



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA**



**Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y
Biomedicina (CICSaB)**



**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN RESPUESTA A
LA INFECCIÓN POR EL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO CON Y
SIN LA DUPLICACIÓN EN EL GEN G EN CÉLULAS HEP-2**

TESIS QUE PRESENTA

L. E. MARÍA CAMILA LÓPEZ LOPERA

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS**

**DIRECTORES DE TESIS
DRA. MARIANA SALGADO BUSTAMANTE
DR. DANIEL NOYOLA CHERPITEL**

Octubre 2023

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Epigenética del Departamento de Bioquímica y en el Departamento de Microbiología en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la dirección de la Dra. Mariana Salgado Bustamante y el Dr. Daniel E. Noyola Cherpitel, gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que otorgó la beca número 1151258. Este proyecto se realizó gracias al financiamiento del Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) Convocatoria de Investigación Científica Básica - Proyectos de Ciencia Básica Convocatoria 2017-2018 (Proyecto clave A1-S-38080).

Tesis que presenta:

L. E. MARÍA CAMILA LÓPEZ LOPERA

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS

DIRECTORES DE TESIS

Dra. Mariana Salgado Bustamante

Dr. Daniel Noyola Cherpitel

ASESORES INTERNOS

Dra. Othir Gidalti Galicia Cruz

Dra. Esther Layseca Espinosa

JURADO

Presidenta de sinodales: Dra. Adriana Elizabeth Monsiváis Urenda

Secretaria de sinodales: Dra. Othir Gidalti Galicia Cruz

Sinodal: Dra. Esther Layseca Espinosa

Sinodal suplente: Dra. Saray Aranda Romo

Octubre 2023



Análisis de la expresión de microRNAs en respuesta a la infección por el virus sincitial respiratorio con y sin la duplicación en el gen G en células HEp-2 © 2023 Por María Camila López Lopera está licenciada bajo una [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Agradecimientos personales

Agradezco a Rebeca Mejía Saucedo, por haberme recibido en México y desde entonces, llenar de luz mi camino.

A Ana Karenina Rocha Viggiano por haber sacado lo mejor de una enfermera en el laboratorio. Gracias Ana por tu paciencia, tiempo y dedicación para enseñarme todo lo necesario para llevar a cabo mis experimentos.

A María Alejandra Botero por acompañarme y cuidarme durante toda mi maestría. A Mayra Karime Torres por su amor y apoyo incondicional.

A María Fernanda García y Ulrik Avilix Oliva, mis grandes cómplices y amigos de la generación. Volver a ser estudiante jamás habría sido tan lindo y feliz sin ustedes.

A Ana Cristina Alarcón, Bibiana Giraldo, Carolina Serna y Elizabeth Higueta, por el amor, la energía y el apoyo que me dieron desde la distancia.

A Sandra Cadena Mota, Josefina Elías Monsiváis y Bleida Elizabeth Reyna, por ser mi refugio cada día desde que llegué al departamento de Microbiología. Gracias por ser calma y sosiego para mí, en este largo y a veces pesado camino. Me siento afortunada de que hayan sido parte de mi vida.

Al Dr. Daniel E. Noyola Cherpitel, por haber creído en mí y darme las herramientas para cumplir mi sueño de hacerme maestra en Ciencias Biomédicas Básicas.

Al Dr. Juan Carlos Muñoz Escalante por su orientación y por alentarme siempre a seguir adelante.

A la Dra. Mariana Salgado Bustamante, por abrirme las puertas del Departamento de Bioquímica y de su corazón. Desde que llegué a usted, jamás me sentí sola en México. Gracias por haber sido una maestra intelectual y personal en mi vida. Me siento orgullosa y agradecida de haber sido su estudiante y me he prometido honrar todo lo que aprendí de usted donde sea que yo vaya.

A la Dra. Othir Galicia Cruz, por guiar mi aprendizaje en cultivo celular con tanta voluntad y entrega y por sostenerme con tanto amor durante todo este tiempo. Usted es ejemplo de tenacidad y fortaleza. De usted me llevo que todo en la vida es posible gracias a la fuerza inmensa y poderosa del amor.

En especial dedico esta tesis a mi mamá Nancy de Jesús y mi hermana Vanessa. Ustedes son y serán siempre los grandes amores y motores de mi vida. Por ustedes soy quien soy y pude llegar hasta aquí. Sin su presencia y apoyo, sería muy difícil para mí transitar con esperanza los caminos de la vida.

Gracias, San Luis Potosí. Me diste más de lo que esperaba y de la manera que solo un lugar con tu riqueza pudo haberme dado. Gracias México, una parte de mí vivirá siempre aquí.

Resumen: El virus sincitial respiratorio (VSR) es la causa más común de infecciones del tracto respiratorio inferior en menores de 5 años. Múltiples estudios se han enfocado en la caracterización molecular y epidemiológica de los genotipos con duplicaciones parciales en el gen G del VSR por ser los que actualmente predominan sobre los demás genotipos: VSR-A ON1 (72 nucleótidos) y VSR-B BA (60 nucleótidos). Sin embargo, los efectos de estas duplicaciones sobre algunos aspectos, como la respuesta celular del huésped a la infección, aún están por determinarse. En este estudio se analizó la expresión de microRNAs implicados en vías de señalización clásicas de la respuesta inmune celular mediada por los interferones (IFNs) tipo I y II, en un modelo *in vitro* de células HEp-2 infectadas por el VSR subtipo A con y sin la duplicación en el gen G (genotipos ON1 y NA1, respectivamente). Los resultados mostraron un perfil de expresión de los microRNAs diferente entre los genotipos, con un máximo de expresión a tiempos diferentes entre ellos. En células HEp-2 infectadas por el VSR-A NA1 la máxima expresión se registró a las 60 h.p.i., mientras que en las células infectadas por el VSR-A ON1 se registró a las 72 h.p.i. Los perfiles de expresión diferencial entre ambos genotipos, pueden formar parte de las estrategias que el VSR ha desarrollado para evadir las respuestas inmunitarias antivirales del huésped. Es posible que la duplicación parcial del gen G modifique la respuesta inmunológica en su conjunto, lo que podría conferirle a este nuevo genotipo (ON1) una ventaja de tipo inmunológico respecto a su genotipo ancestro (NA1).

Introducción

En todo el mundo, las infecciones respiratorias agudas (IRA) son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los niños menores de cinco años. Entre los patógenos virales respiratorios, el virus sincitial respiratorio (VSR) es el más comúnmente identificado en lactantes y niños pequeños con infección de las vías respiratorias inferiores (1) y también el responsable de una proporción significativa de infecciones respiratorias graves en los adultos mayores y en individuos inmunodeprimidos (2,3).

Aunque alrededor del 90% de los niños con infección por VSR presentan síntomas respiratorios leves y suelen ser tratados ambulatoriamente, este virus puede causar una enfermedad grave y esto explica, en gran medida, que sea la etiología más frecuente de ingresos hospitalarios por IRA en lactantes y la primera causa de muerte entre las infecciones respiratorias en esta misma población (1,4).

El VSR pertenece al género Orthopneumovirus y a la familia Pneumoviridae. Es un virus envuelto, pleomórfico, de ARN monocatenario en sentido negativo, con una longitud aproximada de ~15.2 kb, codificante para 11 proteínas virales (5). La variabilidad genética de la segunda región hipervariable del gen de la proteína G determina la existencia de dos grandes grupos antigénicos (VSR-A y VSR-B), cada uno de ellos con múltiples genotipos y linajes (2,3,6). Dentro de los genotipos circulantes del VSR-A, el más recientemente documentado es el VSR-A ON1, el cual tiene una característica importante que además comparte con otros genotipos del VSR-B (BA) y es la duplicación parcial del gen de la proteína G (2). ON1 es un genotipo de gran interés por tener la mayor duplicación descrita hasta la fecha, pero además por la rápida propagación que ha tenido desde su aparición, sustituyendo a su genotipo ancestro (NA1) a nivel mundial y siendo actualmente el único genotipo VSR-A que está en circulación (2,3).

Los mecanismos que conllevan al predominio de los genotipos del VSR con duplicaciones parciales del gen G sobre otros genotipos siguen siendo objeto de estudio. Lo que es conocido es que la proteína G tiene un rol importante en la inmunogenicidad, la patogenicidad del virus

y la gravedad de la enfermedad; todo esto debido a su capacidad para modificar y evadir las respuestas inmunitarias del huésped para promover la infección por el VSR (2)(5).

Por otro lado, se ha demostrado que el VSR, a través de distintas proteínas, incluyendo la proteína G y del ARN viral, puede regular la expresión de genes de la inmunidad innata y adaptativa, lo que implica un antagonismo de la respuesta antivírica del huésped, a su vez, se correlaciona con la gravedad de la enfermedad (5,7). Así mismo, se han identificado cambios en el perfil de expresión de diferentes microRNAs durante la infección por el VSR y se ha destacado su importancia en la patogénesis y replicación viral, así como en la modificación de las respuestas del huésped a la infección (5,8,9).

Esto supondría que, quizá uno de los mecanismos del VSR para regular la expresión de algunos genes de respuesta inmunitaria, es precisamente modular la expresión de microRNAs que tienen como blanco ARNm que codifican para proteínas o moléculas esenciales en las vías de señalización intracelular que se activan en el huésped ante la infección causada por el VSR, con el objetivo de detenerla y eliminar las células infectadas (10).

Considerando lo anterior, en este trabajo se propuso como objetivo el análisis de la expresión de miR-30b-5p, miR-26b-5p, miR-24-3p y let-7i-5p en un modelo *in vitro* de células HEp-2 infectadas con el VSR-A y comparar la expresión durante la infección causada por el virus con y sin la duplicación parcial en el gen G (ON1 y NA1, respectivamente).

Este es el primer estudio sobre el perfil de expresión de microRNAs que regulan la expresión de genes implicados en la respuesta antiviral del huésped frente a la infección por el VSR enfocado en el más reciente y predominante genotipo del VSR-A (ON1), así como en su genotipo ancestro (NA1). Los resultados aportan conocimiento respecto a la posible asociación entre la duplicación de 72 nucleótidos en el gen G del VSR-A y la regulación de la expresión relativa de miR-30b-5p, miR-26b-5p, miR-24-3p y let-7i-5p y esto nos acerca a comprender si los mecanismos evolutivos del virus tienen relación con diferencias en las respuestas inmunológicas moleculares del huésped.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Las células HEp-2 (ATCC CCL-23), se cultivaron en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Corning cat. 50-003-PB, 4.5 g/L de glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio sin bicarbonato de sodio), suplementado con suero bovino fetal al 5% (Gibco Ref.26140-079) y penicilina – estreptomicina 100 U-100 µg/mL (Pisa, Pisacilina 1.000.000 U; Sulfestrep 1 g). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂ en una incubadora Thermo Fisher Scientific (Mod.3403) y se les realizó cambio de medio de cultivo cada tres días hasta el momento de la infección.

Infección de cultivos celulares

Cuando las células HEp-2 alcanzaron una confluencia del 90-95% en pocillos individuales de placas de 24 pocillos, fueron infectadas con VSR-A/ON1 o VSR-A/NA1 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1, previa aspiración del medio de cultivo y lavado con solución amortiguadora de fosfatos. Posterior a la inoculación del virus, las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante dos horas con agitación intermitente (cada 15 minutos). Transcurrido este tiempo, se añadió 1 mL de medio de cultivo (DMEM; Corning cat. 50-003-PB) suplementado con suero bovino fetal al 1% y penicilina – estreptomicina 100 U-100 µg/mL. Como control se tuvo un tercer pocillo con células HEp-2 no infectadas.

Cada condición experimental: células HEp-2 infectadas con el VSR-A/ON1 y células HEp-2 infectadas con el VSR-A/NA1, así como el control, se estudió por cuadruplicado, es decir que, se cultivaron cuatro pocillos por condición. Por cada réplica se utilizaron ocho placas de 24 pocillos, destinando una placa por cada tiempo experimental: 2, 12, 24, 36, 48, 60, 72 y 84 horas post-infección (hpi). Las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ hasta el momento de la cosecha. El experimento completo consistió en tres réplicas.

Cosecha

En cada tiempo post-infección (2, 12, 24, 36, 48, 60, 72 y 84 horas), se aspiró el medio de cultivo de cada uno de los pocillos de la placa correspondiente y se conservó a temperatura ambiente en tubos de microcentrífuga previamente etiquetados. Enseguida las monocapas fueron incubadas con 250 μ L de enzima TrypLE™ Express 1X (Gibco™cat. 12604021) a 37 °C durante 5-7 minutos en la incubadora. Una vez disgregadas las monocapas, a cada pocillo se adicionó el medio de cultivo que previamente le había sido extraído, para diluir la enzima recombinante e inactivarla. Finalmente las suspensiones celulares se recuperaron en tubos de microcentrífuga y se almacenaron a -80 °C hasta el momento de realizar la extracción de ARN.

Extracción del ARN total y síntesis de cADN

Una vez descongeladas las suspensiones celulares, estas fueron centrifugadas a 16,000 RPM a 4° C durante 10 minutos. A 500 μ L de sobrenadante se le agregó 1 mL de TRIzol (Invitrogen) y el proceso de extracción del ARN se realizó de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante del producto (11). La cuantificación y pureza del ARN obtenido se determinó por espectrofotometría mediante el lector de microplaca BioTek Cytation™ 3.

La síntesis de cADN para la posterior amplificación por qPCR de miR-30b-5p, miR-26b-5p, miR-24-3p y let-7i-5p se realizó con el TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems), para lo cual se siguió el protocolo del proveedor y se obtuvo un volumen final de 50 μ L de cADN.

