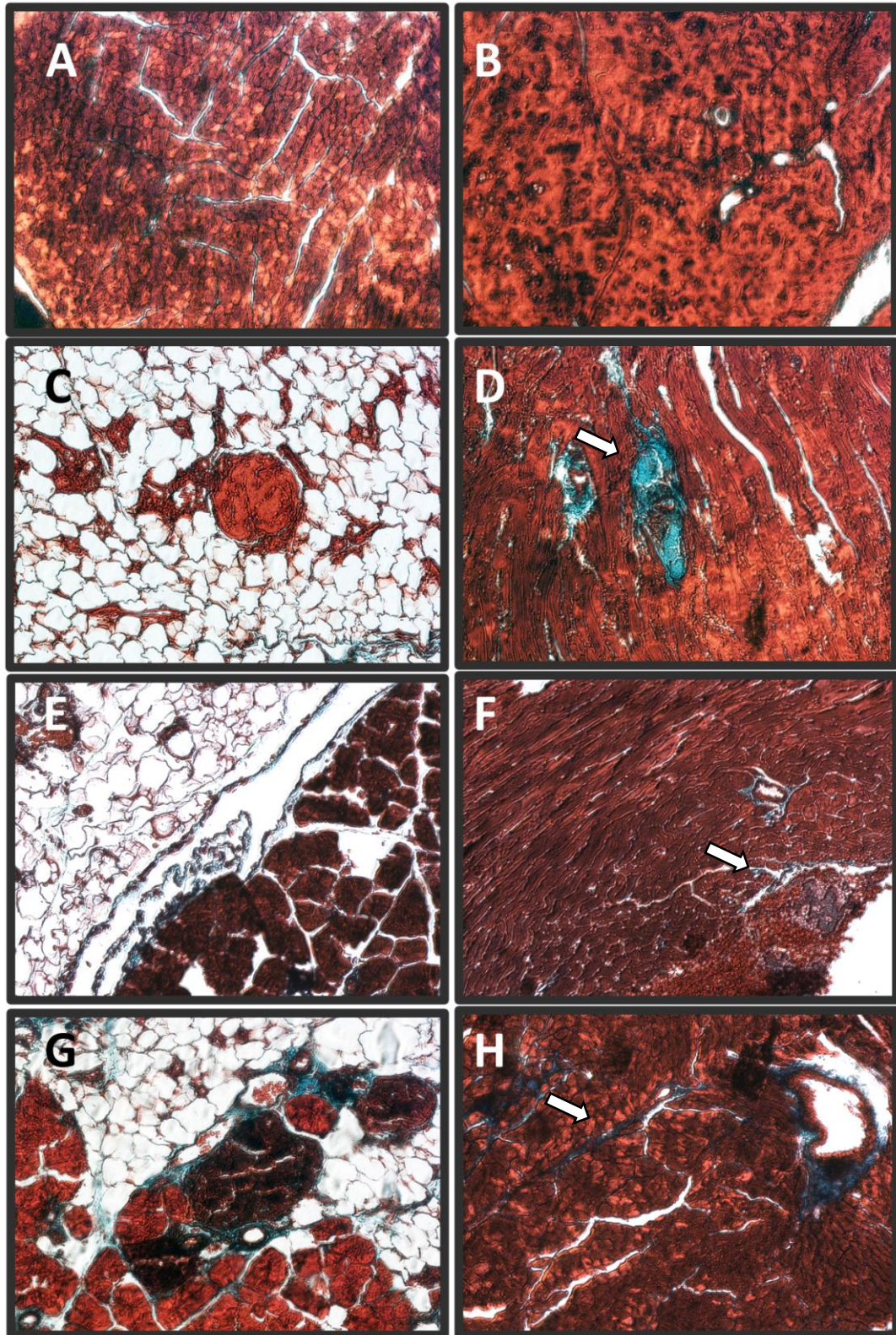


Figura 54. Tinción tricrómica de Masson de tejidos de animales sacrificados a 30 dpi.

A) Páncreas C3H/HeJ Mock; B) Corazón C3H/HeJ Mock; C) Páncreas C3H/HeJ + CVB3H3, se observa 100% de reemplazo adiposo; D) Corazón C3H/HeJ + CVB3H3 con focos fibróticos (flecha blanca); E) Páncreas C3H/HeJ + CVB3H3 + LipClod 0 dpi, se observa un 15% de reemplazo adiposo; F) Corazón C3H/HeJ + CVB3H3 + LipClod 0 dpi, se observan unos pocos y pequeños focos fibróticos (flecha blanca); G) Páncreas C3H/HeJ + CVB3H3 + LipClod 14 dpi, se observa un 80% de reemplazo adiposo; H) Corazón C3H/HeJ + CVB3H3 + LipClod 14 dpi, se observan focos fibróticos (flecha blanca).

iv. La tinción con Sirius Red confirmó los cambios en la fibrosis

La tinción con Sirius Red confirmó los resultados obtenidos con el tricrómico de Masson (Figura 54B) ya que mostró la presencia de fibras de colágeno (Figura 55B) en el corazón de los animales infectados y sacrificados a 30 dpi, mientras los animales Mock y los infectados y deplecionados a día 0 pi no mostraron presencia significativa de fibras de colágeno (Figura 55A y C) mientras que los animales infectados y deplecionados a día 14 pi (Figura 55D) presentaron menos fibras de colágeno que los animales infectados (Figura 55B).

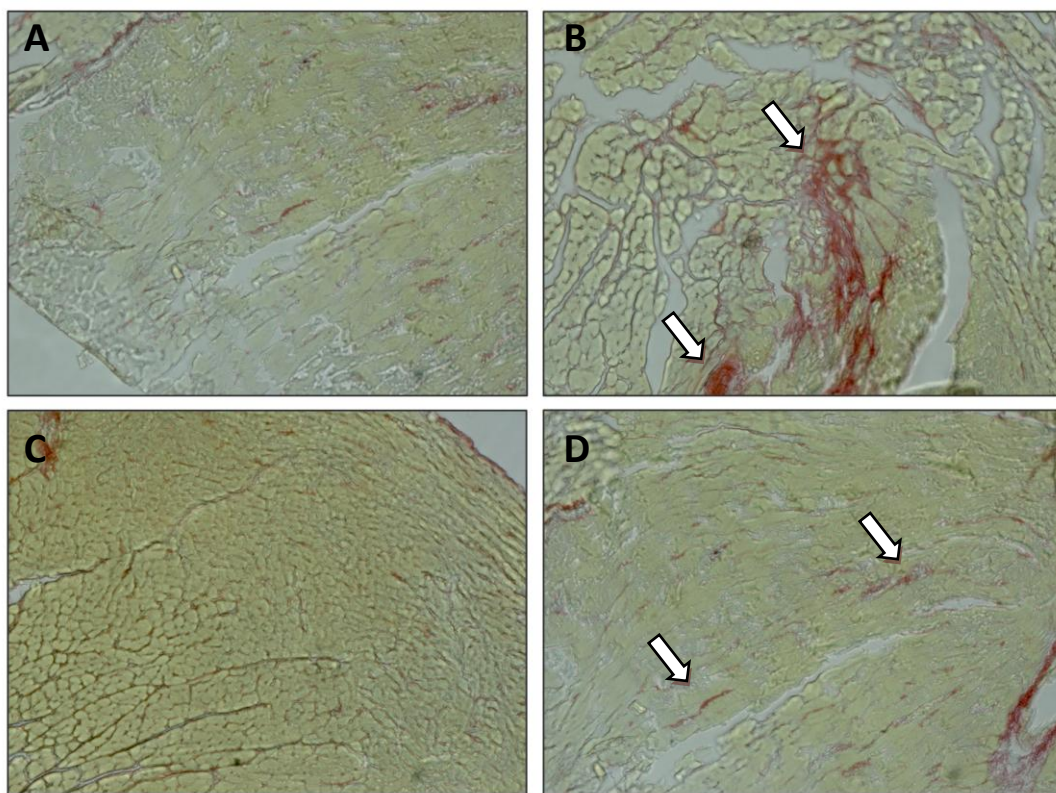


Figura 55. Tinción de PricoSirius Red de tejidos de animales sacrificados a 30 dpi.

Tinción de PricoSiriusRed de A) corazón control a 30 dpi; B) corazón de animal infectado con CVB3H3 a 30 dpi, se observan fibras de colágeno (flechas blancas); C) corazón de animal infectado con CVB3H3 y deplecionado a 0 dpi, no se observan fibras de colágeno; D) corazón de animal infectado con CVB3H3 y deplecionado a 14 dpi, se observan fibras de colágeno (flechas blancas) en menor cantidad y tamaño que en B).

v. Los marcadores de fibrosis variaron considerablemente

Se realizaron estudios IHQ con el fin de detectar α SMA (marcador de miofibroblastos) y Gal-3 (asociado a varios procesos de fibrosis, incluida la cardíaca) en los corazones de los distintos

grupos de animales. Los resultados mostraron mayor cantidad de α SMA (Figura 56) como de Gal-3 (Figura 57) en los tejidos de los animales infectados e infectados y deplecionados a 14 dpi, comparados con los animales no infectados o los infectados y deplecionados a 0 dpi.

