



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

00346

14
26j

EXPRESION DE PROTEINAS DEL VIRUS
SINCICIAL RESPIRATORIO EN CELULAS SIMILARES
A MACROFAGOS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A
ROCIO G. TIRADO MENDOZA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. BEATRIZ GOMEZ GARCIA

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Virología del
Departamento de Microbiología y Parasitología en la
Facultad de Medicina, UNAM.*

Este trabajo fue posible gracias al apoyo del:

*Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)
al proyecto 0476-M9108*

*Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS)
al proyecto 2211*

AGRADECIMIENTOS :

A la Dra. Beatriz Gómez García por su valiosa y acertada dirección en el desarrollo de este proyecto y por la amistad brindada.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Beatriz Gómez García, Dra. Cecilia Ximenez García y M en C Jaime Bustos Martínez.

A los miembros del jurado, Dra. Beatriz Gómez García, Dr. Enrique Ortega Soto, Dra. Cecilia Ximenez García, M en C Jaime Bustos Martínez, M en C Carmen Soler Claudin, Dr. Abraham Landa Piedra y Dra. Emma Melendro Lozano.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGPA) por la beca otorgada para la realización de estudios de maestría.

A SERVICREDIT por las facilidades prestadas para el uso de su PC.

A Luis Felipe Martínez Hernández por la ayuda prestada como dibujante.

A la Q.F.B. Rosa Elena Sarmiento Silva por su colaboración y valiosa opinión en la revisión del trabajo escrito.

DEDICATORIAS

A la Fam. Galindo-Rodríguez por la amistad brindada durante todo este tiempo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Angel Ravizé Chavéz, Ma. Antonieta Guerrero Plata, Enrique Hernández Hernández, Ignacio Palacios Fuentes, Jesus Nuñez Ramírez y Mirza Romero Valdovinos.

A mis amigos, Laura, Hugo, Norma, German, Augusto, Martin, Paz, Caridad y de manera muy especial a...

Rosa Elena Sarmiento quien me ha brindado siempre su apoyo y amistad incondicional.

A mis padres Arturo y Carolina, a quienes dedico muy especialmente este trabajo en agradecimiento al apoyo y amor que siempre me han brindado.

A Edgar, con todo mi amor por su apoyo, paciencia y comprensión.

INDICE

INTRODUCCION	2
IMPORTANCIA DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO EN INFECCIONES AGUDAS DEL TRACTO RESPIRATORIO BAJO	2
Enfermedades de las Vías Respiratorias Inferiores en México	2
Virus Sincicial Respiratorio	4
Estructura del virión	4
Proteínas del virión	4
Proteínas no estructurales	4
Mapa Genético	4
Multipliación Viral	5
Unión y entrada	5
Transcripción y Traducción	5
Ensamblaje y liberación del virión	5
A. Primera Fase	5
B. Segunda Fase	5
C. Tercera Fase	6
Peristencia viral	6
Infección persistente por el Virus Sincicial Respiratorio	6
Macrófagos alveolares y su infección por el Virus Sincicial Respiratorio	7
HIPOTESIS	9
OBJETIVO	9
MATERIAL Y METODOS	10
RESULTADOS	15
DISCUSION	23
CONCLUSIONES	26
APENDICE	27
BIBLIOGRAFIA	29

INTRODUCCION

IMPORTANCIA DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO EN INFECCIONES AGUDAS DEL TRACTO RESPIRATORIO BAJO.

Las infecciones agudas del tracto respiratorio son causadas principalmente por agentes bacterianos o virales. Dentro de éstos últimos, el virus sincicial respiratorio es el patógeno viral más importante y principal causa de bronquiolitis y neumonía en infantes (1,2,3). Es altamente contagioso y responsable de epidemias anuales, que se presentan principalmente durante el periodo invernal (diciembre-marzo), en éstas el 50% de niños menores de 18 meses de edad están infectados (2,4). En países desarrollados, aproximadamente la mitad de los niños menores de un año, son infectados por el virus sincicial respiratorio, durante su primera temporada invernal. Estudios realizados en comunidades urbanas, han demostrado que los niños presentan de 5 a 8 episodios anuales de infecciones respiratorias durante sus primeros cinco años de vida, con una duración de 7 a 9 días. La tasa de mortalidad en niños entre 1 y 4 años por éste tipo de infecciones es 10 veces mayor en países subdesarrollados que en los desarrollados (3,5).