El cADN para la amplificación de U6 como gen constitutivo de este estudio, se sintetizó utilizando el TaqMan®MicroRNA Assays (Applied Biosystems), también atendiendo a las recomendaciones del fabricante, para un volumen final de 15 μ L de cDNA.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

La amplificación por qPCR de miR-30b-5p, miR-26b-5p, miR-24-3p y let-7i-5p se realizó empleando el TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) y sondas TaqMan específicas para cada miRNA (TaqMan Advanced miRNA Assay, Applied Biosystems). La

qPCR de U6 para cada una de las muestras se realizó con la sonda incluida en el Kit previamente utilizado para la RT: TaqMan®MicroRNA Assay: U6 snRNA (Applied Biosystems) y con el mismo Master Mix empleado para la qPCR de los microRNAs (TaqMan Fast Advanced Master Mix).

Todas las reacciones de qPCR fueron realizadas en el equipo CFX96 Touch™ Real- Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories), con 100 ng de cADN, por duplicado y en cada uno de los tiempos post-infección (hpi).

Determinación de la expresión de microRNAs por qPCR

Los resultados de expresión de miR-30b-5p, miR-26b-5p, miR-24-3p y let-7i-5p fueron normalizados utilizando la expresión endógena de U6. La expresión relativa se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ considerando a la condición sin infección como calibrador.

Inmunofluorescencia

Dos de los cuatro pocillos cultivados por cada condición experimental fueron destinados a la identificación de la expresión de la proteína G del VSR por inmunofluorescencia. Una vez las suspensiones celulares se recuperaron en tubos de microcentrífuga tal como se describió previamente en el apartado “cosecha”, fueron inmediatamente centrifugadas a 3,500 RPM durante 10 minutos para obtener el pellet celular. Enseguida, las células se fijaron añadiendo 500 µl de paraformaldehído frío al 4% durante 20 minutos, se lavaron 3 veces con PBS durante 10 minutos y se almacenaron en refrigeración diluídas en PBS. Posteriormente, después de atemperar los tubos de microcentrífuga y homogeneizar la suspensión celular por pipeteo, 30 µl fueron empleados para generar tres monocapas (10 µl por cada una) en una laminilla electrocargada. Una segunda fijación fue realizada con acetona fría durante 15 minutos, seguida de 2 lavados con agua destilada y uno con PBS durante 5 minutos. A continuación las células se incubaron durante 2 horas en una solución de bloqueo (1 x PBS más suero de caballo al 10% y Triton X-100 al 0,25%) y después fueron lavadas con PBS 2 veces durante 5 minutos. Las células fueron marcadas con Anti VSR G monoclonal de ratón (RSV133; ab94966, Abcam, Cambridge, MA, EE. UU) durante la noche a 4 °C y luego se

marcaron con un anticuerpo secundario anti-ratón de cabra (H+L) conjugado con Alexa Fluor 488 (A11001, Thermo Scientific, Rockford, IL, EE. UU) por dos horas mas a temperatura ambiente, ambos anticuerpos en una dilución de 1:100. Posterior al marcaje secundario y hasta finalizar la técnica, las laminillas fueron protegidas de la luz. Finalmente, las laminillas se incubaron en solución Hoechst 33258 (bis-benzamida) (2 mg/ml) durante 20 minutos y, después de lavarlas, se montaron con Vectashield (2,5%) y se cubrieron con cubreobjetos. Las laminillas se analizaron utilizando una microscopía de fluorescencia Lionheart LX (BioTek) (Ex 499 nm/Em 520 nm para Anti VSR G GFP y Ex 352 nm/Em 461 nm para Hoechst). La intensidad media de fluorescencia (IMF) se cuantificó en microfotografías representativas de cada condición utilizando el software Image J.

Selección de microRNAs del estudio

Mediante el software de libre acceso miRTargetLink versión 2.0. se identificaron los genes blanco de cada microRNA y los blancos comunes entre ellos. Fue así como pudimos establecer que miR-26b-5p y let-7i-5p tienen como blanco común al receptor tipo Toll 4 (TLR4); pero además que miR-30b-5p puede actuar sobre el supresor de la señalización de citocina 3 (SOCS3). Adicionalmente encontramos que miR-24-3p y miR-26b-5p regulan la expresión del interferón gamma (IFN γ) y que el receptor 2 del IFN γ (IFNGR2) es también uno de los genes blanco de miR-26b-5p (**Fig. 1**).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 9 (GraphPad, San Diego, CA). La distribución de los datos de expresión relativa de cada uno de los microRNAs se evaluó utilizando una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Los datos se expresan como media $\pm$ DE o mediana $\pm$ RIQ para datos paramétricos y no paramétricos respectivamente. Las comparaciones entre grupos de datos se realizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis y una prueba *post-hoc* de Dunn no paramétrica. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de $p < 0.05$.

Resultados

La expresión relativa de cada microRNA en respuesta a la infección por el VSR subtipo A, con y sin la duplicación en el gen G en células HEp-2 (ON1 y NA1, respectivamente), se determinó mediante RT-PCR tiempo real en cada uno de los tiempos posteriores a la infección evaluados (2, 12, 24, 36, 48, 60, 72 y 84 horas), utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizando los datos con U6 y considerando la condición sin infección como calibrador.

Análisis de la expresión relativa de microRNAs en células HEp-2 infectadas por el VSR subtipo A sin la duplicación en el gen G (NA1)

Al evaluar la expresión relativa de los microRNAs en células HEp-2 infectadas por el VSR-A NA1, se encontró una regulación negativa de miR-30b-5p, miR-24-3p y let7i-5p a las 2 h.p.i. en comparación con el grupo control (**Fig. 2A, 2C y 2D**). En los siguientes tiempos, comprendidos entre 12 y 48 h.p.i., no se observaron diferencias en la expresión de los microRNAs entre los cultivos con VSR NA1 y los cultivos control (**Fig. 2A, 2B, 2C y 2D**), con excepción de miR-26b-5p, el cual se encontró significativamente menos expresado en las células infectadas por NA1 que en el grupo control a las 36 h.p.i. (**Fig. 2B**).

En contraste, a las 60 h.p.i. se registró un incremento en la expresión de miR-30b-5p, miR-26b-5p, miR-24-3p y let7i-5p, los cuales se expresaron 2.86 ($p=0.0015$), 2.79 (0.0002), 1.90 ($p=0.0039$) y 2.09 ($p=0.0080$) veces más en comparación con el grupo control, respectivamente (**Fig. 2A, 2B, 2C y 2D**).

A partir de las 72 h.p.i. no se registraron cambios significativos en la expresión de los microRNAs en el grupo de células infectadas por NA1, respecto a la condición sin infección (**Fig. 2A, 2B, 2C y 2D**).

Análisis de la expresión relativa de microRNAs en células HEp-2 infectadas por el VSR subtipo A con la duplicación en el gen G (ON1)

Durante las primeras 48 horas posteriores a la infección, no se registró ninguna diferencia en la expresión de los microRNAs incluidos en el estudio entre las células infectadas por el VSR ON1 y las células control, salvo en el caso de miR-26b-5p, para el cual se registró una menor

expresión a las 36 h.p.i. (**Fig. 3A, 3B, 3C y 3D**). Posterior a esto, se registró un incremento en la expresión de los microRNAs. En el caso de let-7i-5p el comportamiento fue similar a NA1, con una expresión 2.05 ($p=0.0170$) veces significativamente mayor en comparación con el grupo control a las 60 horas (**Fig. 3D**). En contraste, para miR-26b-5p y miR-24-3p la sobreexpresión en comparación con el grupo control se registró a las 72 h.p.i., con una expresión 1.68 ($p=0.0158$) y 1.62 ($p=0.0218$) veces mayor con respecto al grupo control, respectivamente (**Fig. 3B y 3C**). El único microRNA no sobreexpresado en las células infectadas por ON1 fue miR-30b-5p, su expresión relativa se mantuvo cercana a la del grupo control en todos los tiempos postinfección evaluados (**Fig. 3A**).

A las 84 h.p.i. no se encontraron cambios significativos en la expresión de los microRNAs entre las células infectadas por el VSR ON1 y el grupo control (**Fig. 3A, 3B, 3C y 3D**).

En el grupo control, la expresión relativa de los microRNAs no mostró diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo, como era esperado.

Expresión diferencial de microRNAs en respuesta a la infección por el virus sincitial respiratorio (VSR) subtipo A con y sin la duplicación en el gen G, en células HEp-2.

Finalmente, comparamos los resultados de expresión relativa de miR-30b-5p, miR-26b-5p, miR-24-3p y let-7i-5p en células HEp-2 infectadas por el VSR subtipo A que tiene la duplicación en el gen G (ON1) y células infectadas por el VSR subtipo A que no tiene la duplicación (NA1).

Nuestros datos mostraron que a las 2 h.p.i. la expresión de miR-30b-5p, miR-26b-5p, miR-24-3p y let-7i-5p en células infectadas por ON1 fue 1.66 ($p=0.0005$), 1.75 ($p=0.0017$), 1.71 ($p=0.0001$) y 1.42 ($p=0.0182$) veces mayor que en las células infectadas por NA1, respectivamente (**Fig. 4A, 4B, 4C y 4D**). En el caso de miR-24-3p, también se observó una expresión significativamente mayor en células infectadas por ON1, en comparación con el grupo de células infectadas por NA1 a las 84 h.p.i. (**Fig. 4C**).

En todos los demás tiempos postinfección evaluados en este estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión relativa de los microRNAs entre ambos grupos (**Fig. 4A, 4B, 4C y 4D**).

Aunque la única diferencia estadísticamente significativa en la expresión de los microRNAs entre NA1 y ON1 se registró a las 2 h.p.i., las cinéticas de expresión de los microRNAs en los cultivos infectados por NA1 y los cultivos infectados por ON1, mostraron algunas diferencias en relación al máximo de expresión y la temporalidad del incremento en la expresión relativa (**Fig. 5**). En la infección por NA1, todos los microRNAs incrementaron su expresión y este incremento ocurrió más temprano (60 h.p.i.) que en ON1, en donde el máximo de expresión de miR-26b-5p y miR-24-3p se registró a las 72 horas y fue menor en comparación con el máximo de expresión alcanzado en NA1 (**Fig. 5A, 5B, 5C y 5D**). En el caso de miR-30b-5p no se encontró un incremento significativo en su expresión en la infección por ON1 a lo largo del tiempo, en contraste con la sobreexpresión registrada para este microRNA en NA1 a las 60 horas (**Fig. 5A**). En el caso de let-7i-5p su cinética de expresión no reveló diferencias entre NA1 y ON1 (**Fig. 5D**).

Discusión

En este estudio analizamos la expresión de cuatro microRNAs en respuesta a la infección causada por el VSR subtipo A con y sin la duplicación en el gen G en un modelo *in vitro* de células HEp-2 en ocho tiempos postinfección entre las 2 y las 84 horas.

La decisión de evaluar la expresión relativa de miR-30b-5p, miR-26b-5p, miR-24-3p y let-7i-5p, estuvo fundamentada en dos aspectos. El primero de ellos son las características inmunomoduladoras ya descritas de algunas proteínas virales como la proteína G del VSR, al parecer para facilitar la infección y la replicación (11). El segundo es la capacidad que tienen estos cuatro microRNAs de regular la expresión de diferentes genes implicados en vías de señalización que convergen en la activación de factores regulados por interferón (IRFs) y de NF- κ B y que conducen a la transcripción de citoquinas proinflamatorias y de los IFNs (**Fig.1**), los cuales tras su producción y secreción dan lugar a la expresión de numerosos genes estimulados por interferón (ISGs) y otros efectores que interfieren en la apoptosis celular y la replicación viral (12).

Los microRNAs son pequeños ARN no codificantes de aproximadamente 18~25 nucleótidos de longitud que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional (13). Numerosos estudios han demostrado la participación de los microRNAs en diversos procesos biológicos incluidos la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, la reparación y remodelación de tejidos y las respuestas inmunes innatas (5,14). Además, un número creciente de investigaciones se han enfocado en el potencial de los microRNAs como biomarcadores de diagnóstico o pronóstico para diversos tipos de enfermedades humanas, como las enfermedades neurodegenerativas, neoplásicas e inmunitarias (15,16). Más recientemente, también se ha demostrado la importancia de los microRNAs como orquestadores de la respuesta inmunológica durante enfermedades infecciosas (17).

Estudios previos, principalmente investigaciones en modelos *in vitro*, han demostrado que la infección causada por el VSR puede alterar la expresión de microRNAs como parte de los mecanismos moleculares para modular la respuestas inmunitarias; incluso algunos estudios

han destacado la importancia de la proteína G del VSR en la inducción de ciertos microRNAs (5,9,18,19).

Thornburg y colaboradores identificaron que la expresión de miR-30b y let-7i aumentó significativamente en células epiteliales bronquiales humanas normales 48 horas después de haber sido infectadas por el VSR (10). Estos resultados son congruentes con lo encontrado por Zhuang et al. en un estudio en el que analizaron la expresión de miR-30b y let-7i en un modelo de ratones neonatales infectados intranasalmente por el VSR con o sin bivalirudina (20). Así mismo, Bakre et al., al evaluar la expresión de diferentes microRNAs en células A549 infectadas por el VSR a una MOI de 1, encontraron una regulación positiva de la expresión de miR-24 y miR-26b a las 24 horas después de la infección (21). En otro estudio realizado por el mismo grupo de investigación se analizó el papel de la región central conservada (CCR) de la proteína G del VSR en la regulación de algunos microRNAs, midiendo su expresión en células Calu-3 infectadas por RSV/A2 de tipo silvestre o virus recombinantes que contenían mutaciones de las cisteínas en la CCR de la proteína G (virus rA2-GC4). Sus resultados arrojaron que la expresión de miR-24 se redujo notablemente en las células infectadas con virus rA2-GC4 a las 24 h.p.i., lo que demostró la importancia del motivo CX3C de la proteína G en la inducción de miR-24 (18). Liu y colaboradores también demostraron la relevancia de la proteína G del VSR en la inducción de miR-26b en uno de sus trabajos en el que analizaron los niveles de expresión del ARNm de miR-26b y TLR4 en células mononucleares de sangre periférica de niños con o sin bronquiolitis por VSR. Sus resultados mostraron que los niños con infección por VSR tenían un nivel más alto de miR-26b y un nivel más bajo del ARNm de TLR4 en las células mononucleares (22).