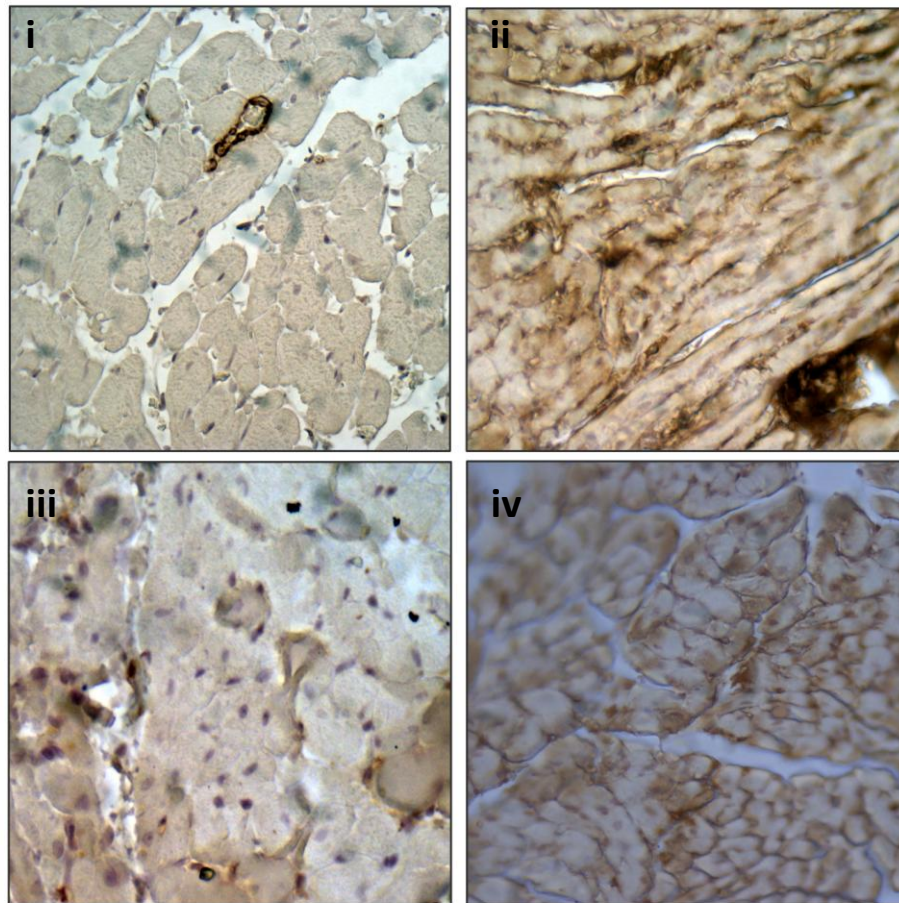


Figura 56. IHQ de α SMA de animales a 30 dpi con o sin depleción de macrófagos.

IHQ de α SMA de corazones de animales Mock (i), infectados con CVB3 (ii), infectados y depletados a 0 dpi (iii) e infectados y depletados a 14 dpi (iv). Los animales Mock y los infectados y depletados a 0 dpi no presentan elevada marcación de α SMA, mientras que los animales infectados y los infectados y depletados a 14 dpi, presentan una elevada marcación de esta proteína.

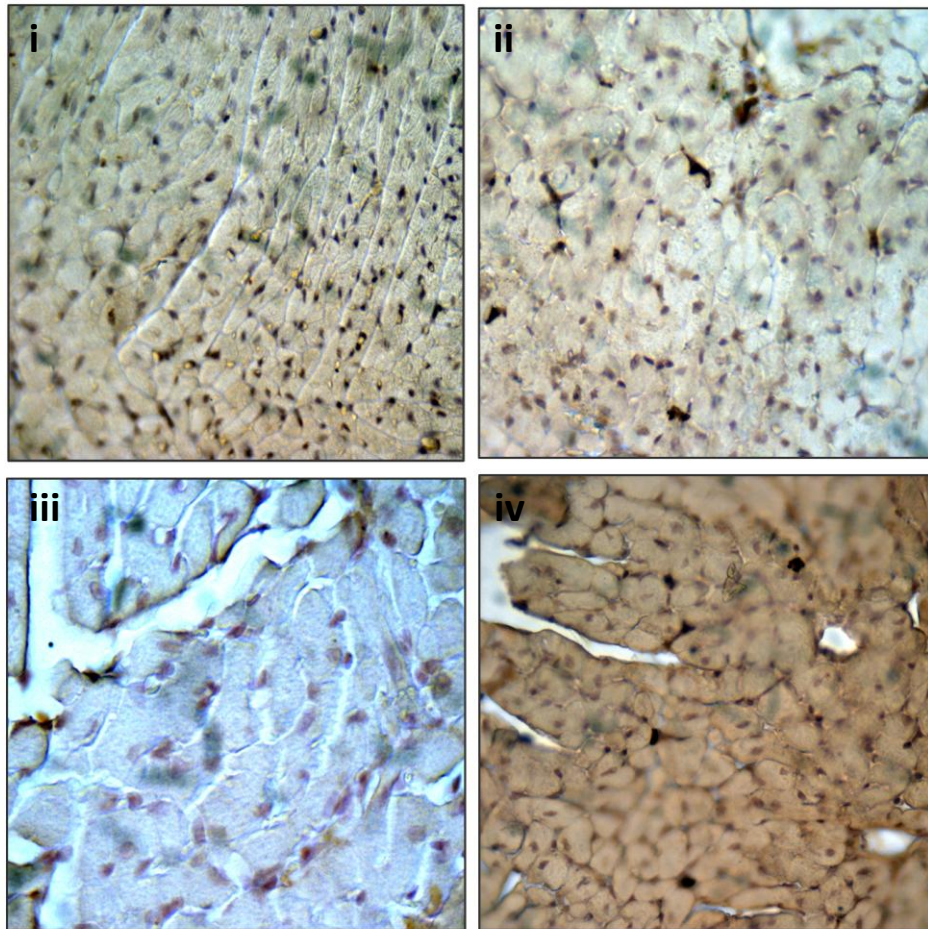


Figura 57. IHQ de Gal-3 de animales a 30 dpi con o sin depleción de macrófagos.

IHQ de Gal-3 de corazones de animales Mock (i), infectados con CVB3 (ii), infectados y depletados a 0 dpi (iii) e infectados y depletados a 14 dpi (iv). Los animales Mock y los infectados y depletados a 0 dpi no presentan elevada marcación de Gal-3, mientras que los animales infectados y los infectados y depletados a 14 dpi, presentan una elevada marcación de esta proteína.

A fin de confirmar los estudios previos se analizó por qPCR los niveles de mRNA de α SMA, TGF β 1 y proColl (ya que se produce como un precursor que luego es clivado) en las distintas condiciones estudiadas. Los resultados mostraron un aumento de los niveles de α SMA, TGF β y proColl en los animales infectados y los infectados y deplecionados a 14 dpi, mientras que en los animales deplecionados al momento de la infección se observaron niveles de α SMA, TGF β y proColl similares a los de los animales Mock (Figura 58).

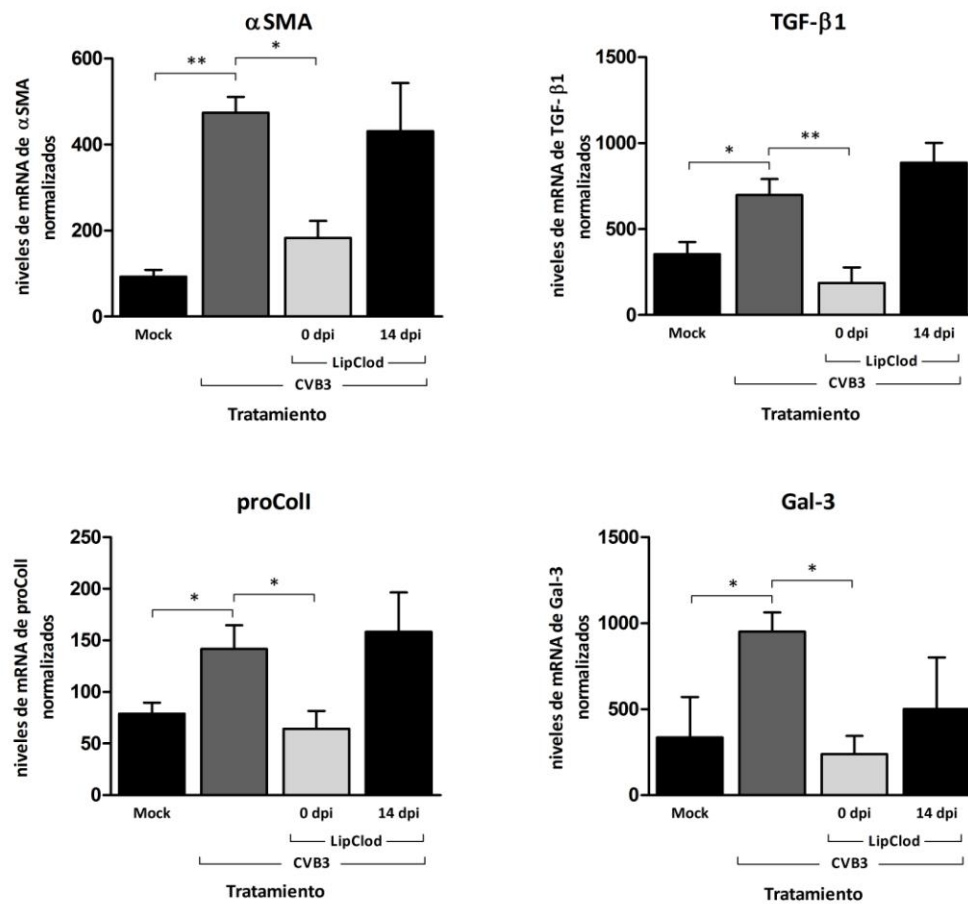


Figura 58. qPCR de marcadores de fibrosis.

qPCR de α SMA, TGF- β 1, proColl y Gal-3 como marcadores de fibrosis en corazón. Los animales deplecionados a 0 dpi presentan niveles de estos mensajeros similares a los animales Mock. Por el contrario, los animales infectados y los infectados y depletados a 14 dpi, mostraron niveles más elevados de estos tres marcadores. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Discusión

Se ha demostrado que los macrófagos son componentes importantes de la defensa del huésped en la vía de ingreso, limitando la distribución del virus a los órganos blanco y la eliminación del mismo de los tejidos infectados (Mogensen 1979).

