

[Transcripción de una Presentación por Kristen Funk \(Universidad de Carolina del Norte Charlotte\), setiembre 23 de 2024](#)



Título: [Infección viral neurotrópica en el envejecimiento del sistema nervioso central y la enfermedad de Alzheimer: suplemento COVID-19](#)

Premio NIH #: [3R00AG053412-04S1](#)

[Grabación de YouTube con diapositivas](#)

[Información del seminario web del CIC de Setiembre 2024](#)

Traductor: Yonara Anastacio

---

### Transcripción

#### *Diapositiva 1*

Muy bien, gracias a todos por estar aquí. Estoy emocionado de contarles sobre el trabajo que he estado realizando en mi laboratorio, investigando la inmunidad de las células T CD8+ en el cerebro envejecido en respuesta a una infección por coronavirus respiratorio, particularmente en el contexto del deterioro cognitivo.

#### *Diapositiva 2*

Sabemos desde hace mucho tiempo que la edad avanzada influye en la gravedad de las infecciones virales. Si bien estas infecciones pueden afectar a personas de todas las edades, los casos más graves ocurren de manera desproporcionada en personas mayores de 60 años. Esto es algo que hemos observado anteriormente. Mi trabajo ha abordado previamente la enfermedad neuroinvasiva causada por el virus del Nilo Occidental y, más recientemente, la pandemia de coronavirus. Nuestro objetivo es comprender cómo la edad afecta la respuesta inmune antiviral en el sistema nervioso central. En investigaciones previas, estudiamos el virus del Nilo Occidental, y esos hallazgos fueron publicados hace un par de años. Más recientemente, el estudio del que hablaré hoy utilizó un coronavirus de ratón, MHV, cuyos resultados han sido publicados en BioRxiv y actualmente están en proceso de revisión para su publicación.

#### *Diapositiva 3*

Sabemos que el envejecimiento afecta profundamente al sistema inmunológico. El término "inflammaging" se usa para describir el estado de inflamación crónica asociado con la edad. En particular, observamos un aumento en las células T CD8+, pero también una disminución en el

reservorio de células T vírgenes y una reducción en la diversidad del receptor de células T, lo que creemos que puede afectar la capacidad del sistema inmunológico para responder a nuevos desafíos. Mi laboratorio está interesado en comprender cómo estos cambios influyen en la respuesta inmune antiviral en el cerebro y en qué medida pueden afectar la recuperación cognitiva después de una infección.

#### *Diapositiva 4*

Para estudiar esto, mi laboratorio ha desarrollado un modelo experimental en ratones utilizando MHV-A59. Inoculamos de manera intranasal ratones machos C57BL/6 de 8 semanas o 18 meses de edad con  $10^3$  unidades formadoras de placa ( $10^3$  unidades infecciosas) o con HBSS como control. Observamos a estos ratones durante un período de 30 días. Este modelo fue desarrollado en gran parte por la Dra. Katie Regan, una postdoctorada en mi laboratorio que recientemente dejó el grupo. Utilizando este modelo, demostramos que los ratones envejecidos son más susceptibles a infecciones virales letales, lo cual no fue sorprendente. Además, podrían experimentar un curso de enfermedad más severo, con mayor pérdida de peso y puntuaciones clínicas más altas, que podemos cuantificar.

#### *Diapositiva 5*

Queríamos entender cómo esto se correlacionaba específicamente con la respuesta inmune celular en el cerebro. Para ello, utilizamos espectrometría para analizar las células T CD4 y CD8+ en el cerebro. Es importante señalar que, en condiciones normales, hay muy pocas o prácticamente ninguna célula T en el cerebro. Sin embargo, durante la infección, observamos un reclutamiento significativo de estas células T hacia el cerebro. Aquí estamos analizando los días 12 y 30 post-infección. Vemos que los ratones envejecidos presentan niveles más altos de células T CD8+ en el cerebro tanto a los 12 como a los 30 días post-infección. También investigamos la respuesta en los pulmones, que son la fuente primaria de la infección, así como en los ganglios linfáticos cervicales, los ganglios linfáticos mediastínicos y el bazo. Observamos niveles elevados de células T en todos estos tejidos en los ratones envejecidos.

#### *Diapositiva 6*

Sin embargo, cuando analizamos la especificidad viral de estas células T, observamos que un menor porcentaje de ellas en los ratones envejecidos eran específicas para el virus MHV con el que los infectamos, tanto a los 12 como a los 30 días post-infección. Esto sugiere que, aunque hay un gran reclutamiento de células T hacia el cerebro, en los ratones envejecidos una menor proporción de estas células es específica para el virus y, por lo tanto, contribuye menos a su eliminación.

#### *Diapositiva 7*

Queríamos entender cómo eso podría manifestarse en un modelo de aprendizaje espacial. Anteriormente, en nuestro modelo del virus del Nilo Occidental, hemos observado que los