En concordancia con estos resultados, uno de los hallazgos más importantes del presente estudio, fue la sobreexpresión de miR-30b-5p, miR-26b-5p, miR-24-3p y let-7i-5p en células HEp-2 infectadas por el VSR-A NA1 a las 60 h.p.i. y la expresión significativamente mayor de let-7i-5p a las 60 h.p.i. y de miR-26b-5p y miR-24-3p a las 72 h.p.i. en respuesta a la infección por ON1.

El rol de los microRNAs en la regulación postranscripcional de algunos de los genes de respuesta inmunitaria frente a la infección causada por el VSR aún no está del todo claro. Lo que si se conoce es que algunos de los microRNAs inducidos en respuesta a la infección por el VSR se relacionan con las vías de señalización que involucran proteínas o factores de transcripción claves en la respuesta inmune innata como IRFs, NF- κ B y los IFNs de tipo I y II (10). Por otro lado algunos estudios realizados en modelos animales y modelos *in vitro* han encontrado una regulación positiva de la expresión de los IFNs tipo I e ISGs tras la infección por VSR mutantes que carecen del gen G, lo que ha demostrado el posible rol de la proteína G del VSR en la inhibición de algunos factores de transcripción celulares implicados en su señalización (23,24). Así mismo, en el contexto de la inmunidad celular innata contra la infección causada por el VSR, también es bien sabido que aunque los TLRs, RLRs y los receptores tipo NOD (NLR) participan en la detección del VSR (25), el TLR4 es el principal receptor extracelular que reconoce la proteína F o de fusión del VSR (26–28).

El mecanismo mediante el cual la proteína G del VSR modula la expresión de los IFNs tipo I e ISGs mediada por el TLR4 sigue sin determinarse (24). Sin embargo, los resultados de este estudio preliminar, podrían ayudar a establecer una relación entre los mecanismos de evolución viral con los mecanismos de modulación del sistema inmune. Es probable que una de las estrategias que el VSR haya desarrollado para evadir las respuestas inmunitarias innatas antivirales del huésped sea el antagonismo de los efectos de la interacción de la proteína F con el TLR4 a través de la sobreexpresión de microRNAs como miR-26b-5p y let-7i-5p, quienes tienen como blanco común a este receptor. Esto representa una ventana de oportunidad para la replicación eficiente del virus y el establecimiento de la infección, ya que es de esperarse que la inhibición de la expresión del TLR4 resulte en una supresión de la activación de NF- κ B e IRFs y una disminución de la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF α e IL-6 , así como de los IFNs tipo I y numerosos ISGs (27).

Particularmente la regulación negativa de la vía de señalización de NF- κ B y la inhibición de la producción de IFN tipo I ya ha sido demostrada en un estudio sobre el perfil de expresión de microRNAs en niños con bronquiolitis asociada al VSR. La inhibición de la inducción del IFN- β mediada por los TLRs 3 y 4 por parte de la proteína G del VSR también ha sido

revelada en una investigación realizada en células dendríticas derivadas de monocitos (mDC) tratadas con VSR (24,29).

De acuerdo con los trabajos revisados y con los resultados de este trabajo, pudiera ser que el incremento significativo de la expresión relativa de miR-26b-5p y miR-24-3p entre las 60 y las 72 h.p.i. en la infección causada por el VSR con y sin la duplicación en el gen G, sea también uno de los mecanismos de evasión inmunitaria del VSR. El hecho de que miR-26b-5p y miR-24-3p se sobreexpresen en respuesta a la infección por el VSR e interfieran con la inducción y señalización del IFN- γ o de tipo II al modular la expresión de los genes IFNG e IFNGR1, podría explicar en parte la predominancia de la respuesta inmune tipo Th2 en la infección respiratoria asociada al VSR (30,31). La pérdida del balance entre las repuestas tipo Th1/Th2 en la infección por el VSR es un fenómeno que ya ha sido ampliamente caracterizado en estudios realizados en humanos y modelos animales y se ha asociado de manera muy importante con manifestaciones clínicas más graves (32,33).

Las diferencias observadas entre nuestro trabajo y lo publicado en otros estudios en los que se determinó la expresión diferencial de microRNAs en la infección por VSR, pudieran atribuirse principalmente a diferencias en el tipo de modelo celular empleado, el genotipo/cepa viral que se haya utilizado y la MOI que se usó durante la infección, destacando que en este trabajo se utilizó una MOI de 0.1, la cual es menor en comparación a la utilizada en otros estudios. También, la técnica empleada para la cuantificación y análisis de la expresión de los microRNAs y los tiempos postinfección evaluados, destacando que en pocos trabajos se ha realizado una cinética completa de la expresión de microRNAs.

En el presente estudio, suponemos que el hecho de que todos los microRNAs se hayan sobreexpresado en respuesta a la infección por NA1 u ON1 entre las 60 y las 72 h.p.i. podría explicarse por diferentes factores. El primero de ellos es la carga viral alcanzada entre los dos y tres días posteriores a la infección por VSR. Rajan y colaboradores, en un estudio publicado recientemente, infectaron células HEp-2 y A549 con cuatro genotipos diferentes del VSR (incluidos GA1 y ON1) a una MOI de 0.01 y a partir de la cuantificación del ARN viral a las 24, 48, 72 y 96 h.p.i. reportaron una cinética de replicación del virus. Sus resultados

revelaron un importante incremento en el número de copias virales/mL a partir de las 48 y hasta las 72 h.p.i. En el último tiempo evaluado, observaron una estabilización o una ligera disminución en el número de copias virales, el cual varió en función del genotipo (34). Aún asumiendo la diferencia de MOI utilizada en este estudio y la MOI a la cual nosotros infectamos nuestros cultivos, inferimos que es posible que el incremento en la expresión de los microRNAs evaluados esté temporalmente relacionada al máximo de copias virales.

El segundo factor a considerar es que a partir de las 48 y hasta las 72 horas después de la infección (h.p.i.), la expresión relativa de ARNm de los genes de algunas proteínas del VSR como la proteína G o F se estabiliza, tal como lo demostraron Piedra y colaboradores en un modelo *in vitro* de células HEp-2 infectadas por cuatro genotipos distintos del VSR (GA1, ON, GB1, BA). Sus resultados mostraron que en tiempos más tempranos la expresión de estos mensajeros es menor y más variable (35). Estos dos primeros factores son de especial interés si tomamos en cuenta que la regulación de la expresión de microRNAs como let-7i y miR-30b por parte del VSR es dependiente no solo de la dosis sino también del tiempo post-infección y la replicación viral (10).

En este punto también vale la pena mencionar que la inmunidad innata como primera línea de defensa del huésped frente a la infección por VSR inicia durante los primeros minutos de la invasión del patógeno y dura hasta tres días o lo que es lo mismo, hasta las 72 horas posteriores a la infección (36). Quizá la regulación de la expresión génica a cargo de miR-30b-5p, miR-26b-5p, miR-24-3p y let-7i-5p sea de especial relevancia el tiempo que dura la respuesta inmune innata y al inicio de la respuesta inmune adaptativa. Debido a su capacidad de modular la expresión de proteínas como el TLR4 o el IFN- γ , las cuales son fundamentales en vías de señalización clásicas de la respuesta inmune innata antiviral.

De los resultados de este trabajo, también es de interés que el efecto citopático viral en los cultivos infectados por los genotipos NA1 y ON1 del VSR-A, se haya observado entre las 48 y 60 h.p.i., tal como ha sido reportado en estudios previos (37). Es posible que los cambios morfológicos exhibidos en las células infectadas a partir de las 48 h.p.i. conlleven a la muerte celular en tiempos posteriores y esto contribuye en parte con la disminución de la expresión

de los microRNAs registrada en las células infectadas por NA1 y ON1 posterior a las 72 h.p.i.

Hasta donde sabemos, a la fecha no hay ningún estudio previo que también se haya propuesto comparar la expresión de miR-30b-5p, miR-26b-5p, miR-24-3p y let-7i-5p en la infección causada por los genotipos NA1 y ON1 del VSR-A. En nuestra hipótesis, la expresión de los microRNAs en respuesta a la infección por el VSR-A con la duplicación en el gen G sería diferente a su expresión en respuesta a la infección por el VSR-A sin la duplicación. Encontramos que a las 2 h.p.i. la expresión de todos los microRNAs evaluados fue significativamente menor en las células infectadas por NA1. En todos los demás tiempos postinfección evaluados en este estudio, no se encontraron diferencias significativas en la expresión relativa de los microRNAs entre ambos grupos. La menor expresión de microRNAs a las 2 h.p.i. tras la infección con VSR NA1 es un reflejo de la reducción en la expresión de microRNAs en este caso, lo que no sucedió durante la infección por VSR ON1.

Consideramos que la no supresión de la expresión de miR-30b-5p, miR-26b-5p, miR-24-3p y let-7i-5p en células infectadas por ON1 a las 2 h.p.i., así como la expresión significativamente mayor de los microRNAs en la infección por ON1 respecto a NA1 a las 2 h.p.i., podrían resultar en una evasión más eficiente de la respuesta inmune mediada por los IFNs tipo I y II en las primeras horas de la infección respiratoria asociada al VSR-A ON1. Estas interpretaciones se apoyan en estudios previamente publicados que han concluido que los cambios en la estructura de la proteína G del VSR podrían alterar la inmunogenicidad y la patogenicidad del virus (3,38–40).

De interés, aunque no se registraron diferencias significativas en la expresión de microRNAs en tiempos subsecuentes, hubo algunas diferencias en las cinéticas de expresión en los cultivos infectados por NA1 y ON1. Aunque en ambos casos se registró sobreexpresión de los microRNAs estudiados alrededor del tercer día de la infección, fue evidente que el máximo de expresión varió en función del genotipo: en la infección por NA1 se registró el máximo de expresión a las 60 h.p.i., mientras que en el caso de la infección por ON1 ésta tendió a verse más tardíamente, registrándose la sobreexpresión de miR-26b-5p y miR-24-

3p a las 72 h.p.i. Asimismo, las cinéticas mostraron que el máximo de expresión de los microRNAs en la infección por NA1 fue mayor que el máximo de expresión alcanzado por los microRNAs en la infección por ON1. Finalmente también se observó que el incremento de la expresión de miR-30b-5p estuvo atenuado en las células infectadas por ON1, en donde no se registró sobreexpresión de este microRNA en ninguno de los puntos temporales evaluados.

Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo, han comparado las cinéticas de replicación viral en la infección por el VSR-A NA1 y el VSR-A ON1 y sus resultados mostraron un incremento en la carga viral a partir de las 48 horas en la infección por ON1, en contraste con un incremento un poco más tardío en la infección por NA1 (60 horas). Asimismo, la carga viral registrada en los cultivos infectados por ON1 fue mayor en comparación con la registrada en NA1.

Estas observaciones y los resultados de nuestro trabajo sugieren que, en la infección por ON1, un mayor incremento en el número de copias virales y más temprano, pareciera retrasar temporalmente y disminuir el máximo de expresión de miR-26b-5p y miR-24-3p y atenuar la expresión de miR-30b-5p; contrario a lo que sucede en la infección por NA1, en donde una menor replicación viral y registrada mas tardíamente, pareciera inducir mayores niveles de expresión de los microRNAs y en menor tiempo. En este contexto, es probable que el incremento temprano y mayor de la replicación viral observada en ON1 y la menor y más tardía evasión de la respuesta inmune antiviral a través de la modulación de la expresión de microRNAs que regulan las vías de señalización de los interferones tipo I y II, sean mecanismos favorables para el genotipo ON1. Considerando que, un mayor número de copias virales cuando apenas está iniciando el efecto citopático celular (48 h) y una respuesta inmune antiviral poco ineficiente cuando muchas células estarán en proceso de apoptosis (después las 72 h), representará una ventaja para el VSR-A-ON1 en términos de replicación y supervivencia. Estas interpretaciones sugieren que la respuesta celular frente a la infección por VSR ON1 puede mostrar cambios, si bien sutiles, guiados por la presencia de la duplicación parcial de la proteína G viral.

A pesar de estar circulando desde hace más de una década (3), aún falta mucho por conocer acerca del genotipo ON1 del VSR y su inmunopatogenia sigue sin esclarecerse. Actualmente, sabemos que es el genotipo predominante dentro del grupo A del VSR y que su rápida propagación y dominancia, pareciera estar relacionada con la duplicación de 72 nucleótidos en la región hipervariable del extremo C-terminal del gen que codifica la proteína G (2,41). Las dos regiones hipervariables del gen G son altamente glicosiladas debido a sus múltiples residuos de serinas y treoninas, el hecho de que la duplicación parcial del gen G característica de ON1 se haya establecido en una de estas regiones, representó para este genotipo nuevos potenciales sitios de glicosilación (3,42,43). Esto es de especial importancia debido a que la O y la N glicosilación han sido destacadas en algunos estudios como modificaciones postraduccionales esenciales para el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de la proteína G, que además dan como resultado cambios en su perfil antigénico, lo que dificulta su reconocimiento por parte de los anticuerpos y favorece la evasión del sistema inmune por parte del VSR (44,45).

Sumados a hallazgos reportados anteriormente, los resultados de nuestro trabajo nos sugieren que las diferencias de expresión de los microRNAs evaluados, entre los genotipos NA1 y ON1 podrían estar asociadas a la duplicación parcial del gen G, las sustituciones de aminoácidos y los nuevos sitios de O y N glicosilación característicos de ON1 (3), lo que podría conferirle a este nuevo genotipo una ventaja de tipo inmunológico respecto a su genotipo ancestro (NA1). Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar todos los posibles efectos de la duplicación parcial del gen G del VSR en la modulación de la respuesta inmune del huésped, así como sus mecanismos.