Sin embargo, la situación podría ser más complicada ya que más tardíamente fueron descritas distintas subpoblaciones de CAM Φ y AAM Φ con roles diferenciales en diversas patologías (Duffield et al. 2005; Sung et al. 2007; Fink et al. 2009; Dragomir et al. 2012). Mientras que los CAM Φ liberan citoquinas y mediadores proinflamatorios que contribuyen al daño, los AAM Φ disminuyen la inflamación y promueven la reparación de tejidos (Laskin 2009). Los mecanismos y las consecuencias asociados a la activación de las distintas subpoblaciones de macrófagos en la MV inducida por CVB3 aún no han sido establecidos.

En la MV aguda inducida por CVB3 se observa necrosis de cardiomiocitos junto a un exudado inflamatorio con predominio linfo-mononuclear. El daño cardíaco observado sería consecuencia del efecto lítico directo producido por la replicación viral junto al daño ocasionado por la respuesta inmune del huésped. En uno de los escasos trabajos previos realizados por otros, se observó un aumento en la mortalidad de animales infectados con CVB3 y deplecionados de macrófagos con sílica, comparados con los animales infectados y no deplecionados, lo que asignaría un importante rol a estas células en la patogénesis de la MV. Lamentablemente, este trabajo sufre de varias limitaciones comenzando por el mecanismo de depleción utilizado, que posteriormente se ha visto asociado a la activación secundaria de los macrófagos y que podría tener un rol deletéreo sobre la integridad tisular. Más importante todavía es que en el mencionado estudio no se incluyeron parámetros virales ni se realizó un estudio histopatológico y por lo tanto se desconoce si el aumento de mortalidad se debía a mayor replicación viral junto a un aumento de la patología asociada (Rager-Zisman et al. 1973). En otro estudio ya mencionado en esta Tesis, la depleción de células Mac-1 (que incluyen monocitos, macrófagos y células NK) condujo a menor daño cardíaco luego de la infección por EMCV (Hirasawa et al. 1996). Sin embargo, la depleción específica de células NK en la infección por CVB3 resultó en mayores títulos virales y daño cardíaco (Godeny et al. 1986) lo que hace en este caso más difícil la interpretación del rol exclusivamente de los macrófagos en la MV aguda.

Dentro de este contexto es que surgió la necesidad de evaluar el rol de los macrófagos en la MV inducida por CVB3. Como los macrófagos podrían presentar varias funciones en forma independiente, incluyendo su capacidad de controlar la replicación viral en la MV aguda, su capacidad de generar daño tisular durante la MV aguda y su rol en el proceso de reparación del tejido dañado una vez resuelta la inflamación fue que se decidió realizar el ensayo separando el estudio sobre el rol durante la MV aguda del eventual rol durante la MV crónica utilizando para ello distintos tiempos de depleción respecto a la infección viral.

Los resultados obtenidos revelaron un importante rol de los macrófagos en el control de la infección viral durante la MV aguda inducida por CVB3 ya que la depleción de los mismos condujo a un aumento en el título viral en todos los tejidos estudiados. Estos resultados son coincidentes a los obtenidos durante un estudio relativamente similar realizado en la infección por virus dengue (Fink et al. 2009). En conjunto, estos resultados indicarían que los macrófagos serían muy importantes para la contención de la infección viral en el estadio inicial.

Es de destacar que la depleción de los macrófagos en el estadio agudo, a pesar de resultar en mayores títulos virales en los tejidos estudiados, resultó en un menor daño tisular que el observado en los animales infectados sin deplecionar. Estos resultados son similares a los observados en un estudio sobre la influencia del sexo del huésped sobre el curso de la MV. En el mencionado estudio, hembras BALB/c que presentan un fenotipo de macrófagos mayoritariamente AAM Φ fueron comparadas con machos de la misma cepa, donde predomina los CAM Φ . Los resultados indicaron un mayor título viral en el corazón de las hembras que correlacionó negativamente con el daño cardíaco observado (Li et al. 2009).

En conjunto, estos resultados sugieren que los macrófagos participarían en el control de la replicación de CVB3 en los tejidos estudiados, en particular los CAM Φ . Sin embargo, no serían las únicas células involucradas ya que en los animales infectados y deplecionados el virus fue eliminado en sangre y bazo para el día 7 pi, en forma similar a los animales no deplecionados. Por otro lado, el daño tisular observado a 7 dpi fue menor en los animales infectados y deplecionados en comparación a los infectados, lo que confirmaría el rol de los macrófagos CAM Φ en la injuria de los cardiomiocitos presente durante la infección aguda.

Como resultado de la infección se pudo observar un aumento en los niveles de iNOS en el tejido cardíaco, coincidente con la activación de los macrófagos. Como era de esperar, la depleción de estas células condujo a una disminución en los niveles del transcripto, lo que

sería coherente con el hecho de que, al menos en el corazón y durante la MV aguda, este gen es expresado principalmente en macrófagos infiltrados.

En cuanto a Gal-3, pudimos observar un aumento en los niveles de esta lectina, tanto a nivel del transcripto como de la proteína en las lesiones inflamatorias en corazón durante la fase aguda de la MV inducida por CVB3. La depleción de macrófagos condujo a una disminución en los niveles de Gal-3, coherente con la observada expresión de Gal-3 en los macrófagos del exudado inflamatorio miocárdico. La inducción en la expresión de esta lectina en macrófagos como consecuencia de la infección por CVB3 había sido observada previamente en nuestros estudios *in vitro* sobre células J774.1. Si bien los resultados podrían haber sido distintos ya que *in vivo* hay otros tipos celulares y moléculas involucradas, fueron esencialmente coincidentes con los observados *in vitro*, sugiriendo que más allá del entorno, la infección por CVB3 es capaz de inducir la expresión de Gal-3, al menos en los macrófagos, en forma directa.

Cuando se analizó las consecuencias de la ausencia de Gal-3 en la infección aguda, a pesar de utilizarse una cepa más resistente a la infección, se observó una mortalidad más elevada en los animales KO. Esto llevó a utilizar animales de mayor edad, los cuales resultaron considerablemente más resistentes a la infección por CVB3, lo que no permitió observar las lesiones agudas o crónicas inducidas por el virus que se habían observado en los ratones C3H/HeJ. Al respecto, se ha reportado que la pérdida de Gal-3 resulta en una menor susceptibilidad a la artritis inducida por antígeno (Forsman et al. 2011), el daño cerebral por hipoxia (Doverhag et al. 2010) y otras condiciones patológicas asociadas con respuestas inflamatorias exageradas. Estos resultados permiten hipotetizar que Gal-3 jugaría un rol en promover la activación clásica de macrófagos y la producción de mediadores inflamatorios en el corazón luego de la infección por CVB3 aunque deberán ser confirmados en el futuro.

El análisis de la susceptibilidad a la infección en los animales KO para Gal-3 mostró un comportamiento diferencial entre páncreas y corazón, observándose un aumento en el primero y una disminución en el segundo en el título viral de los animales KO respecto de los WT. El aumento del título viral en páncreas sería coincidente con los altos niveles de expresión de Gal-3 en estos tejidos en los estadios agudos de la infección observado en los animales WT, que podría permitir postular que esta lectina tenga un rol en la en la regulación de la replicación viral diferencial en páncreas y corazón.

Por el contrario, la inhibición de Gal-3 no condujo a cambios en la viremia o títulos virales en los tejidos a 3 dpi, indicando que la proteína extracelular podría no estar involucrada en la regulación de la replicación viral. Por el contrario, como se observaron diferencias en el daño tisular, esta lectina sí tendría un rol de en las respuestas pro y antiinflamatorias que influirían en los niveles de injuria observados.