ratones post-infección presentan déficits cognitivos. Para evaluar esto, utilizamos el laberinto de Barnes, que estamos representando aquí. Básicamente, es una mesa circular en la que se coloca un ratón en el centro. Se les evalúa dos veces al día durante cinco días consecutivos. El agujero objetivo se mantiene en la misma ubicación cada día, y con el tiempo los ratones aprenden dónde está. Este agujero objetivo es básicamente una "caja de refugio" a la que el ratón puede entrar para escapar de la tarea que les genera ansiedad. Realizamos este experimento entre los días 25 y 29 post-infección, aproximadamente dos semanas después de que el virus ha sido eliminado del cerebro. Durante la prueba, evaluamos a los ratones dos veces al día durante cinco días consecutivos. La línea negra punteada representa a los ratones adultos con infección simulada (*mock-infected*), mientras que la línea negra sólida representa a los ratones adultos infectados con *mouse hepatitis virus (MHV)*. Se puede observar que ambos grupos mejoran a lo largo de los cinco días de prueba, sin una diferencia significativa entre los grupos mock e infectados. Sin embargo, cuando analizamos a los ratones envejecidos con infección simulada (línea roja punteada), también mejoran a lo largo del período de cinco días, aunque con un pequeño aumento en el día 2. En contraste, al observar el grupo de ratones envejecidos infectados (línea roja sólida), la curva se desplaza completamente hacia arriba, lo que sugiere un déficit significativo en el aprendizaje espacial de estos ratones. Podemos resumir estos resultados en un solo dato utilizando la latencia o el área bajo la curva que hemos normalizado. La normalización de los datos de los ratones mock envejecidos captura el pequeño aumento observado en el día 2. De nuevo, cada uno de los puntos en el gráfico representa un ratón evaluado en este paradigma. Encontramos un aumento significativo en la latencia en los ratones adultos y envejecidos post-infección, particularmente en los días 2, 3 y 4, lo que indica un deterioro cognitivo en este periodo.

#### *Diapositiva 8*

Queríamos entender el mecanismo celular que conduce a este efecto. En nuestro modelo del virus del Nilo Occidental, hemos observado que esto se debe a la eliminación de sinapsis mediada por la microglía, lo que básicamente interfiere con la comunicación entre neuronas. También se sabe que ocurre la desmielinización en estos modelos de MHV. Sin embargo, no encontramos evidencia de que ninguna de esas cosas ocurriera en nuestro sistema. En cambio, observamos evidencia de muerte neuronal, particularmente en el hipocampo, que sabemos es importante para el aprendizaje espacial. Aquí les muestro ratones de 8 semanas de edad y ratones de 18 meses de edad. En particular, en la región CA3 del hipocampo, hemos observado que en azul aparece DAPI, en verde NeuN (que corresponde a los núcleos neuronales) y en rojo la tinción TUNEL, la cual es indicativa de apoptosis. Los hemos cuantificado individualmente. Aquí se muestran la tinción de NeuN, la tinción TUNEL y, a continuación, la co-localización utilizando el coeficiente de correlación de Pearson y el coeficiente de Manders.

Lo que observamos es que, particularmente en nuestros animales sometidos a infección simulada (Mock), se aprecia un leve aumento en la tinción TUNEL. Pero a los 12 días, la vemos elevada

tanto en nuestros animales de 18 meses como en los de 8 semanas, y podemos notar que la co-localización está siendo resaltada por estas flechas en cada uno de estos grupos. Se observa ese aumento en este marco temporal agudo para ambas edades, y luego parece recuperarse en ambos grupos, aunque permanece ligeramente elevada en el grupo de mayor edad. Esto sugiere que estamos experimentando un deterioro cognitivo que probablemente esté mediado por esta muerte neuronal dentro del circuito trisináptico, el cual sabemos es importante para el aprendizaje espacial.

#### *Diapositiva 9*

Queríamos comprender el mecanismo celular que causa esta apoptosis neuronal, así que establecimos un sistema de cultivo celular en el que tomamos neuronas primarias de ratones y las dejamos sin infección o las infectamos con NHBA59. Lo hicimos de forma independiente. Nuevamente, utilizamos NeuN en verde y TUNEL en rojo, y la co-localización se resalta en amarillo con estas flechas. El virus por sí solo no parecía matar la neurona; sin embargo, cuando las co-cultivamos con células T CD8+ aisladas de ratones infectados con MHV a los 7 días post-infección, observamos una co-localización mucho más marcada en la que se evidenciaba la muerte neuronal. Esto sugiere que el virus por sí solo no mató nuestras neuronas, sino que lo hicieron las células T de estos ratones infectados.

#### *Diapositiva 10*

Así que queríamos saber si se trataba de una respuesta específica a un antígeno o independiente del antígeno. Nuevamente, utilizamos nuestro sistema de co-cultivo de neuronas no infectadas o infectadas y las cultivamos ya sea solas o en co-cultivo con células T CD8+ naive. Estas provienen de un ratón no infectado o de células T que habían sido estimuladas en masa con PMA e ionomicina. Una vez más, las tiñamos con NeuN y TUNEL. Creo que podemos apreciar que las células T estimuladas en masa con PMA/Ionomycin causan una reducción en la tinción de los núcleos neuronales y un aumento en la co-localización con la tinción TUNEL. Esto nos sugiere que no se trata necesariamente de una respuesta específica a un antígeno, sino que, probablemente, estas células T activadas están causando este fenotipo de muerte neuronal. Creemos que esto es importante, en particular en ese grupo envejecido, que presentó la infiltración de células T que no eran necesariamente específicas de ningún antígeno ni de nuestro virus.

#### *Diapositiva 11*

Con eso, mis conclusiones son que creemos que las infecciones virales están causando la muerte de estas neuronas a través de esta respuesta de células T CD8+. Estamos tratando de entender mejor el mecanismo que media esta respuesta.

#### *Diapositiva 12*

En última instancia, nos interesa la progresión de las células T efectoras y de memoria, y qué factores pueden estar influyendo en ello durante el envejecimiento. También nos interesa cómo

las infecciones virales o las propias células T pueden promover la patología relacionada con la enfermedad de Alzheimer, incluido el estrés genotóxico.

*Diapositiva 13*

Con esto, me gustaría agradecer a las personas que realizaron este trabajo, en especial a Katie Regan. Si están interesados, aquí está el enlace a nuestra publicación en BioRxiv. ¡Gracias!