Los resultados aquí obtenidos, contribuyen con evidencias de los posibles mecanismos moleculares de evasión inmunitaria del VSR-A, lo que es de gran interés en la búsqueda de nuevos biomarcadores diagnósticos y pronósticos en la infección respiratoria asociada al VSR, así como de potenciales objetivos terapéuticos.

Conclusiones

Las células HEp-2 son permisivas a la infección por VSR-A y constituyen un modelo *in vitro* que permite evaluar la expresión de microRNAs durante los primeros días postinfección.

La infección por el VSR-A con y sin la duplicación en el gen G (ON1 y NA1, respectivamente), regula positivamente la expresión de microRNAs con objetivos moleculares implicados en la respuesta inmune celular mediada por los IFNs tipo I y II, lo que podría ser una de las estrategias que el VSR-A ha desarrollado para evadir las respuestas inmunitarias antivirales del huésped, evidenciado en este trabajo de acuerdo con los perfiles de expresión diferencial de los microRNA.

Referencias

1. Li Y, Wang X, Blau DM, Caballero MT, Feikin DR, Gill CJ, et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. mayo de 2022;399(10340):2047-64.
2. Cantú-Flores K, Rivera-Alfaro G, Muñoz-Escalante JC, Noyola DE. Global distribution of respiratory syncytial virus A and B infections: a systematic review. *Pathogens and Global Health*. 2022;116(7):398.
3. Eshaghi A, Duvvuri VR, Lai R, Nadarajah JT, Li A, Patel SN, et al. Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in Ontario: a novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. *PLoS One*. 2012;7(3):e32807.
4. Bardsley M, Morbey RA, Hughes HE, Beck CR, Watson CH, Zhao H, et al. Epidemiology of respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in England during the COVID-19 pandemic, measured by laboratory, clinical, and syndromic surveillance: a retrospective observational study. *The Lancet Infectious Diseases*. enero de 2023;23(1):56-66.
5. Hu M, Bogoyevitch MA, Jans DA. Impact of Respiratory Syncytial Virus Infection on Host Functions: Implications for Antiviral Strategies. *Physiol Rev*. 1 de octubre de 2020;100(4):1527-94.
6. Tabor DE, Fernandes F, Langedijk AC, Wilkins D, Lebbink RJ, Tovchigrechko A, et al. Global Molecular Epidemiology of Respiratory Syncytial Virus from the 2017-2018 INFORM-RSV Study. *J Clin Microbiol*. 17 de diciembre de 2020;59(1):e01828-20.
7. Wu W, Choi EJ, Lee I, Lee YS, Bao X. Non-Coding RNAs and Their Role in Respiratory Syncytial Virus (RSV) and Human Metapneumovirus (hMPV) Infections. *Viruses*. 21 de marzo de 2020;12(3):345.
8. Liu Z, Fan P, Chen M, Xu Y, Zhao D. miRNAs and Leukotrienes in Respiratory Syncytial Virus Infection. *Front Pediatr*. 2021 Apr 29;9:602195.
9. Huang Z, Liu X, Wu X, Chen M, Yu W. MiR-146a alleviates lung injury caused by RSV infection in young rats by targeting TRAF-6 and regulating JNK/ERKMAPK signaling pathways. *Sci Rep*. 2022 Mar 3;12(1):3481.
10. Thornburg NJ, Hayward SL, Crowe JE. Respiratory syncytial virus regulates human microRNAs by using mechanisms involving beta interferon and NF- κ B. *mBio*. 18 de diciembre de 2012;3(6):e00220-12.
11. Peebles RS Jr, Graham BS. Pathogenesis of respiratory syncytial virus infection in the murine model. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(2):110-5.
12. Duan T, Du Y, Xing C, Wang HY, Wang RF. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Front Immunol*. 2022 Mar 3;13:812774.
13. Yao Q, Chen Y, Zhou X. The roles of microRNAs in epigenetic regulation. *Curr Opin Chem Biol*. agosto de 2019;51:11-7.
14. Liang Y, Fang D, Gao X, Deng X, Chen N, Wu J, et al. Circulating microRNAs as emerging regulators of COVID-19. *Theranostics*. 1 de enero de 2023;13(1):125-47.
15. Correia CN, Nalpas NC, McLoughlin KE, Browne JA, Gordon SV, MacHugh DE, Shaughnessy RG. Circulating microRNAs as Potential Biomarkers of Infectious Disease. *Front Immunol*. 2017 Feb 16;8:118.

16. Bellingham SA, Hill AF. Analysis of miRNA Signatures in Neurodegenerative Prion Disease. *Methods Mol Biol.* 2017;1658:67-80.
17. Lu X, Yang J, Wu H, Yang Z, Jin C, Wang J, et al. High-throughput sequencing identifies HIV-1-replication- and latency-related miRNAs in CD4⁺ T cell lines. *Arch Virol.* julio de 2017;162(7):1933-42.
18. Bakre AA, Harcourt JL, Haynes LM, Anderson LJ, Tripp RA. The Central Conserved Region (CCR) of Respiratory Syncytial Virus (RSV) G Protein Modulates Host miRNA Expression and Alters the Cellular Response to Infection. *Vaccines.* septiembre de 2017;5(3):16.
19. Liu Z, Fan P, Chen M, Xu Y, Zhao D. miRNAs and Leukotrienes in Respiratory Syncytial Virus Infection. *Front Pediatr.* 2021 Apr 29;9:602195.
20. Zhuang S, Tang Q, Chen P, Wang C, Liu G. Bivalirudin exerts antiviral activity against respiratory syncytial virus-induced lung infections in neonatal mice. *Acta Pharmaceutica.* 31 de agosto de 2022;72(3):415-25.
21. Bakre A, Mitchell P, Coleman JK, Jones LP, Saavedra G, Teng M, et al. Respiratory syncytial virus modifies microRNAs regulating host genes that affect virus replication. *J Gen Virol.* noviembre de 2012;93(Pt 11):2346-56.
22. Liu S, Gao L, Wang X, Xing Y. Respiratory syncytial virus infection inhibits TLR4 signaling via up-regulation of miR-26b. *Cell Biol Int.* diciembre de 2015;39(12):1376-83.
23. Moore EC, Barber J, Tripp RA. Respiratory syncytial virus (RSV) attachment and nonstructural proteins modify the type I interferon response associated with suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins and IFN-stimulated gene-15 (ISG15). *Virol J.* 13 de octubre de 2008;5:116.
24. Shingai M, Azuma M, Ebihara T, Sasai M, Funami K, Ayata M, et al. Soluble G protein of respiratory syncytial virus inhibits Toll-like receptor 3/4-mediated IFN-beta induction. *Int Immunol.* septiembre de 2008;20(9):1169-80.
25. Ouyang Y, Liao H, Hu Y, Luo K, Hu S, Zhu H. Innate Immune Evasion by Human Respiratory Syncytial Virus. *Front Microbiol.* 2022 Mar 4;13:865592.
26. Haynes LM, Moore DD, Kurt-Jones EA, Finberg RW, Anderson LJ, Tripp RA. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol.* noviembre de 2001;75(22):10730-7.
27. Olejnik J, Forero A, Deflubé LR, Hume AJ, Manhart WA, Nishida A, et al. Ebolaviruses Associated with Differential Pathogenicity Induce Distinct Host Responses in Human Macrophages. *J Virol.* 1 de junio de 2017;91(11):e00179-17.
28. Haeberle HA, Takizawa R, Casola A, Brasier AR, Dieterich HJ, Van Rooijen N, et al. Respiratory syncytial virus-induced activation of nuclear factor-kappaB in the lung involves alveolar macrophages and toll-like receptor 4-dependent pathways. *J Infect Dis.* 1 de noviembre de 2002;186(9):1199-206.
29. Hasegawa K, Pérez-Losada M, Hoptay CE, Epstein S, Mansbach JM, Teach SJ, et al. RSV vs. rhinovirus bronchiolitis: difference in nasal airway microRNA profiles and NFκB signaling. *Pediatr Res.* marzo de 2018;83(3):606-14.
30. Bermejo-Martin JF, Garcia-Arevalo MC, De Lejarazu RO, Ardura J, Eiros JM, Alonso A, et al. Predominance of Th2 cytokines, CXC chemokines and innate immunity mediators at the mucosal level during severe respiratory syncytial virus infection in children. *Eur Cytokine Netw.* septiembre de 2007;18(3):162-7.

31. Caballero MT, Serra ME, Acosta PL, Marzec J, Gibbons L, Salim M, et al. TLR4 genotype and environmental LPS mediate RSV bronchiolitis through Th2 polarization. *J Clin Invest.* febrero de 2015;125(2):571-82.
 32. Cherukuri A, Patton K, Gasser RA, Zuo F, Woo J, Esser MT, et al. Adults 65 years old and older have reduced numbers of functional memory T cells to respiratory syncytial virus fusion protein. *Clin Vaccine Immunol.* febrero de 2013;20(2):239-47.
 33. Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 de septiembre de 2003;168(6):633-9.
 34. Rajan A, Piedra FA, Aideyan L, McBride T, Robertson M, Johnson HL, et al. Multiple Respiratory Syncytial Virus (RSV) Strains Infecting HEP-2 and A549 Cells Reveal Cell Line-Dependent Differences in Resistance to RSV Infection. *J Virol.* 96(7):e01904-21.
 35. Piedra FA, Qiu X, Teng MN, Avadhanula V, Machado AA, Kim DK, et al. Non-gradient and genotype-dependent patterns of RSV gene expression. *PLoS One.* 10 de enero de 2020;15(1):e0227558.
 36. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol.* abril de 2009;21(4):317-37.
 37. Wright PF, Ikizler MR, Gonzales RA, Carroll KN, Johnson JE, Werkhaven JA. Growth of respiratory syncytial virus in primary epithelial cells from the human respiratory tract. *J Virol.* julio de 2005;79(13):8651-4.
 38. Villenave R, O'Donoghue D, Thavagnanam S, Touzelet O, Skibinski G, Heaney LG, et al. Differential cytopathogenesis of respiratory syncytial virus prototypic and clinical isolates in primary pediatric bronchial epithelial cells. *Virology Journal.* 27 de enero de 2011;8(1):43.
 39. Wertheim JO, Worobey M. Relaxed Selection and the Evolution of RNA Virus Mucin-Like Pathogenicity Factors. *Journal of Virology.* mayo de 2009;83(9):4690-4.
 40. Stokes KL, Chi MH, Sakamoto K, Newcomb DC, Currier MG, Huckabee MM, et al. Differential Pathogenesis of Respiratory Syncytial Virus Clinical Isolates in BALB/c Mice. *Journal of Virology.* 15 de junio de 2011;85(12):5782-93.
 41. Pierangeli A, Trotta D, Scagnolari C, Ferreri ML, Nicolai A, Midulla F, et al. Rapid spread of the novel respiratory syncytial virus A ON1 genotype, central Italy, 2011 to 2013. *Euro Surveill.* 3 de julio de 2014;19(26):20843.
 42. Abou-El-Hassan H, Massaad E, Soudani N, Assaf-Casals A, Shaker R, Lteif Khoury M, Ghanem S, Karam M, Andary R, Saito R, Dbaiibo G, Zaraket H. Detection of ON1 and novel genotypes of human respiratory syncytial virus and emergence of palivizumab resistance in Lebanon. *PLoS One.* 2019 Feb 21;14(2):e0212687.
 43. García-Beato R, Martínez I, Francí C, Real FX, García-Barreno B, Melero JA. Host cell effect upon glycosylation and antigenicity of human respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Virology.* 15 de julio de 1996;221(2):301-9.
 44. Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. Analysis of respiratory syncytial virus strain variation in successive epidemics in one city. *J Clin Microbiol.* enero de 1994;32(1):1-4.
 45. Melero JA, Mas V, McLellan JS. Structural, antigenic and immunogenic features of respiratory syncytial virus glycoproteins relevant for vaccine development. *Vaccine.* 11 de enero de 2017;35(3):461-8.
-

Pies de figura.

Figura 1. Los microRNAs regulan la expresión génica de proteínas clave en las vías de señalización clásicas que se activan en respuesta a la infección por VSR: Parte de la respuesta inmune innata frente al VSR inicia con el reconocimiento viral a través de los receptores tipo Toll (TLR) del huésped y los receptores tipo RIG-I (RLR). Tanto la vía de los TLR como la vía de los RLR regulan positivamente los factores reguladores (IRF) del interferón (IFN) y el factor nuclear NF- κ B en el núcleo, lo que da como resultado la producción de IFN tipo I: IFN- α/β y de citocinas/quimiocinas proinflamatorias como interleucina (IL)-1, IL-6/8 y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α . En el contexto de la inmunidad innata al VSR, la señalización del IFN tipo II o IFN γ también tiene un importante rol tras su producción por parte de las células Natural Killer (NK) y los linfocitos T CD4+ principalmente. Los microRNAs modulan la respuesta inmunológica durante la infección por VSR al regular la expresión de proteínas como el TLR4 (miR-26b-5p-let-7i-5p), el IFN γ (miR-24-3p y miR-26b-5p), el IFN γ R2 (miR-26b-5p) y SOCS1 (miR-30b-5p - let-7i-5p), tal como lo describe la figura.

Figura 2. Expresión relativa de microRNAs en células HEp-2 infectadas por VSR subtipo A sin la duplicación parcial en el gen G (NA1). La expresión relativa de miR-30b-5p (A), miR-26b-5p (B), miR-24-3p (C) y let-7i-5p (D) en células infectadas por el VSR-A NA1, se muestra comparativamente con su expresión relativa en células sin infección (grupo control), a diferentes horas posteriores a la infección (h.p.i). La infección fue realizada a una MOI de 0.1. Los datos se muestran como mediana $\pm$ RIQ de tres experimentos independientes. El gen endógeno utilizado fue U6 y la expresión relativa de los microRNAs fue analizada con el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ considerando a la condición sin infección como calibrador. Se utilizó una prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis con una prueba *post hoc* de Dunn. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.0005$, *** $p < 0.001$), **** $p < 0.0001$.