En relación a la etapa crónica de la MV inducida por CVB3, se esperaba que los resultados estarían sujetos al daño ocasionado en la etapa aguda y la correcta eliminación del virus. La necrosis de cardiomiocitos inducida por la replicación viral junto al daño producido por la respuesta inflamatoria son los elementos responsables del daño cardíaco ocasionado en la MV aguda. La eliminación de macrófagos con el consecuente aumento en los títulos virales pero una disminuida respuesta inflamatoria podría modular la subsecuente fibrosis, ya que los macrófagos pueden inducir la deposición de MEC (evaluada por los niveles de α SMA y colágeno) por parte de los miofibroblastos a través de factores profibróticos, como el TGF- β 1. Fue por lo tanto de interés evaluar si la depleción de macrófagos realizada tendría como consecuencia la persistencia del genoma viral en corazón, y eventualmente, la subsecuente inflamación crónica. Los resultados obtenidos mostraron que a pesar de la depleción de macrófagos, no pudo detectarse persistencia del genoma viral a 30 dpi, indicando que la depleción realizada no afectaría la correcta eliminación viral del tejido miocárdico.

A continuación se decidió evaluar el efecto de la depleción de macrófagos en dos estadios de la MV, en los cuales predominarían los dos fenotipos de macrófagos descriptos. En la depleción desde el día 0 pi, se eliminarían mayoritariamente los macrófagos del tipo CAM Φ , mientras que en la depleción desde el día 14 pi (con la infección ya resuelta), eliminaría macrófagos en la etapa de resolución del daño y la inflamación del tipo AAM Φ . De esta forma se evaluaría que efecto tiene la depleción de macrófagos en la etapa aguda o subaguda sobre la fibrosis inducida como consecuencia del daño o de la formación excesiva de MEC.

Coherente con el menor daño tisular observado a 7 dpi en los animales deplecionados de macrófagos, se observó que los animales depletados de macrófagos a 0 dpi presentaron menos fibrosis y depósitos de colágeno y menores niveles de los marcadores de fibrosis α SMA, TGF β , proColl lo que sería coherente con que la fibrosis observada en la etapa crónica de la miocarditis viral es resultado de mecanismos de reparación del daño cardíaco previo (Papageorgiou et al. 2012).

La depleción de macrófagos a 14 dpi resultó en menor cantidad y tamaño de los focos fibróticos en los animales estudiados. Estos resultados indicarían que la depleción a partir del 14 dpi alcanzaría para revertir la fibrosis inducida por los mecanismos de reparación. Sin embargo, los niveles de transcripto de los marcadores de fibrosis estudiados no mostraron diferencias con los obtenidos en los animales infectados sin deplecionar. Esta controversia en los resultados obtenidos deberá ser resuelta en el futuro, quizás ampliando el número de casos a estudiar.

En cuanto a Gal-3, el hecho que se haya asociado a fibrosis en una amplia variedad de tejidos incluido el corazón (Henderson et al. 2006; Henderson et al. 2008; Mackinnon et al. 2011; Yu et al. 2012), justificó el interés de evaluar su rol en la fibrosis inducida por CVB. Desafortunadamente, sólo han podido realizarse experimentos en animales Gal-3 KO y tratados con el inhibidor Gal-3i en la etapa aguda de la miocarditis, quedando aún por estudiar las consecuencias de la eliminación o inhibición de esta proteína en la etapa crónica de la MV inducida por CVB3.

Al presente, este trabajo es el primero en analizar el rol de los macrófagos en la MV aguda producida por CVB3. A su vez, es la primera vez que se estudia el rol de Gal-3 en la misma, y si bien se han generado un buen número de resultados también se han generado un gran número de interrogantes que deberán ser resueltos en trabajos futuros.



IV. Conclusiones finales

Conclusiones finales

En el presente trabajo de tesis se analizaron principalmente tres tipos celulares y su relación con la miocarditis viral, los daños producidos por la infección y la fibrosis a nivel de la susceptibilidad a la infección, la sobrevivencia celular, los niveles del o los receptores y el grado de activación. Pudimos observar que:

1. En cardiomiocitos humanos, los niveles del receptor CAR disminuyen con la diferenciación, correlacionando con una menor susceptibilidad a la infección. Debido a que CVB es un virus usualmente lítico, no resulto extraño que la infección ocasionara muerte celular.
2. La aproximación en el modelo murino mostró resultados similares al estudio en cardiomiocitos humanos, confirmando que la variación en los niveles del receptor podría ser la causa de la susceptibilidad diferencial observada entre animales recién nacidos y adultos.
3. Los niveles del receptor CAR tanto en los estudios *in vitro* como los *in vivo*, permitieron justificar la susceptibilidad diferencial observada entre animales recién nacidos y adultos a la infección por CVB3, junto a las diferencias de susceptibilidad a la miocarditis viral observada entre distintas cepas murinas.
4. Pudimos confirmar que los macrófagos son susceptibles a la infección por CVB3 y este proceso desencadena la activación de los mismos por un mecanismo del tipo CAM Φ o M1, asociado a una respuesta proinflamatoria.
5. La activación de macrófagos previo a la infección viral, tanto por PMA como por LPS resultó en menor replicación viral, la cual correlacionó positivamente con un aumento en los niveles de iNOS, asociados a un fenotipo CAM Φ , y negativamente con los niveles de mRNA de IFN- $I\beta$, indicando que es iNOS y no IFN- $I\beta$, el principal responsable de modular la infección por CVB3 en macrófagos.
6. Nuestros resultados mostraron que la infección de macrófagos en cultivo condujo a un aumento en los niveles de Gal-3, en conjunto al marcador de CAM Φ , iNOS, sugiriendo que en la infección por CVB3, Gal-3 se estaría expresando en macrófagos con características de CAM Φ .
7. Este es el primer estudio que relaciona a CVB3 con la sobreexpresión y/o secreción de Gal-3 en macrófagos.
8. Este es el primer trabajo que analiza exclusivamente el rol de los macrófagos en la miocarditis viral y la fibrosis asociando su presencia a mayor fibrosis.

9. Nuestros resultados sugieren que Gal-3 intracelular y no la extracelular está involucrada en la regulación de la replicación viral.



V. Perspectivas

Perspectivas

- 1.** Queda por evaluar la importancia de los niveles de IFN- β en corazón en comparación a los niveles del receptor respecto a la susceptibilidad de las células cardíacas a la infección. Utilizando anticuerpos neutralizantes contra IFN- β en animales o cardiomiocitos con distintos niveles del receptor permitirán evaluar el peso de esta citoquina o el receptor en determinar la susceptibilidad a la infección viral.
- 2.** Los macrófagos jugarían un rol significativo en la necrosis de los cardiomiocitos durante la etapa aguda de la miocarditis viral inducida por CVB3. El análisis de los parámetros pro y antiinflamatorios y los títulos virales permitirán precisar la importancia de este tipo celular en controlar la infección, el daño y la reparación del corazón en la miocarditis viral inducida por CVB3.
- 3.** Futuros experimentos en los ratones KOs y animales tratados con Gal-3i permitirán correlacionar la infección por CVB3 con la activación de macrófagos, la sobreexpresión y secreción de Gal-3 y la fibrosis cardíaca.



VI. Referencias

Referencias

- Acosta, D., K. Ramos, et al. (1983). "Cellular injury of primary cultures of rat myocytes incubated in calcium-free medium followed by recovery in calcium." In Vitro **19**(2): 141-144.
- Adams, D. O. and T. A. Hamilton (1984). "The cell biology of macrophage activation." Annu Rev Immunol **2**: 283-318.
- Ahn, J., Y. Jee, et al. (2008). "Primary neurons become less susceptible to coxsackievirus B5 following maturation: the correlation with the decreased level of CAR expression on cell surface." J Med Virol **80**(3): 434-440.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Balligand, J. L., D. Ungureanu, et al. (1993). "Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium." J Clin Invest **91**(5): 2314-2319.
- Banerjee, R., A. Echeverri, et al. (1997). "Poliovirus-encoded 2C polypeptide specifically binds to the 3'-terminal sequences of viral negative-strand RNA." J Virol **71**(12): 9570-9578.
- Barral, P. M., J. M. Morrison, et al. (2007). "MDA-5 is cleaved in poliovirus-infected cells." J Virol **81**(8): 3677-3684.
- Barral, P. M., D. Sarkar, et al. (2009). "RIG-I is cleaved during picornavirus infection." Virology **391**(2): 171-176.
- Basavappa, R., R. Syed, et al. (1994). "Role and mechanism of the maturation cleavage of VPO in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution." Protein Sci **3**(10): 1651-1669.
- Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, et al. (1997). "Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5." Science **275**(5304): 1320-1323.
- Bergelson, J. M., J. G. Mohanty, et al. (1995). "Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55)." J Virol **69**(3): 1903-1906.
- Bolten, R., D. Egger, et al. (1998). "Intracellular localization of poliovirus plus- and minus-strand RNA visualized by strand-specific fluorescent In situ hybridization." J Virol **72**(11): 8578-8585.
- Bonderoff, J. M. and R. E. Lloyd (2008). "CVB translation: lessons from the polioviruses." Curr Top Microbiol Immunol **323**: 123-147.
- Borrow, P., L. Martinez-Sobrido, et al. (2010). "Inhibition of the type I interferon antiviral response during arenavirus infection." Viruses **2**(11): 2443-2480.
- Bowles, N. E., P. J. Richardson, et al. (1986). "Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy." Lancet **1**(8490): 1120-1123.
- Bowles, N. E., M. L. Rose, et al. (1989). "End-stage dilated cardiomyopathy. Persistence of enterovirus RNA in myocardium at cardiac transplantation and lack of immune response." Circulation **80**(5): 1128-1136.
- Bowles, N. E. and J. A. Towbin (1998). "Molecular aspects of myocarditis." Curr Opin Cardiol **13**(3): 179-184.
- Brass, A. L., I. C. Huang, et al. (2009). "The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus." Cell **139**(7): 1243-1254.
- Brokman, I., O. Pomp, et al. (2009). "Genetic modification of human embryonic stem cells with adenoviral vectors: differences of infectability between lines and correlation of infectability with expression of the coxsackie and adenovirus receptor." Stem Cells Dev **18**(3): 447-456.

- Brunetti, L. and E. R. DeSantis (2008). "Treatment of viral myocarditis caused by coxsackievirus B." Am J Health Syst Pharm **65**(2): 132-137.
- Calabrese, F. and G. Thiene (2003). "Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: microbiological and molecular biological aspects." Cardiovasc Res **60**(1): 11-25.
- Cambon, N. and M. A. Sussman (1997). "Isolation and preparation of single mouse cardiomyocytes for confocal microscopy." Methods in Cell Science **19**: 83-90.
- Cerliani, J. P., S. R. Stowell, et al. (2011). "Expanding the universe of cytokines and pattern recognition receptors: galectins and glycans in innate immunity." J Clin Immunol **31**(1): 10-21.
- Cihakova, D. and N. R. Rose (2008). "Pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy." Adv Immunol **99**: 95-114.
- Classen, A., J. Lloberas, et al. (2009). "Macrophage activation: classical versus alternative." Methods Mol Biol **531**: 29-43.
- Cohen, C. J., J. T. Shieh, et al. (2001). "The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15191-15196.
- Correa, S. G., C. E. Sotomayor, et al. (2003). "Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages." Glycobiology **13**(2): 119-128.
- Corsten, M. F., B. Schroen, et al. (2012). "Inflammation in viral myocarditis: friend or foe?" Trends Mol Med **18**(7): 426-437.
- Coyne, C. B. and J. M. Bergelson (2006). "Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions." Cell **124**(1): 119-131.
- Chow, L. H., K. W. Beisel, et al. (1992). "Enteroviral infection of mice with severe combined immunodeficiency. Evidence for direct viral pathogenesis of myocardial injury." Lab Invest **66**(1): 24-31.
- Dalldorf, G. (1955). "The Coxsackie viruses." Annu Rev Microbiol **9**: 277-296.
- Dalldorf, G. and G. M. Sickles (1948). "An Unidentified, Filtrable Agent Isolated From the Feces of Children With Paralysis." Science **108**(2794): 61-62.
- Dec, G. W. and V. Fuster (1994). "Idiopathic dilated cardiomyopathy." N Engl J Med **331**(23): 1564-1575.
- Demotte, N., G. Wieers, et al. (2010). "A galectin-3 ligand corrects the impaired function of human CD4 and CD8 tumor-infiltrating lymphocytes and favors tumor rejection in mice." Cancer Res **70**(19): 7476-7488.
- Deonarain, R., D. Cerullo, et al. (2004). "Protective role for interferon-beta in coxsackievirus B3 infection." Circulation **110**(23): 3540-3543.
- Dietz, A. B., P. A. Bulur, et al. (2000). "Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization." Biochem Biophys Res Commun **275**(3): 731-738.
- Djemadji-Oudjil, N., S. Goerdt, et al. (1996). "Immunohistochemical identification of type II alternatively activated dendritic macrophages (RM 3/1+3, MS-1+/-, 25F9-) in psoriatic dermis." Arch Dermatol Res **288**(12): 757-764.
- Dong, S. and R. C. Hughes (1996). "Galectin-3 stimulates uptake of extracellular Ca²⁺ in human Jurkat T-cells." FEBS Lett **395**(2-3): 165-169.
- Dong, S. and R. C. Hughes (1997). "Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen)." Glycoconj J **14**(2): 267-274.
- Doverhag, C., M. Hedtjarn, et al. (2010). "Galectin-3 contributes to neonatal hypoxic-ischemic brain injury." Neurobiol Dis **38**(1): 36-46.
- Dragomir, A. C., R. Sun, et al. (2012). "Role of Galectin-3 in Classical and Alternative Macrophage Activation in the Liver following Acetaminophen Intoxication." J Immunol **189**(12): 5934-5941.

- Duffield, J. S., S. J. Forbes, et al. (2005). "Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair." *J Clin Invest* **115**(1): 56-65.
- Duncan, R., D. Etchison, et al. (1983). "Protein synthesis eukaryotic initiation factors 4A and 4B are not altered by poliovirus infection of HeLa cells." *J Biol Chem* **258**(11): 7236-7239.
- Echeverri, A. C. and A. Dasgupta (1995). "Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding." *Virology* **208**(2): 540-553.
- Ellis, C. R. and T. Di Salvo (2007). "Myocarditis: basic and clinical aspects." *Cardiol Rev* **15**(4): 170-177.
- Esfandiarei, M. and B. M. McManus (2008). "Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis." *Annu Rev Pathol* **3**: 127-155.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (1998). "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF." *J Clin Invest* **101**(4): 890-898.
- Fairweather, D., S. Frisancho-Kiss, et al. (2006). "Complement receptor 1 and 2 deficiency increases coxsackievirus B3-induced myocarditis, dilated cardiomyopathy, and heart failure by increasing macrophages, IL-1beta, and immune complex deposition in the heart." *J Immunol* **176**(6): 3516-3524.
- Fairweather, D. and N. R. Rose (2007). "Coxsackievirus-induced myocarditis in mice: a model of autoimmune disease for studying immunotoxicity." *Methods* **41**(1): 118-122.
- Feldman, A. M. and D. McNamara (2000). "Myocarditis." *N Engl J Med* **343**(19): 1388-1398.
- Feuer, R., I. Mena, et al. (2002). "Cell cycle status affects coxsackievirus replication, persistence, and reactivation in vitro." *J Virol* **76**(9): 4430-4440.
- Feuer, R., I. Mena, et al. (2003). "Coxsackievirus B3 and the neonatal CNS: the roles of stem cells, developing neurons, and apoptosis in infection, viral dissemination, and disease." *Am J Pathol* **163**(4): 1379-1393.
- Feuer, R., R. Pagarigan, et al. (2005). "Coxsackievirus targets proliferating neuronal progenitor cells in the neonatal CNS." *J Neurosci* **25**(9): 2434-2444.
- Fields, B. N. (2001). *Virology*, Lippincott Williams & Wilkins.
- Fink, K., C. Ng, et al. (2009). "Depletion of macrophages in mice results in higher dengue virus titers and highlights the role of macrophages for virus control." *Eur J Immunol* **39**(10): 2809-2821.
- Flint, S. J., L. W. Enquist, et al. (2000). *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control*.
- Follath, F. (1999). "Nonischemic heart failure: epidemiology, pathophysiology, and progression of disease." *J Cardiovasc Pharmacol* **33**(Suppl 3): S31-35.
- Forsman, H., U. Islander, et al. (2011). "Galectin 3 aggravates joint inflammation and destruction in antigen-induced arthritis." *Arthritis Rheum* **63**(2): 445-454.
- Fowler, M., R. J. Thomas, et al. (2006). "Galectin-3 binds to Helicobacter pylori O-antigen: it is upregulated and rapidly secreted by gastric epithelial cells in response to H. pylori adhesion." *Cell Microbiol* **8**(1): 44-54.
- Freimuth, P., L. Philipson, et al. (2007). The Coxsackievirus and Adenovirus Receptor. *Group B Coxsackieviruses*. R. W. Compans, M. D. Cooper, T. Honjo et al, Springer.
- Freimuth, P., L. Philipson, et al. (2008). "The coxsackievirus and adenovirus receptor." *Curr Top Microbiol Immunol* **323**: 67-87.
- Fricks, C. E. and J. M. Hogle (1990). "Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding." *J Virol* **64**(5): 1934-1945.
- Frigeri, L. G., R. I. Zuberi, et al. (1993). "Epsilon BP, a beta-galactoside-binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc epsilon RI) and activates mast cells." *Biochemistry* **32**(30): 7644-7649.