Figura 3. Expresión relativa de microRNAs en células HEp-2 infectadas por el VSR subtipo A con la duplicación parcial en el gen G (ON1). La expresión relativa de miR-30b-5p (A), miR-26b-5p (B), miR-24-3p (C) y let-7i-5p (D) en células infectadas por el VSR-A ON1, se muestra comparativamente con su expresión relativa en células sin infección

(grupo control), a diferentes horas posteriores a la infección (h.p.i). La infección fue realizada a una MOI de 0.1. Los datos se muestran como mediana $\pm$ RIQ de tres experimentos independientes. El gen endógeno utilizado fue U6 y la expresión relativa de los microRNAs fue analizada con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ considerando a la condición sin infección como calibrador. Se utilizó una prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis con una prueba *post hoc* de Dunn. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.0005$, *** $p < 0.001$), **** $p < 0.0001$.

Figura 4. Evaluación de la expresión relativa de microRNAs tras la infección por el VSR-A con y sin la duplicación en el gen G, en células HEp-2 (ON1 y NA1, respectivamente). Comparación de la expresión relativa de miR-30b-5p (A), miR-26b-5p (B), miR-24-3p (C) y let-7i-5p (D) entre las células infectadas por el VSR NA1 y las células infectadas por el VSR ON1 en cada uno de los tiempos postinfección evaluados. Ambos grupos fueron infectados a una MOI de 0.1. Los datos se muestran como mediana $\pm$ RIQ de tres experimentos independientes. El gen endógeno utilizado fue U6 y la expresión relativa de los microRNAs fue analizada con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ considerando a la condición sin infección como calibrador. Se utilizó una prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis con una prueba *post hoc* de Dunn. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.0005$, *** $p < 0.001$), **** $p < 0.0001$.

Figura 5. Los microRNAs muestran una expresión relativa con una dinámica temporal diferente entre las células infectadas por el VSR-A con y sin la duplicación en el gen G, en células HEp-2 (ON1 y NA1, respectivamente). El diagrama de líneas muestra comparativamente la cinética de expresión de miR-30b-5p (A), miR-26b-5p (B), miR-24-3p (C) y let-7i-5p (D) en los cultivos infectados por NA1 y ON1 a lo largo del tiempo. Los datos se muestran como mediana de tres experimentos independientes.

Figura 6. Expresión de la proteína G en células HEp-2 infectadas por el VSR-A con y sin la duplicación en el gen G, (ON1 y NA1, respectivamente) y células HEp-2 sin infección visualizada mediante micrografías de inmunofluorescencia. Comprobamos la presencia de la glicoproteína G del VSR como marcador de infección viral. Células HEp-2 previamente infectadas por el VSR-A NA1 y ON1 a una MOI de 0.1, fueron incubadas con Anti VSR G monoclonal de ratón durante la noche y posteriormente se trataron con un

anticuerpo secundario anti-ratón de cabra (H+L) conjugado con Alexa Fluor 488 por dos horas mas. Después de 2, 24, 48 y 72 horas de infección, las células infectadas por NA1 y ON1 mostraron una fuerte fluorescencia verde confirmando la presencia de la proteína G del VSR. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (en azul). La condición sin infección no exhibió positividad de la proteína G del VSR a lo largo del tiempo.

Figura 7. Intensidad media de fluorescencia (IMF) de la proteína G del VSR en células HEp-2 infectadas por el VSR-A con y sin la duplicación en el gen G, (ON1 y NA1, respectivamente). La IMF fue calculada sobre imágenes de inmunofluorescencia representativas de células HEp-2 marcadas para Anti-VSR G, previamente infectadas por el VSR-A NA1 o VSR-A ON1 a una MOI de 0.1. El diagrama de barras representa la IMF en cada uno de estos dos grupos a las 2, 24, 48 y 72 horas posteriores a la infección. A partir de las 24 horas, se evidencia una mayor IMF de la proteína G del VSR en las células infectadas por el VSR-A con la duplicación en el gen G (ON1) en comparación con las células infectadas por el VSR-A sin la duplicación (NA1). Para la cuantificación de la fluorescencia se utilizó el software ImageJ.

Figura 1.

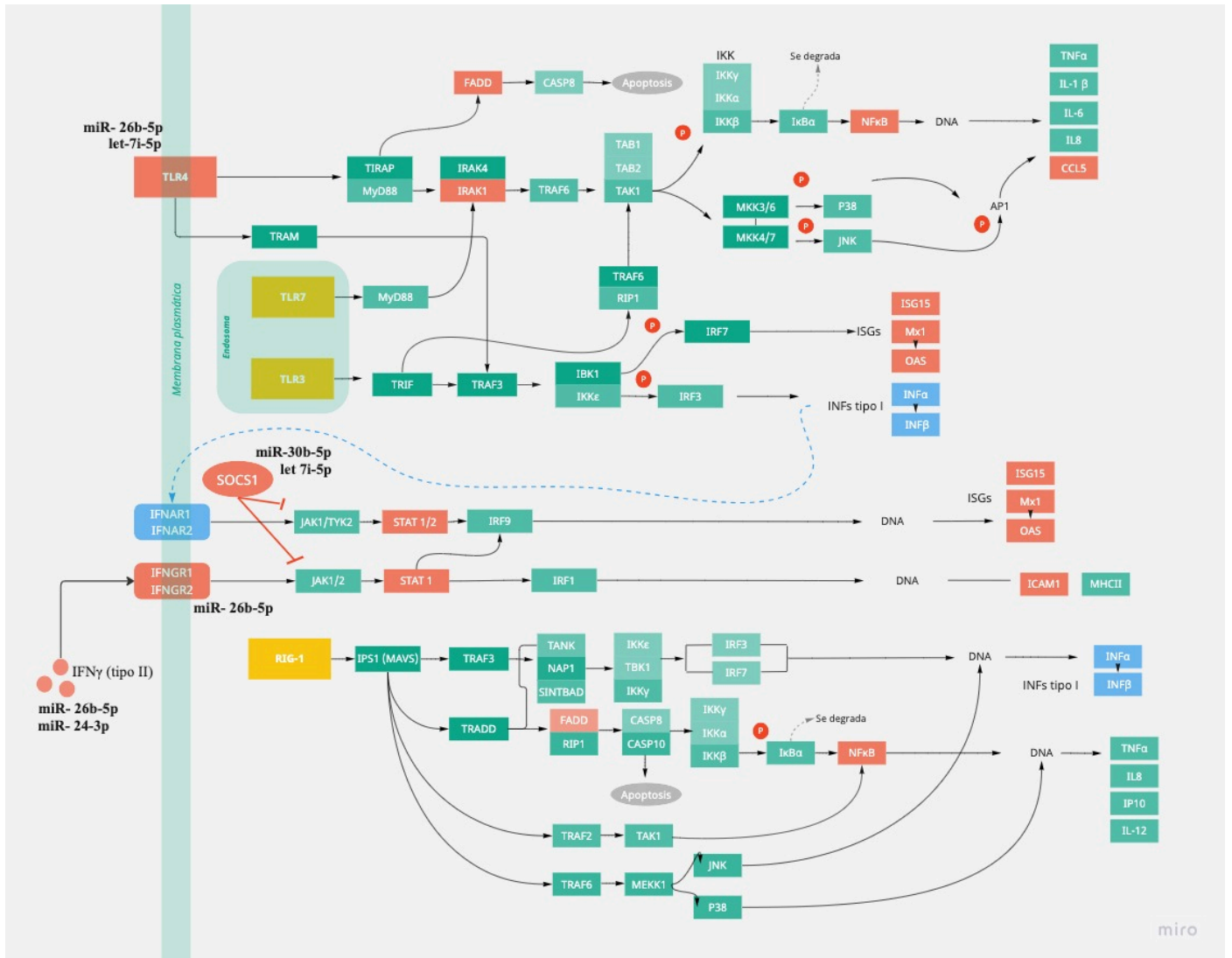


Figura 2.

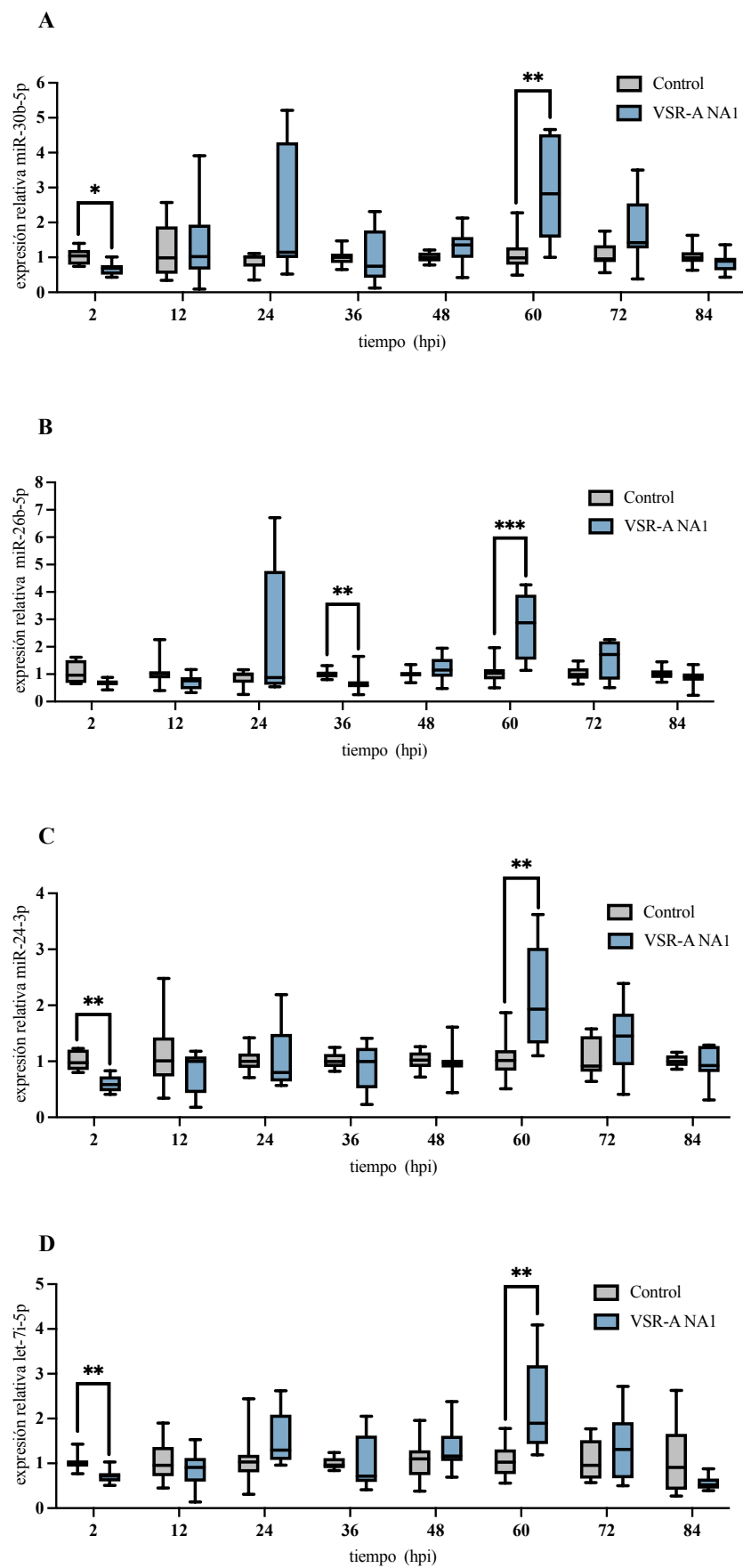


Figura 3.