- Furukawa, Y., K. Kobuke, et al. (2001). "Role of cytokines in autoimmune myocarditis and cardiomyopathy." Autoimmunity **34**(3): 165-168.
- Fuse, K., G. Chan, et al. (2005). "Myeloid differentiation factor-88 plays a crucial role in the pathogenesis of Coxsackievirus B3-induced myocarditis and influences type I interferon production." Circulation **112**(15): 2276-2285.
- Gauntt, C. and S. Huber (2003). "Coxsackievirus experimental heart diseases." Front Biosci **8**: e23-35.
- Gear, J. and V. Measroch (1958). "Cases of meningo-encephalitis due to the Coxsackie A-like ECHO 9 virus." S Afr Med J **32**(44): 1062-1066.
- Gifford, R. and G. Dalldorf (1951). "The morbid anatomy of experimental Coxsackie virus infection." Am J Pathol **27**(6): 1047-1063.
- Godeny, E. K. and C. J. Gauntt (1986). "Involvement of natural killer cells in coxsackievirus B3-induced murine myocarditis." J Immunol **137**(5): 1695-1702.
- Goerdts, S., R. Bhardwaj, et al. (1993). "Inducible expression of MS-1 high-molecular-weight protein by endothelial cells of continuous origin and by dendritic cells/macrophages in vivo and in vitro." Am J Pathol **142**(5): 1409-1422.
- Goerdts, S. and C. E. Orfanos (1999). "Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells." Immunity **10**(2): 137-142.
- Gomez, R. M., C. G. Castagnino, et al. (1992). "Extracellular matrix remodelling after coxsackievirus B3-induced murine myocarditis." Int J Exp Pathol **73**(5): 643-653.
- Gomez, R. M., X. Cui, et al. (1993). "Differential behaviour in pancreas and heart of two coxsackievirus B3 variants." Intervirology **36**(3): 153-160.
- Gomez, R. M., E. F. Lascano, et al. (1991). "Murine acinar pancreatitis preceding necrotizing myocarditis after Coxsackievirus B3 inoculation." J Med Virol **35**(2): 71-75.
- Gomez, R. M., A. Yep, et al. (2003). "Junin virus-induced astrocytosis is impaired by iNOS inhibition." J Med Virol **69**(1): 145-149.
- Gough, D. J., N. L. Messina, et al. (2012). "Constitutive type I interferon modulates homeostatic balance through tonic signaling." Immunity **36**(2): 166-174.
- Greenwald, A. G., R. Jin, et al. (2009). "Galectin-3-mediated xenoactivation of human monocytes." Transplantation **87**(1): 44-51.
- Grist, N. R. and D. Reid (1993). Viral infections of the heart. Principles and Practise of Infectious Diseases. J. Banatvala. London, Arnold: 23-31.
- Gulick, T., M. K. Chung, et al. (1989). "Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(17): 6753-6757.
- Hafenstein, S., V. D. Bowman, et al. (2007). "Interaction of decay-accelerating factor with coxsackievirus B3." J Virol **81**(23): 12927-12935.
- Hanecak, R., B. L. Semler, et al. (1982). "Proteolytic processing of poliovirus polypeptides: antibodies to polypeptide P3-7c inhibit cleavage at glutamine-glycine pairs." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(13): 3973-3977.
- Harris, K. S., W. Xiang, et al. (1994). "Interaction of poliovirus polypeptide 3CDpro with the 5' and 3' termini of the poliovirus genome. Identification of viral and cellular cofactors needed for efficient binding." J Biol Chem **269**(43): 27004-27014.
- He, J. Q., Y. Ma, et al. (2003). "Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization." Circ Res **93**(1): 32-39.
- Hearse, D. J., S. M. Humphrey, et al. (1978). "The calcium paradox: metabolic, electrophysiological, contractile and ultrastructural characteristics in four species." Eur J Cardiol **7**(4): 241-256.
- Heim, A., S. Zeuke, et al. (2000). "Transient induction of cytokine production in human myocardial fibroblasts by coxsackievirus B3." Circ Res **86**(7): 753-759.

- Henderson, N. C., A. C. Mackinnon, et al. (2008). "Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis." Am J Pathol **172**(2): 288-298.
- Henderson, N. C., A. C. Mackinnon, et al. (2006). "Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(13): 5060-5065.
- Hendry, E., H. Hatanaka, et al. (1999). "The crystal structure of coxsackievirus A9: new insights into the uncoating mechanisms of enteroviruses." Structure **7**(12): 1527-1538.
- Henke, A., C. Mohr, et al. (1992). "Coxsackievirus B3-induced production of tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 in human monocytes." J Immunol **148**(7): 2270-2277.
- Hiraoka, Y., C. Kishimoto, et al. (1996). "Nitric oxide and murine coxsackievirus B3 myocarditis: aggravation of myocarditis by inhibition of nitric oxide synthase." J Am Coll Cardiol **28**(6): 1610-1615.
- Hirasawa, K., S. Tsutsui, et al. (1996). "Depletion of Mac1-positive macrophages protects DBA/2 mice from encephalomyocarditis virus-induced myocarditis and diabetes." J Gen Virol **77 (Pt 4)**: 737-741.
- Ho, M. K. and T. A. Springer (1982). "Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies." J Immunol **128**(3): 1221-1228.
- Hoebe, K., X. Du, et al. (2003). "Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling." Nature **424**(6950): 743-748.
- Hope, D. A., S. E. Diamond, et al. (1997). "Genetic dissection of interaction between poliovirus 3D polymerase and viral protein 3AB." J Virol **71**(12): 9490-9498.
- Hsu, D. K., S. R. Hammes, et al. (1996). "Human T lymphotropic virus-I infection of human T lymphocytes induces expression of the beta-galactoside-binding lectin, galectin-3." Am J Pathol **148**(5): 1661-1670.
- Hsu, D. K., R. Y. Yang, et al. (2000). "Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses." Am J Pathol **156**(3): 1073-1083.
- Huber, S. A. (1997). "Autoimmunity in myocarditis: relevance of animal models." Clin Immunol Immunopathol **83**(2): 93-102.
- Inohara, H., S. Akahani, et al. (1998). "Galectin-3 stimulates cell proliferation." Exp Cell Res **245**(2): 294-302.
- Jakel, S., U. Kuckelkorn, et al. (2009). "Differential interferon responses enhance viral epitope generation by myocardial immunoproteasomes in murine enterovirus myocarditis." Am J Pathol **175**(2): 510-518.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.
- Jang, S. K., H. G. Krausslich, et al. (1988). "A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation." J Virol **62**(8): 2636-2643.
- Jaquenod De Giusti, C., L. Alberdi, et al. (2011). "Galectin-3 is upregulated in activated glia during Junin virus-induced murine encephalitis." Neurosci Lett **501**(3): 163-166.
- Kallewaard, N. L., L. Zhang, et al. (2009). "Tissue-specific deletion of the coxsackievirus and adenovirus receptor protects mice from virus-induced pancreatitis and myocarditis." Cell Host Microbe **6**(1): 91-98.
- Kandolf, R., D. Ameis, et al. (1987). "In situ detection of enteroviral genomes in myocardial cells by nucleic acid hybridization: an approach to the diagnosis of viral heart disease." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(17): 6272-6276.
- Kandolf, R., A. Canu, et al. (1985). "Coxsackie B3 virus can replicate in cultured human foetal heart cells and is inhibited by interferon." J Mol Cell Cardiol **17**: 167-175.
- Kandolf, R., A. Canu, et al. (1985). "Coxsackie B3 virus can replicate in cultured human foetal heart cells and is inhibited by interferon." J Mol Cell Cardiol **17**(2): 167-181.

- Kandolf, R., K. Klingel, et al. (1991). "Molecular studies on enteroviral heart disease: patterns of acute and persistent infections." Eur Heart J **12 Suppl D**: 49-55.
- Kandolf, R., M. Sauter, et al. (1999). "Mechanisms and consequences of enterovirus persistence in cardiac myocytes and cells of the immune system." Virus Res **62(2)**: 149-158.
- Kato, H., S. Sato, et al. (2005). "Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response." Immunity **23(1)**: 19-28.
- Kawai, C. (1999). "From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future." Circulation **99**: 1091-1100.
- Kehat, I., D. Kenyagin-Karsenti, et al. (2001). "Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes." J Clin Invest **108(3)**: 407-414.
- King, R. D., J. M. Lubinski, et al. (2009). "Herpes simplex virus type 1 infection increases the carbohydrate binding activity and the secretion of cellular galectin-3." Arch Virol **154(4)**: 609-618.
- Klingel, K., C. Hohenadl, et al. (1992). "Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation." Proc Natl Acad Sci U S A **89(1)**: 314-318.
- Klingel, K., S. Stephan, et al. (1996). "Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: virus dissemination and immune cell targets." J Virol **70(12)**: 8888-8895.
- Knowlton, K. U., E. S. Jeon, et al. (1996). "A mutation in the puff region of VP2 attenuates the myocarditic phenotype of an infectious cDNA of the Woodruff variant of coxsackievirus B3." J Virol **70(11)**: 7811-7818.
- Koopman, L. A., H. D. Kopcow, et al. (2003). "Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential." J Exp Med **198(8)**: 1201-1212.
- Krausslich, H. G., M. J. Nicklin, et al. (1987). "Poliovirus proteinase 2A induces cleavage of eucaryotic initiation factor 4F polypeptide p220." J Virol **61(9)**: 2711-2718.
- Kumar, D., L. Nath, et al. (2010). "Genome-wide analysis of the host intracellular network that regulates survival of Mycobacterium tuberculosis." Cell **140(5)**: 731-743.
- Lang, C., M. Sauter, et al. (2008). "Connective tissue growth factor: a crucial cytokine-mediating cardiac fibrosis in ongoing enterovirus myocarditis." J Mol Med (Berl) **86(1)**: 49-60.
- Laskin, D. L. (2009). "Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces." Chem Res Toxicol **22(8)**: 1376-1385.
- Laskin, D. L., V. R. Sunil, et al. (2011). "Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction?" Annu Rev Pharmacol Toxicol **51**: 267-288.
- Lawson, M. A., B. Dasmahapatra, et al. (1990). "Species-specific substrate interaction of picornavirus 3C proteinase suballelic exchange mutants." J Biol Chem **265(26)**: 15920-15931.
- Lev, S., I. Kehat, et al. (2005). "Differentiation pathways in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes." Ann N Y Acad Sci **1047**: 50-65.
- Li, K., W. Xu, et al. (2009). "Differential macrophage polarization in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus B3 defines susceptibility to viral myocarditis." Circ Res **105(4)**: 353-364.
- Li, Y., M. Komai-Koma, et al. (2008). "Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation." J Immunol **181(4)**: 2781-2789.
- Lijnen, P. J., V. V. Petrov, et al. (2000). "Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1)." Mol Genet Metab **71(1-2)**: 418-435.