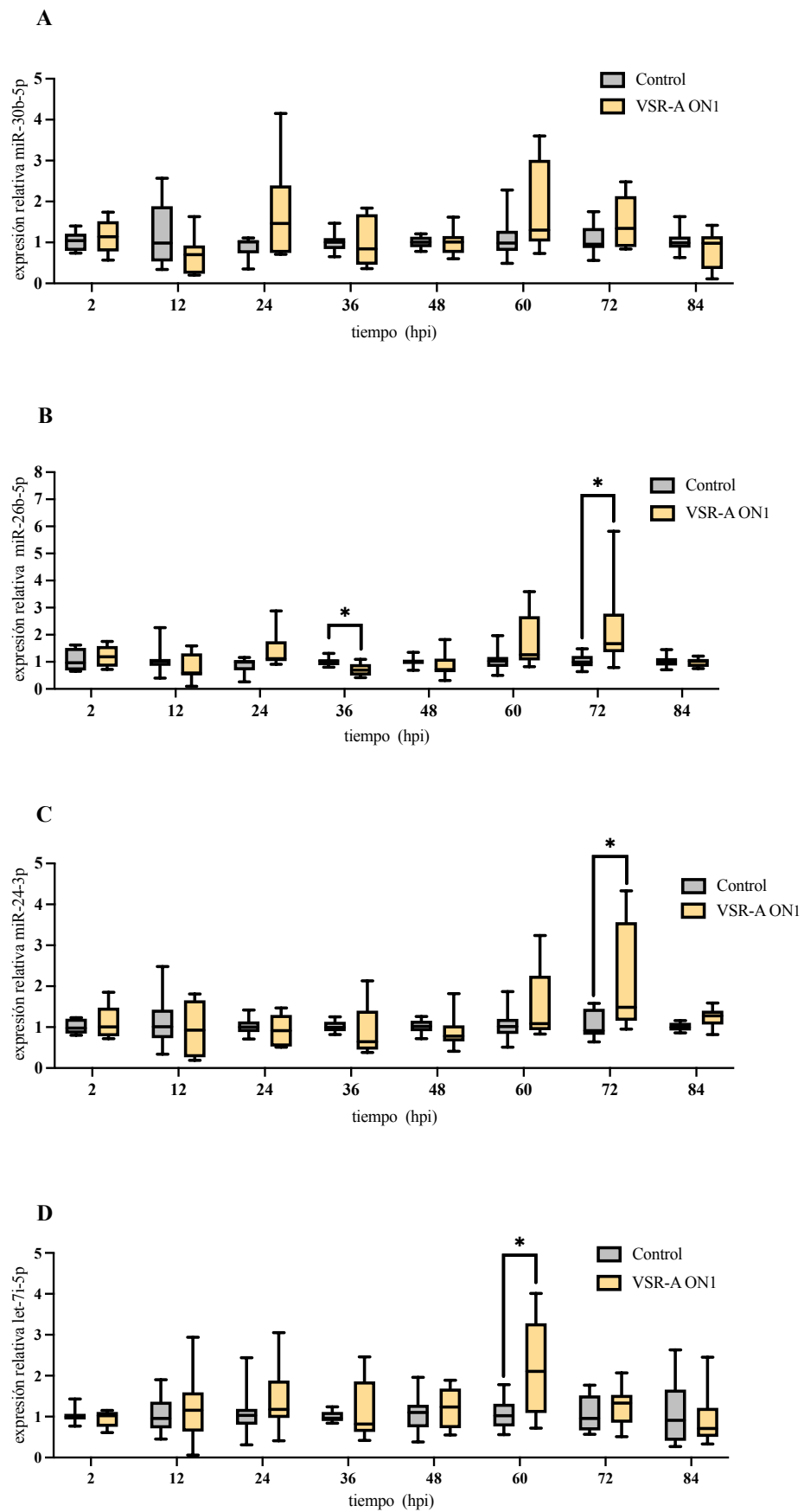


Figura 4

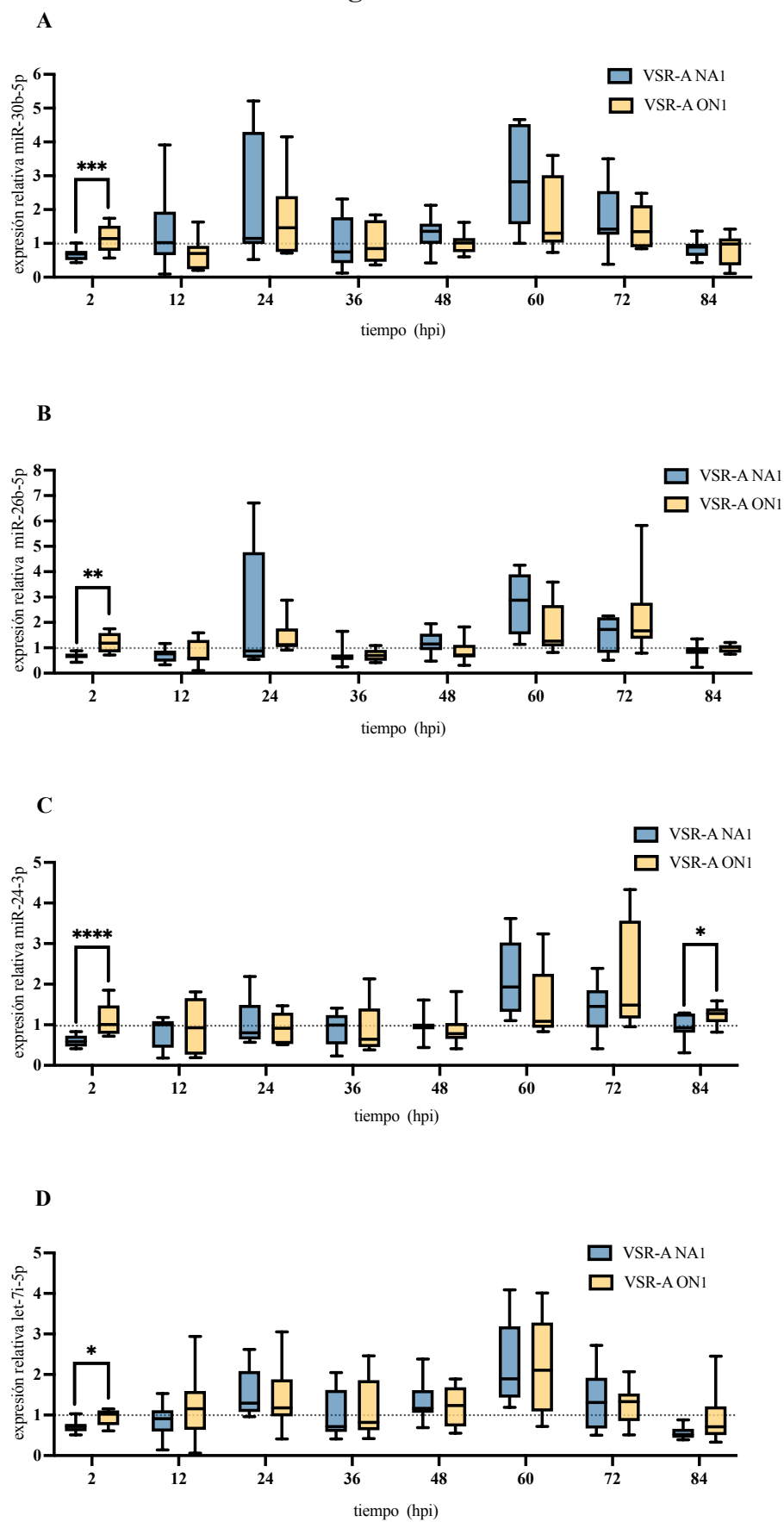


Figura 5.

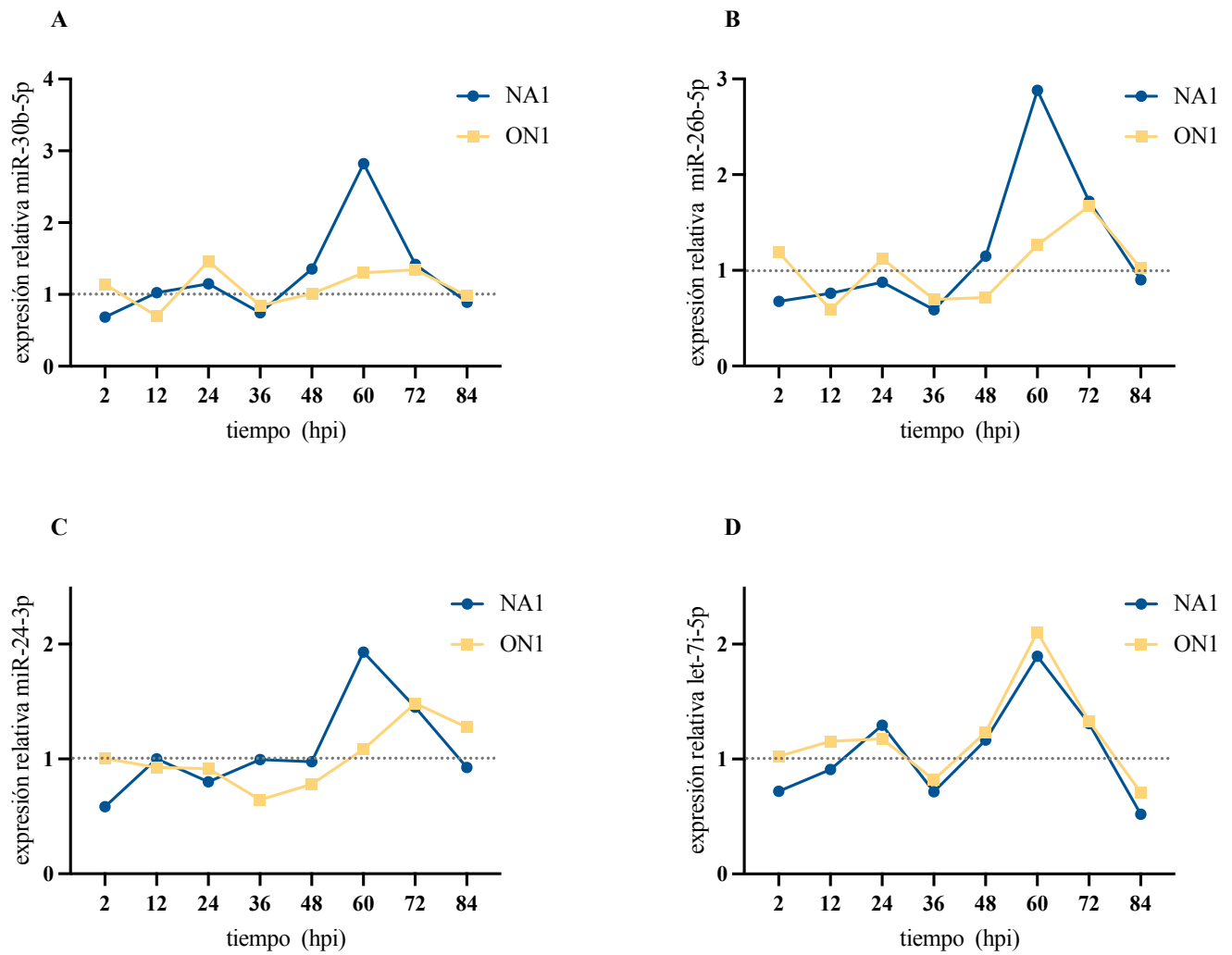


Figura 6.

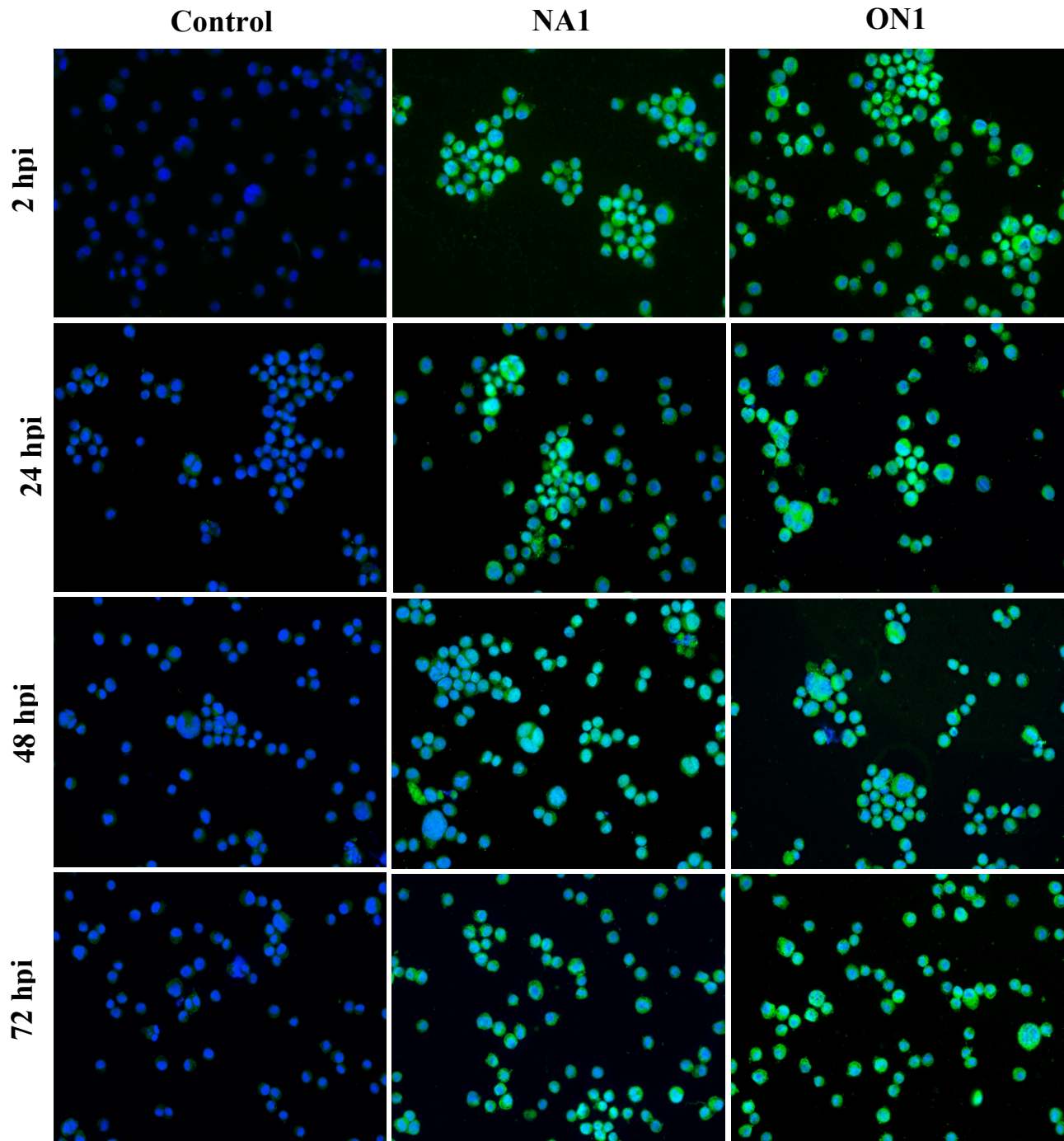
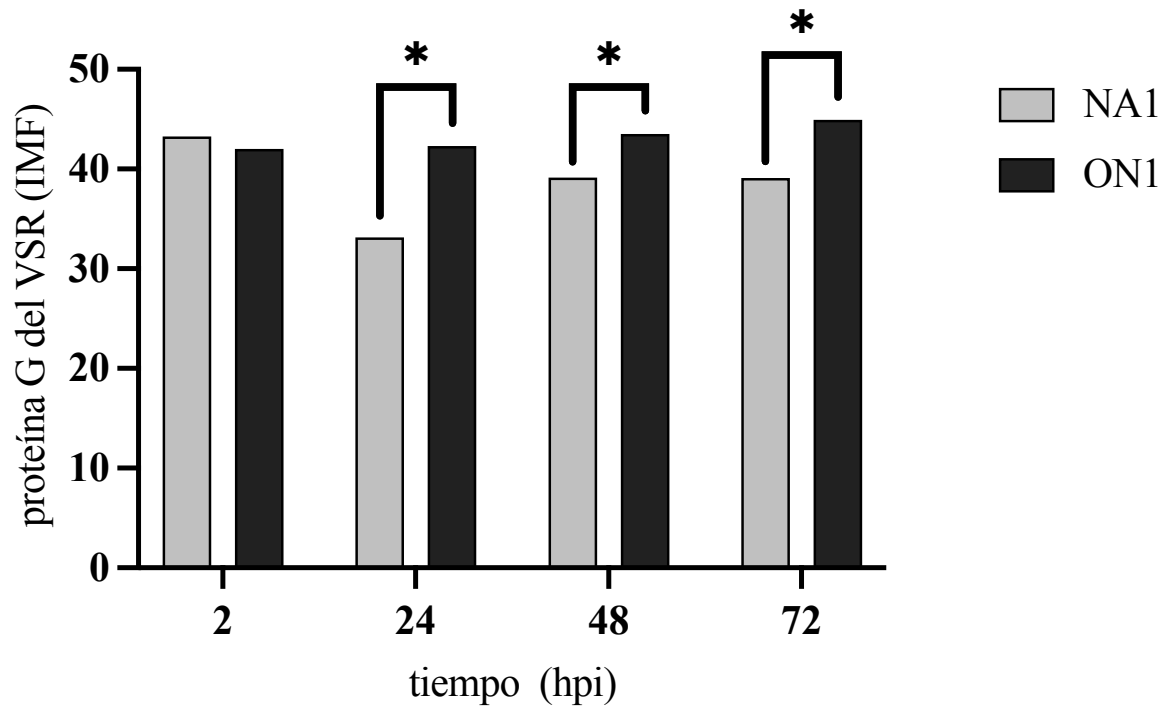


Figura 7.