- Lim, B. K., D. Xiong, et al. (2008). "Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) mediates atrioventricular-node function and connexin 45 localization in the murine heart." J Clin Invest **118**(8): 2758-2770.
- Liu, F. T., D. K. Hsu, et al. (1995). "Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages." Am J Pathol **147**(4): 1016-1028.
- Lowenstein, C. J., S. L. Hill, et al. (1996). "Nitric oxide inhibits viral replication in murine myocarditis." J Clin Invest **97**(8): 1837-1843.
- Lutton, C. W. and C. J. Gauntt (1985). "Ameliorating effect of IFN-beta and anti-IFN-beta on coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice." J Interferon Res **5**(1): 137-146.
- MacKinnon, A. C., S. L. Farnworth, et al. (2008). "Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3." J Immunol **180**(4): 2650-2658.
- Mackinnon, A. C., M. A. Gibbons, et al. (2011). "Regulation of TGF-beta1 Driven Lung Fibrosis by Galectin-3." Am J Respir Crit Care Med.
- Macmicking, J. D. (2012). "Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity." Nat Rev Immunol **12**(5): 367-382.
- Mahy, B. W. J. (2007). *Coxsackie B Viruses: An Introduction. Group B Coxsackieviruses*. R. W. Compans, M. D. Cooper, T. Honjo et al, Springer.
- Maisch, B., A. Richter, et al. (2005). "Inflammatory dilated cardiomyopathy (DCMI)." Herz **30**(6): 535-544.
- Manolio, T. A., K. L. Baughman, et al. (1992). "Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute workshop)." Am J Cardiol **69**(17): 1458-1466.
- McChesney, M. B. and M. B. Oldstone (1987). "Viruses perturb lymphocyte functions: selected principles characterizing virus-induced immunosuppression." Annu Rev Immunol **5**: 279-304.
- Mena, I., C. M. Perry, et al. (1999). "The role of B lymphocytes in coxsackievirus B3 infection." Am J Pathol **155**(4): 1205-1215.
- Mey, A., H. Leffler, et al. (1996). "The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaccharides via two independent sites." J Immunol **156**(4): 1572-1577.
- Miwa, T., M. A. Maldonado, et al. (2007). "Decay-accelerating factor ameliorates systemic autoimmune disease in MRL/lpr mice via both complement-dependent and -independent mechanisms." Am J Pathol **170**(4): 1258-1266.
- Mogensen, S. C. (1979). "Role of macrophages in natural resistance to virus infections." Microbiol Rev **43**(1): 1-26.
- Moutsatsos, I. K., M. Wade, et al. (1987). "Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(18): 6452-6456.
- Mues, B., D. Langer, et al. (1989). "Phenotypic characterization of macrophages in human term placenta." Immunology **67**(3): 303-307.
- Mukherjee, A., S. A. Morosky, et al. (2011). "The coxsackievirus B 3C protease cleaves MAVS and TRIF to attenuate host type I interferon and apoptotic signaling." PLoS Pathog **7**(3): e1001311.
- Nagy, P. D. and J. Pogany (2012). "The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors." Nat Rev Microbiol **10**(2): 137-149.
- Nicklin, M. J., K. S. Harris, et al. (1988). "Poliovirus proteinase 3C: large-scale expression, purification, and specific cleavage activity on natural and synthetic substrates in vitro." J Virol **62**(12): 4586-4593.
- Nieminen, J., C. St-Pierre, et al. (2008). "Role of galectin-3 in leukocyte recruitment in a murine model of lung infection by *Streptococcus pneumoniae*." J Immunol **180**(4): 2466-2473.

- Noren, G. R., N. A. Staley, et al. (1977). "Occurrence of myocarditis in sudden death in children." J Forensic Sci **22**(1): 188-196.
- Noutsias, M., H. Fechner, et al. (2001). "Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections." Circulation **104**(3): 275-280.
- Novak, R., S. Dabelic, et al. (2011). "Galectin-1 and galectin-3 expression profiles in classically and alternatively activated human macrophages." Biochim Biophys Acta.
- O'Connell, J. B. (1987). "The role of myocarditis in end-stage dilated cardiomyopathy." Tex Heart Inst J **14**(3): 268-275.
- O'Connell, T. D., M. C. Rodrigo, et al. (2007). "Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes." Methods Mol Biol **357**: 271-296.
- Ohtsuka, S. and S. Dalton (2008). "Molecular and biological properties of pluripotent embryonic stem cells." Gene Ther **15**(2): 74-81.
- Paloheimo, O., T. O. Ihalainen, et al. (2011). "Coxsackievirus B3-induced cellular protrusions: structural characteristics and functional competence." J Virol **85**(13): 6714-6724.
- Pallansch, M. A. and R. P. Roos (2001). Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. Virology. B. N. Fields, P. M. Howley, D. E. Griffin et al. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. **1**: 589-630.
- Papageorgiou, A. P. and S. Heymans (2012). Interactions between the extracellular matrix and inflammation during viral myocarditis. Immunobiology. **217**: 503-510.
- Patel, K. P., C. B. Coyne, et al. (2009). "Dynamin- and lipid raft-dependent entry of decay-accelerating factor (DAF)-binding and non-DAF-binding coxsackieviruses into nonpolarized cells." J Virol **83**(21): 11064-11077.
- Pauschinger, M., K. Chandrasekharan, et al. (2004). "Viral heart disease: molecular diagnosis, clinical prognosis, and treatment strategies." Med Microbiol Immunol (Berl) **193**: 65-69.
- Pauschinger, M., D. Knopf, et al. (1999). "Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio." Circulation **99**(21): 2750-2756.
- Pelletier, J. and N. Sonenberg (1988). "Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA." Nature **334**(6180): 320-325.
- Perrone, S. and R. M. Gómez (2003). Miocarditis. Cardiología. B. Mautner, Buenos Aires, Grupo Guia: 542-546.
- Petrov, V. V., R. H. Fagard, et al. (2002). "Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts." Hypertension **39**(2): 258-263.
- Pinkert, S., K. Klingel, et al. (2011). "Virus-host coevolution in a persistently coxsackievirus B3-infected cardiomyocyte cell line." J Virol **85**(24): 13409-13419.
- Poller, W., H. Fechner, et al. (2002). "Highly variable expression of virus receptors in the human cardiovascular system. Implications for cardiotropic viral infections and gene therapy." Z Kardiol **91**(12): 978-991.
- Porcheray, F., S. Viaud, et al. (2005). "Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation." Clin Exp Immunol **142**(3): 481-489.
- Porter, K. E. and N. A. Turner (2009). "Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling." Pharmacol Ther **123**(2): 255-278.
- Rabinovich, G. A., M. A. Toscano, et al. (2007). "Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices." Curr Opin Struct Biol **17**(5): 513-520.
- Racaniello, V. R. (2001). Polioviruses. Virology. B. N. Fields, P. M. Howley, G. Diane E. et al, Lippincott Williams & Wilkins. **1**: 589-629.
- Racaniello, V. R. (2006). "One hundred years of poliovirus pathogenesis." Virology **344**(1): 9-16.