Análisis de la expresión de microRNAs en respuesta a la infección por el Virus Sincitial Respiratorio con y sin la duplicación en el gen G en células HEP-2

Presenta
L.E. María Camila López Lopera

Co-directores:

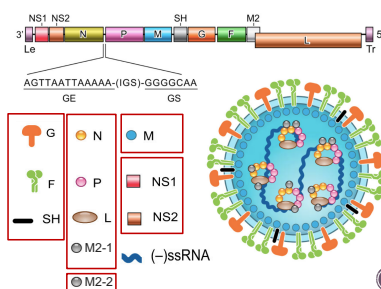
Dra. Mariana Salgado Bustamante
Dr. Daniel E. Novola Cherpitel

Asesoría interna:

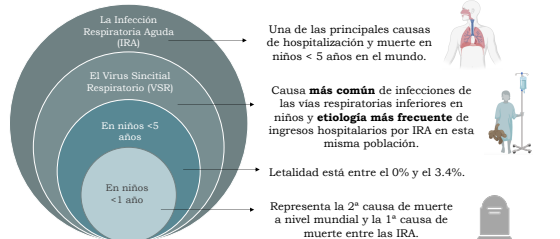
Dra. Othir Gidalti Galicia Cruz.
Dra. Esther Layseca Espinosa.

Genoma y estructura del VSR

- Género *Pneumovirus*, familia *Pneumoviridae*.
- Pleomórfico, envuelto.
- ARN de ~15,2 kb, lineal, (-) ssRNA. 10 genes que se traducen en 11 proteínas →

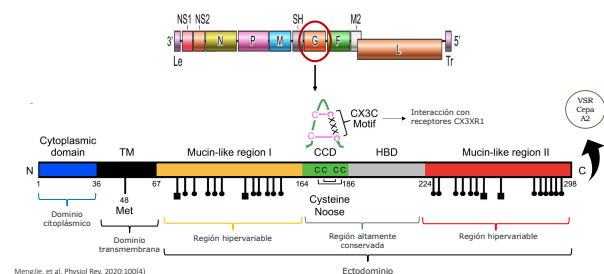
Mengjie, et al. *Physiol Rev*. 2020;100(4):1527-1594.

Epidemiología del Virus Sincitial Respiratorio



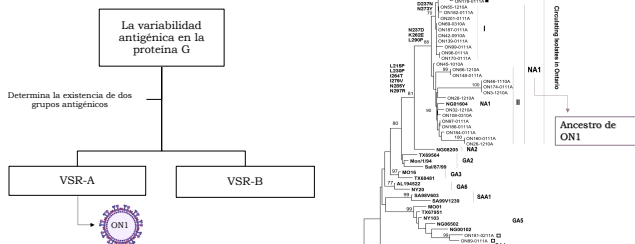
Viscarra, et al. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35(11):1199-203
Benítez, et al. *Influenza Other Respir Viruses*. 2020;14(2):182-188
Li, et al. *The Lancet*. 2022;399(10340):2047-2064.
Azzari, et al. *Ital J Pediatr*. 2021;47(1):198.
González, et al. *Arch Med Res*. 2019;50(6):377-383.

Proteína G del VSR



Mengjie, et al. *Physiol Rev.* 2020;100(4)
Eshaghi, et al. *PLoS One.* 2012;7(3)
Vandini et al. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8)

Grupos antigénicos del VSR



Eshaghi, et al. *PLoS One*. 2012;7(3):e32807.
García, et al. *J Infect Dis*. 2018;13:217(7):1089-1098.
Vandini et al. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8):1717.

ON1, un linaje del genotipo NA1 del VSR-A con una duplicación del gen G

Proteína G **SIN** duplicación (VSR-A **NA1**)[illegible]Proteína G **CON** duplicación (VSR-A **ON1**)[illegible]

La secuencia de nucleótidos del gen G del linaje ON1 se traduce en un polipéptido de 321 AAs, con nuevos sitios potenciales de O-glicosilación

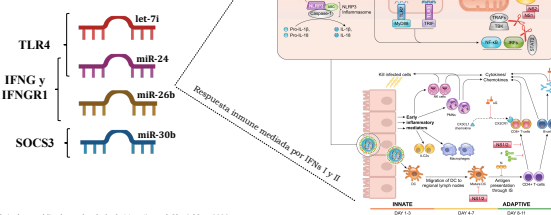
Eshaghi, et al. PLoS One. 2012;7(3):e32807

El VSR modifica la expresión de miRNAs

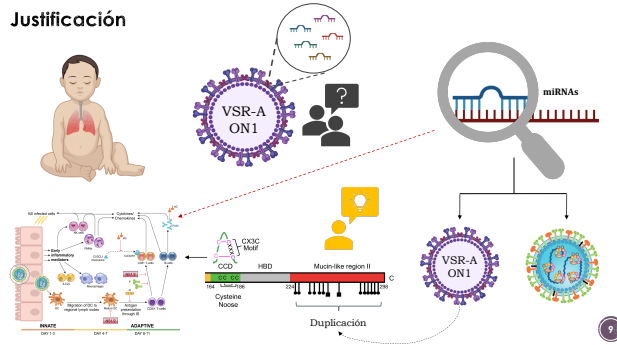
miRNA	miRNAs and AA metabolism				HBV infection and miRNAs				
	Target gene	Cell type	Reference	Year	Expression level	Method	Sample source	Reference	Year
hsa-miR-125b	IL-6LX	Monocytes (BM cells), T lymphocytes	(61)	(2015)	↓	miRNA microarray, qPCR	nasal mucosal specimens	(21)	(2016)
hsa-miR-15b	s-LX	Monocytes (BM cells), T lymphocytes	(62)	(2015)	↑	miRNA microarray	nasal mucosal specimens	(21)	(2016)
miR-7	s-LX	Endothelial cells of mouse model	(63)	(2017)	↑	miRNA microarray	peripheral blood	(68)	(2017)
hsa-miR-146a	FLAP/CDC2	Lung cancer	(64), (65)	(2014) (2018)	↑	qPCR	Hsp26	(71)	(2018)
hsa-miR-30c	CDC2	Gastric cancer	(66)	(2017)	↑	NGS, qPCR	miR23a from human PBMCs	(71)	(2018)
hsa-miR-18-5p	CDC2	Cervical cancer, Hepatocellular carcinoma	(65), (68)	(2009) (2012)	↑	miRNA microarray, qPCR	nasal mucosal specimens	(21)	(2016)
hsa-miR-20b	CDC2	Human vaginal epithelial cells	(69)	(2013)	↑	miRNA microarray, qPCR	PBMCs	(68)	(2012)
hsa-miR-143	CDC2	Arenas mesenchymal cells	(70)	(2011)	↑	multiple qPCR array	HBsEts	(68)	(2012)
hsa-miR-21	15-PGDH	Cholangiocarcinoma	(71)	(2014)	↑	NGS, qPCR	vesicles derived from HBV-infected HSCs/ECs	(72)	(2012)

Trabalho publicado em: <https://doi.org/10.1590/1980-5397/2020/03733459-602195>

miRNAs objeto de estudio

Adaptación de imagen publicada en el artículo de Mengjie et al. *Physiol Rev*. 2020.

Justificación



Pregunta de investigación

¿La expresión de miR-26b-5p, let-7i-5p, miR-30b-5p, y miR-24-3p en respuesta a la infección por el Virus Sincitial Respiratorio (VSR) subtipo A con la duplicación en el gen G es diferente a su expresión en respuesta a la infección por el VSR sin la duplicación en células HEP-2?

Hipótesis

La expresión de miR-26b-5p, let-7i-5p, miR-30b-5p, y miR-24-3p en respuesta a la infección por el Virus Sincitial Respiratorio (VSR) subtipo A con la duplicación en el gen G es diferente a su expresión en respuesta a la infección por el VSR subtipo A sin la duplicación, en células HEP-2.

Objetivo general

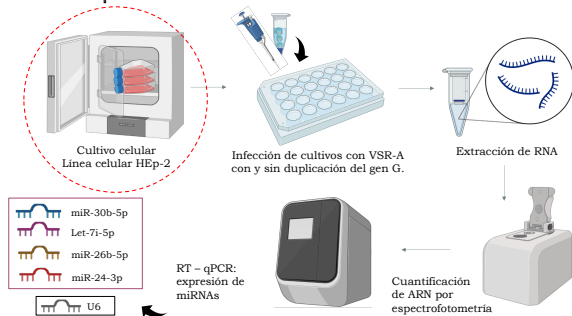
Analizar la expresión de miR-26b-5p, let-7i-5p, miR-30b-5p, miR-24-3p en respuesta a la infección por el Virus Sincitial Respiratorio con y sin la duplicación en el gen G en células HEP-2.

Objetivos específicos

1. Cuantificar la expresión de miR-26b-5p, let-7i-5p, miR-30b-5p, y miR-24-3p en respuesta a la infección por el Virus Sincitial Respiratorio subtipo (VSR) A con y sin la duplicación en el gen G en células HEP-2.
2. Comparar la expresión de miR-26b-5p, let-7i-5p, miR-30b-5p, y miR-24-3p en respuesta a la infección por el Virus Sincitial Respiratorio (VSR) subtipo A con la duplicación en el gen G y su expresión en respuesta a la infección por el VSR subtipo A sin la duplicación, en células HEP-2.

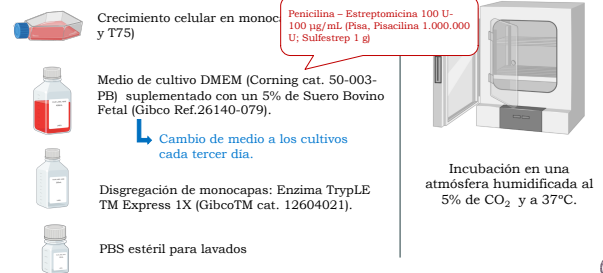
Diseño experimental

Diseño experimental



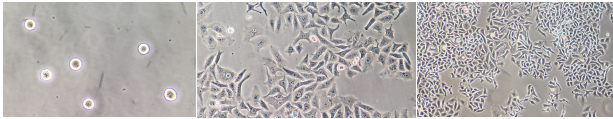
Cultivo celular

Mantenimiento de cultivos HEP-2



Cultivo celular

Línea celular HEP-2



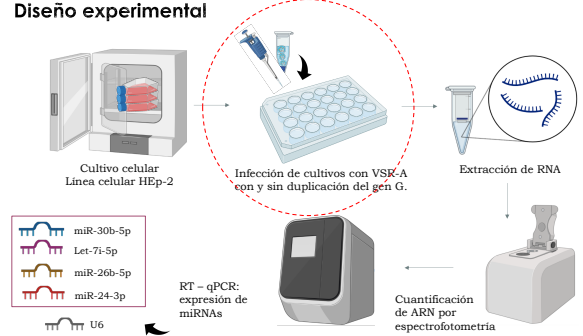
05/09/2022: HEP-2 P-368.
Células una hora después de ser
descongeladas.

08/09/2022: HEP-2 P-368.
3 días post-siembra.

10/09/2022: HEP-2 P-368.
5 días post-siembra.

17

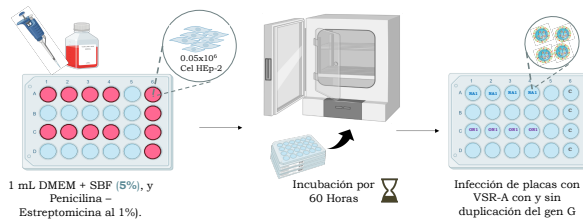
Diseño experimental



18

Infección de cultivos con VSR-A con y sin duplicación del gen G.

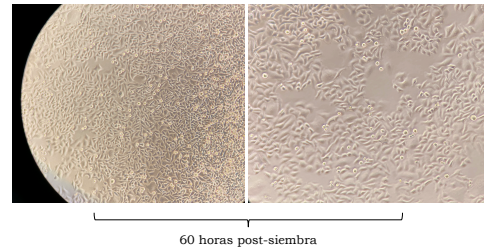
Siembra de pozos en placas



19

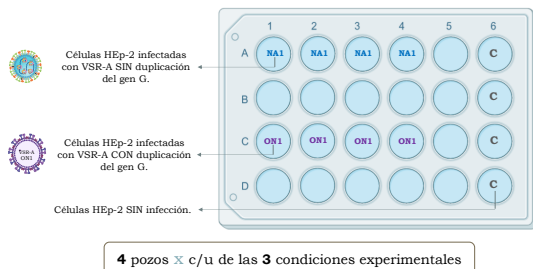
Infección de cultivos con VSR-A con y sin duplicación del gen G.

Confluencia alcanzada en placas de 24 pozos



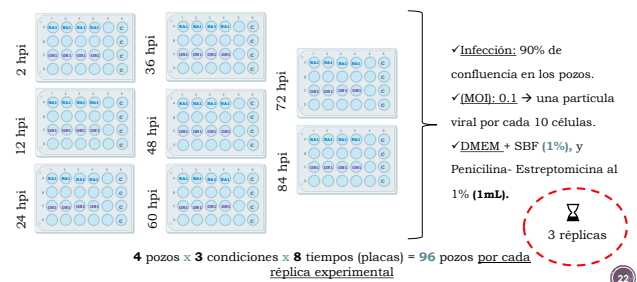
20

Infección de cultivos con VSR-A con y sin duplicación del gen G.



21

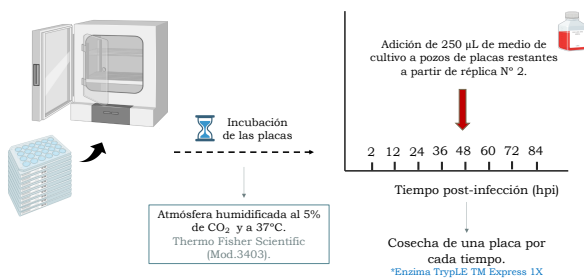
Infección de cultivos con VSR-A con y sin duplicación del gen G



22

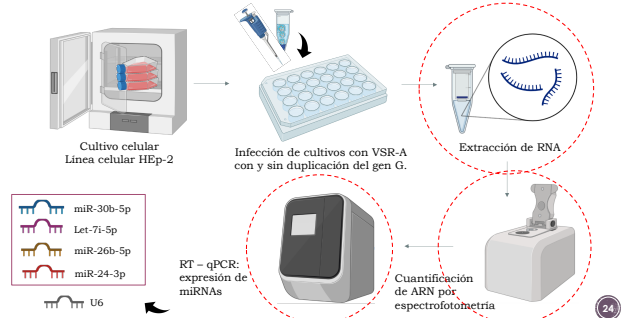
Infección de cultivos con VSR-A con y sin duplicación del gen G

Cosecha



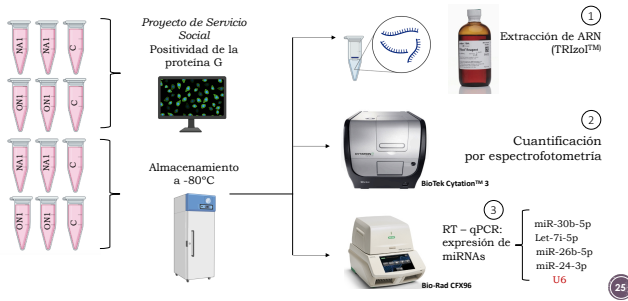
23

Diseño experimental

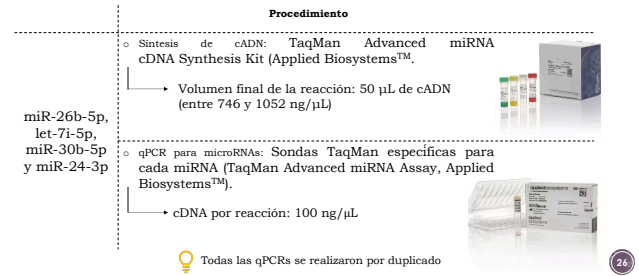


24

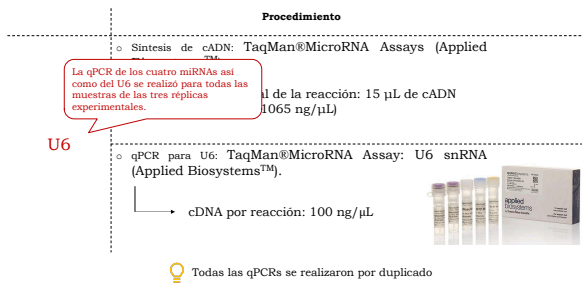
Extracción y cuantificación del ARN – RT qPCR



RT-qPCR miRNAs



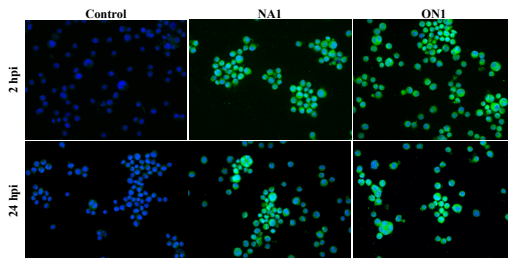
RT-qPCR gen constitutivo



Resultados

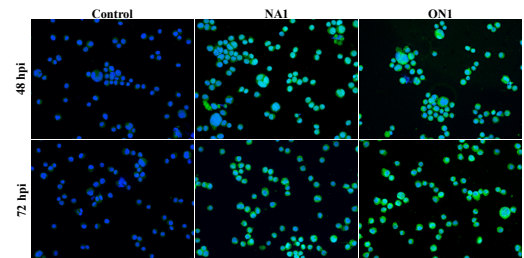


Expresión de la proteína G del VSR en células HEP-2 visualizada mediante micrografías de inmunofluorescencia



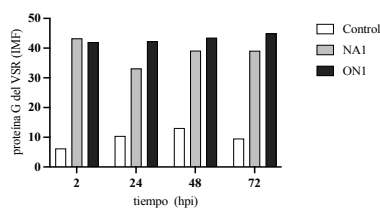
Resultados del proyecto de servicio social realizado en el Laboratorio de Biología Molecular y Epigenética del Departamento de Bioquímica por Annia Werge y Erika Chi Ahumada.

Expresión de la proteína G del VSR en células HEP-2 visualizada mediante micrografías de inmunofluorescencia



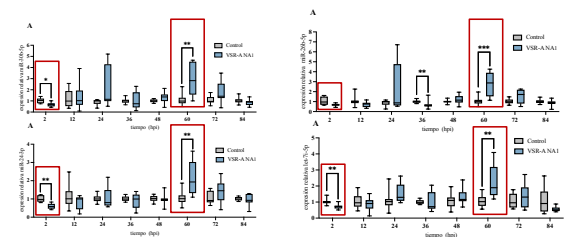
Resultados del proyecto de servicio social realizado en el Laboratorio de Biología Molecular y Epigenética del Departamento de Bioquímica por Annia Werge y Erika Chi Ahumada.

Intensidad media de fluorescencia (IMF) de la proteína G del VSR en células HEP-2 infectadas por el VSR y células HEP-2 sin infección.



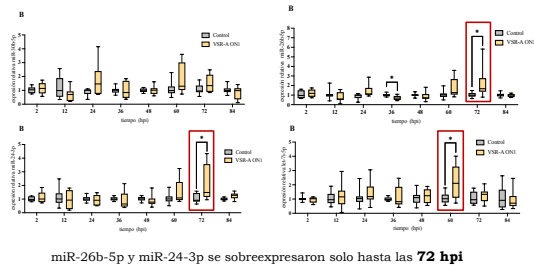
Resultados del proyecto de servicio social realizado en el Laboratorio de Biología Molecular y Epigenética del Departamento de Bioquímica por Annia Werge y Erika Chi.

Expresión relativa de miRNAs en células HEP-2 infectadas por el VSR-A sin la duplicación en el gen G: NA1



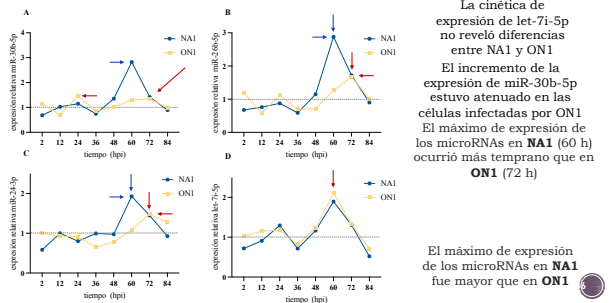
A las 2 hpi se encontró una represión significativa de la expresión de miR-30b-5p, miR-24-3p y let-7i-5p en comparación con el grupo control

Expresión relativa de miRNAs en células HEP-2 infectadas por el VSR-A con la duplicación en el gen G: ON1



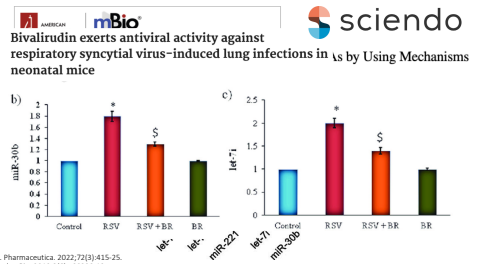
33

Expresión diferencial de microRNAs en respuesta a la infección por el VSR-A con y sin la duplicación en el gen G



34

Después de la infección por el VSR-A, la expresión de let-7i y miR-30b interviene en las células NHBE

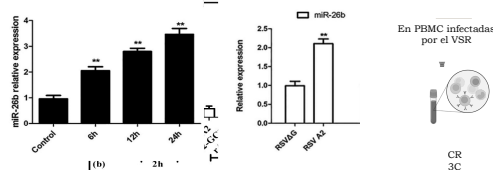


35

Discusión

El efecto de la proteína G del VSR es fundamental en la inducción de miR-24

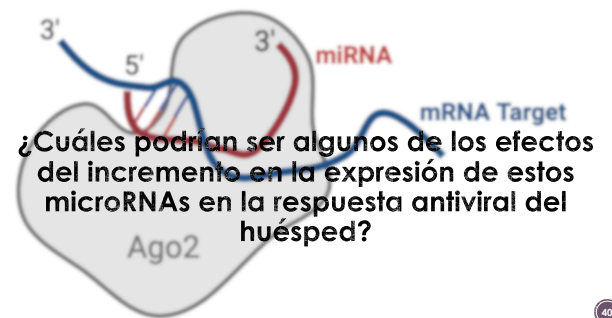
Respiratory syncytial virus infection inhibits TLR4 signaling via up-regulation of miR-26b



Liu et al. Cell Biosci. 2015;5(1):176-83.

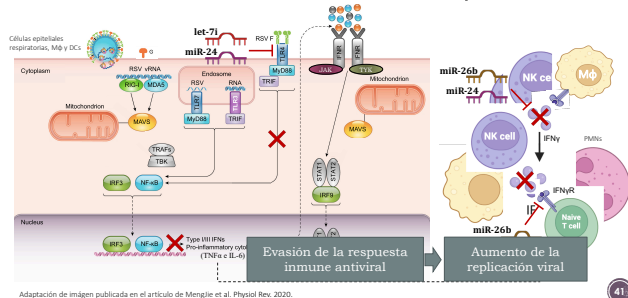
Bailey et al. Vaccine. 2017;35(1):1-16.

39



40

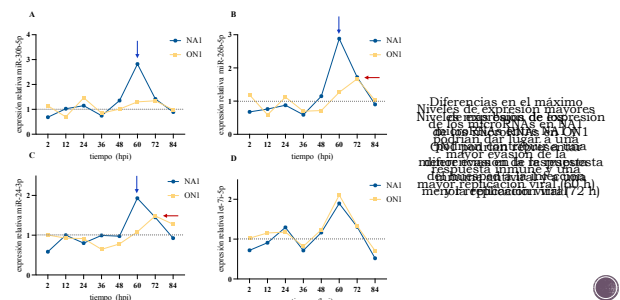
Sobreexpresión de microRNAs como posible estrategia de evasión inmunitaria durante la infección por VSR



Adaptación de imagen publicada en el artículo de Mengjie et al. Physiol Rev. 2020.

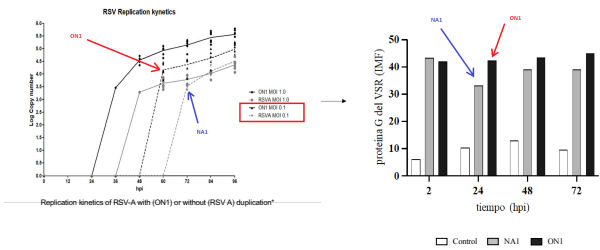
41

Diferencias en el perfil de expresión de los microRNAs entre NA1 y ON1 podrían inducir respuestas divergentes en las células huésped



42

Incremento temprano y mayor de la carga viral en células HEP-2 infectadas por ON1 en comparación con NA1



Conclusiones

- Las células HEP-2 son permisivas a la infección por VSR-A y constituyen un modelo *in vitro* que permite evaluar la expresión de microRNAs durante los primeros días postinfección.
- La infección por el VSR-A con y sin la duplicación en el gen G (ON1 y NA1, respectivamente), regula positivamente la expresión de microRNAs con objetivos moleculares implicados en la respuesta inmune celular mediada por los IFNs tipo I y II, lo que podría ser una de las estrategias que el VSR-A ha desarrollado para evadir las respuestas inmunitarias antivirales del huésped, evidenciado en este trabajo de acuerdo con los perfiles de expresión diferencial de los microRNAs.

Cronograma de actividades

	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
2021								Curso de materias optativas y obligatorias y selección del proyecto de tesis				
2022	Curso de materias optativas y obligatorias y desarrollo de la propuesta de tesis							Curso de materias optativas e inicio de fase experimental				
2023	Infección	Extracciones de ARN, RT-qPCR: expresión de miRNAs						Análisis de resultados, escritura de tesis, correcciones y proceso de titulación				

¡Muchas gracias!