- Rager-Zisman, B. and A. C. Allison (1973). "The role of antibody and host cells in the resistance of mice against infection by coxsackie B-3 virus." J Gen Virol **19**(3): 329-338.
- Raschperger, E., J. Thyberg, et al. (2006). "The coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) is an in vivo marker for epithelial tight junctions, with a potential role in regulating permeability and tissue homeostasis." Exp Cell Res **312**(9): 1566-1580.
- Raya, A., I. Rodriguez-Piza, et al. (2008). "Generation of cardiomyocytes from new human embryonic stem cell lines derived from poor-quality blastocysts." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **73**: 127-135.
- Reed, L. J. and H. Muench (1938). "A simple method of estimating fifty percent endpoints." American Journal of Epidemiology **27**(3): 493-497.
- Reppel, M., P. Igelmund, et al. (2007). "Effect of cardioactive drugs on action potential generation and propagation in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes." Cell Physiol Biochem **19**(5-6): 213-224.
- Rose, N. R. and S. L. Hill (1996). "The pathogenesis of postinfectious myocarditis." Clinical Immunology & Immunopathology **80**(3 Pt 2): S92-99.
- Saffitz, J. E. (1999). "Toward a clearer understanding of the link between viral infection of the heart and dilated cardiomyopathy." Adv Anat Pathol **6**(3): 154-160.
- Saffitz, J. E. (1999). "Toward a clearer understanding of the link between viral infection of the heart and dilated cardiomyopathy." Adv Anat Pathol **6**: 154-160.
- Sano, H., D. K. Hsu, et al. (2000). "Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages." J Immunol **165**(4): 2156-2164.
- Sasaki, S., Q. Bao, et al. (1999). "Galectin-3 modulates rat mesangial cell proliferation and matrix synthesis during experimental glomerulonephritis induced by anti-Thy1.1 antibodies." J Pathol **187**(4): 481-489.
- Sato, S. and R. C. Hughes (1994). "Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages." J Biol Chem **269**(6): 4424-4430.
- Sato, S., N. Ouellet, et al. (2002). "Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia." J Immunol **168**(4): 1813-1822.
- Scassa, M. E., C. Jaquenod de Giusti, et al. (2011). "Human embryonic stem cells and derived contractile embryoid bodies are susceptible to Coxsackievirus B infection and respond to interferon beta treatment." Stem Cell Res **6**(1): 13-22.
- Schoggins, J. W., S. J. Wilson, et al. (2011). "A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response." Nature **472**(7344): 481-485.
- Schroder, H. C., H. Ushijima, et al. (1995). "Expression of nuclear lectin carbohydrate-binding protein 35 in human immunodeficiency virus type 1-infected Molt-3 cells." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **9**(4): 340-348.
- Sean, P. and B. L. Semler (2008). "Coxsackievirus B RNA replication: lessons from poliovirus." Curr Top Microbiol Immunol **323**: 89-121.
- Seko, Y., H. Tsuchimochi, et al. (1990). "Expression of major histocompatibility complex class I antigen in murine ventricular myocytes infected with Coxsackievirus B3." Circ Res **67**(2): 360-367.
- Selinka, H. C., A. Wolde, et al. (2004). "Virus-receptor interactions of coxsackie B viruses and their putative influence on cardiotropism." Med Microbiol Immunol **193**(2-3): 127-131.
- Semler, B. L., C. W. Anderson, et al. (1982). "A membrane-associated precursor to poliovirus VPg identified by immunoprecipitation with antibodies directed against a synthetic heptapeptide." Cell **28**(2): 405-412.
- Shafren, D. R., R. C. Bates, et al. (1995). "Coxsackieviruses B1, B3, and B5 use decay accelerating factor as a receptor for cell attachment." J Virol **69**(6): 3873-3877.

- Shafren, D. R., D. T. Williams, et al. (1997). "A decay-accelerating factor-binding strain of coxsackievirus B3 requires the coxsackievirus-adenovirus receptor protein to mediate lytic infection of rhabdomyosarcoma cells." J Virol **71**(12): 9844-9848.
- Shaw, C. A., P. C. Holland, et al. (2004). "Isoform-specific expression of the Coxsackie and adenovirus receptor (CAR) in neuromuscular junction and cardiac intercalated discs." BMC Cell Biol **5**(1): 42.
- Shi, Y., C. Chen, et al. (2009). "Cardiac deletion of the Coxsackievirus-adenovirus receptor abolishes Coxsackievirus B3 infection and prevents myocarditis in vivo." J Am Coll Cardiol **53**(14): 1219-1226.
- Shioya, T. (2007). "A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models." J Physiol Sci **57**(6): 327-335.
- Spiller, O. B., I. G. Goodfellow, et al. (2000). "Echoviruses and coxsackie B viruses that use human decay-accelerating factor (DAF) as a receptor do not bind the rodent analogues of DAF." J Infect Dis **181**(1): 340-343.
- Stanway, G., F. Brown, et al. (2005). Picornaviridae. Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L. A. Ball. London, Elsevier/Academic Press.
- Steel, D., J. Hyllner, et al. (2009). "Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells - characteristics and utility for drug discovery." Curr Opin Drug Discov Devel **12**(1): 133-140.
- Stein, M., S. Keshav, et al. (1992). "Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation." J Exp Med **176**(1): 287-292.
- Sung, S. A., S. K. Jo, et al. (2007). "Reduction of renal fibrosis as a result of liposome encapsulated clodronate induced macrophage depletion after unilateral ureteral obstruction in rats." Nephron Exp Nephrol **105**(1): e1-9.
- Szekanecz, Z., G. K. Haines, et al. (1994). "Differential distribution of intercellular adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-2, and ICAM-3) and the MS-1 antigen in normal and diseased human synovia. Their possible pathogenetic and clinical significance in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **37**(2): 221-231.
- Tabor-Godwin, J. M., C. M. Ruller, et al. (2010). "A novel population of myeloid cells responding to coxsackievirus infection assists in the dissemination of virus within the neonatal CNS." J Neurosci **30**(25): 8676-8691.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-1147.
- Topoll, H. H., G. Zwadlo, et al. (1989). "Phenotypic dynamics of macrophage subpopulations during human experimental gingivitis." J Periodontal Res **24**(2): 106-112.
- Towner, J. S., T. V. Ho, et al. (1996). "Determinants of membrane association for poliovirus protein 3AB." J Biol Chem **271**(43): 26810-26818.
- Toyoda, H., M. J. Nicklin, et al. (1986). "A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein." Cell **45**(5): 761-770.
- Tracy, S. and C. Gauntt (2008). "Group B coxsackievirus virulence." Curr Top Microbiol Immunol **323**: 49-63.
- Tracy, S., K. Hofling, et al. (2000). "Group B coxsackievirus myocarditis and pancreatitis: connection between viral virulence phenotypes in mice." J Med Virol **62**(1): 70-81.
- Trinchieri, G. and A. Sher (2007). "Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence." Nat Rev Immunol **7**(3): 179-190.
- Uematsu, S. and S. Akira (2007). "Toll-like receptors and Type I interferons." J Biol Chem **282**(21): 15319-15323.

- Van den Heuvel, M. M., C. P. Tensen, et al. (1999). "Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation." J Leukoc Biol **66**(5): 858-866.
- van Rooijen, N. and E. Hendriks (2010). "Liposomes for specific depletion of macrophages from organs and tissues." Methods Mol Biol **605**: 189-203.
- Van Rooijen, N. and A. Sanders (1994). "Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications." J Immunol Methods **174**(1-2): 83-93.
- van Rooijen, N. and A. Sanders (1997). "Elimination, blocking, and activation of macrophages: three of a kind?" J Leukoc Biol **62**(6): 702-709.
- Vongsakul, M., J. Kasisith, et al. (2011). "The difference in IL-1beta , MIP-1alpha, IL-8 and IL-18 production between the infection of PMA activated U937 cells with recombinant vaccinia viruses inserted 2004 H5N1 influenza HA genes and NS genes." Asian Pac J Allergy Immunol **29**(4): 349-356.
- Vray, B., I. Camby, et al. (2004). "Up-regulation of galectin-3 and its ligands by Trypanosoma cruzi infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells." Glycobiology **14**(7): 647-657.
- Vuorinen, T., R. Vainionpaa, et al. (1996). "Susceptibility of human bone marrow cells and hematopoietic cell lines to coxsackievirus B3 infection." J Virol **70**(12): 9018-9023.
- Wessely, R., K. Klingel, et al. (2001). "Cardioselective infection with coxsackievirus B3 requires intact type I interferon signaling: implications for mortality and early viral replication." Circulation **103**(5): 756-761.
- Westermann, D., K. Savvatis, et al. (2010). "Immunomodulation and matrix metalloproteinases in viral myocarditis." J Mol Cell Cardiol **48**(3): 468-473.
- Woodruff, J. F. (1980). "Viral myocarditis. A review." Am J Pathol **101**(2): 425-484.
- Xiang, W., A. Cuconati, et al. (1998). "Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3Dpol with VPg and with genetic variants of 3AB." J Virol **72**(8): 6732-6741.
- Xu, C., S. Police, et al. (2002). "Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells." Circ Res **91**(6): 501-508.
- Yajima, T. (2011). "Viral myocarditis: potential defense mechanisms within the cardiomyocyte against virus infection." Future Microbiol **6**(5): 551-566.
- Yajima, T. and K. U. Knowlton (2009). "Viral myocarditis: from the perspective of the virus." Circulation **119**(19): 2615-2624.
- Yamamoto, M., S. Sato, et al. (2003). "Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway." Science **301**(5633): 640-643.
- Yamaoka, A., I. Kuwabara, et al. (1995). "A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils." J Immunol **154**(7): 3479-3487.
- Yoneyama, M. and T. Fujita (2007). "RIG-I family RNA helicases: cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity." Cytokine Growth Factor Rev **18**(5-6): 545-551.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, et al. (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." Nat Immunol **5**(7): 730-737.
- Yu, L., W. P. Ruffrook, et al. (2012). "Genetic and Pharmacological Inhibition of Galectin-3 Prevents Cardiac Remodeling by Interfering with Myocardial Fibrogenesis." Circ Heart Fail.
- Zaragoza, C., C. Ocampo, et al. (1998). "The role of inducible nitric oxide synthase in the host response to Coxsackievirus myocarditis." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2469-2474.
- Zhou, Y. Y., S. Q. Wang, et al. (2000). "Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology." Am J Physiol Heart Circ Physiol **279**(1): H429-436.

- Zimmermann, A., H. Gerber, et al. (1990). "Decay-accelerating factor in the cardiomyocytes of normal individuals and patients with myocardial infarction." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **417**(4): 299-304.
- Zuberi, R. I., D. K. Hsu, et al. (2004). "Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma." Am J Pathol **165**(6): 2045-2053.
- Zuniga, E., A. Gruppi, et al. (2001). "Regulated expression and effect of galectin-1 on Trypanosoma cruzi-infected macrophages: modulation of microbicidal activity and survival." Infect Immun **69**(11): 6804-6812.

Notas