El virus sincicial respiratorio es el agente causal más importante a nivel mundial en infecciones agudas severas del tracto respiratorio bajo que requieren hospitalización y son la principal causa de morbilidad y mortalidad en niños menores de dos años. En 25% de los países en vías de desarrollo ésta es la causa con la tasa más alta de mortalidad infantil (1,4,5). En Estados Unidos de América (EUA), anualmente causa 9000 hospitalizaciones y 4500 muertes. Aproximadamente el 1% de los niños es hospitalizado por infección respiratoria causada por el virus sincicial respiratorio, con una tasa de mortalidad aproximada del 1% y se incrementa hasta el 3% en niños que además de infección respiratoria presentan padecimientos tales como hipertensión pulmonar, cirugía e inmunosuprimidos por tratamiento (3,4,6,7,8,9).

Las infecciones del tracto respiratorio inferior durante la infancia constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de un padecimiento respiratorio crónico en adultos. Estudios epidemiológicos, indican que la frecuencia y severidad de síntomas pulmonares en adultos están asociados a antecedentes de enfermedad respiratoria en la etapa temprana de la infancia (10). El virus sincicial respiratorio, es un patógeno capaz de causar severos cuadros de neumonía en adultos tanto inmunocomprometidos (considerados de alto riesgo) como sanos. En estudios realizados en adultos con neumonía, en aproximadamente el 50% de los casos reportados se identificó al virus sincicial respiratorio como el agente responsable (11,12).

Enfermedades de las Vías Respiratorias Inferiores en México.

En México, como en otros países en vías de desarrollo, las enfermedades de las vías respiratorias inferiores, ocupan el primer lugar en morbilidad infantil, como se muestra en la figura 1. En el año de 1989 la tasa de morbilidad correspondió a 2985.04 en niños de 1 a 4 años y de 1300.46 en menores de un año por cada 100,000 habitantes respectivamente (13).

INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS EN MEXICO MORBILIDAD

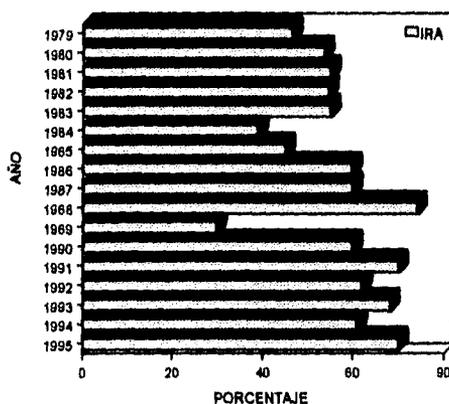


Fig. 1. Las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) ocuparon el primer lugar de morbilidad en cada uno de los años representados en la gráfica. Datos obtenidos de la Secretaría General de Epidemiología, S.S.A.

Dentro de las principales 20 causas de mortalidad infantil, las enfermedades de las vías respiratorias inferiores han ocupado desde 1940 hasta 1993 los primeros lugares, como se muestra en la tabla 1 (13).

TABLA 1 Morbilidad infantil en México					
Año	Total		Específica por enfermedades de las vías respiratorias inferiores		
	Tasa*	%	Tasa*	%	Lugar**
1940	12,370	23.9	3,549	28.2	Primero
1950	9,620	27.0	2,482	24.0	Primero
1960	7,420	29.6	2,608	35.2	Primero
1970	6,050	30.0	2,330	34.0	Primero
1980	3,880	21.6	942	24.3	Primero
1985	2,510	16.1	944	24.0	Primero
1986	2,380	15.1	850	15.7	Segundo
1987	2,210	15.3	369	16.6	Segundo
1988	2,360	14.9	354	15.0	Primero
1989	2,560	9.3	255	14.0	Primero
1990	2,407	15.5	355	14.7	Primero
1991	2,073	13.8	312	14.3	Primero
1992	1,876	12.8	290	13.5	Primero
1993	1,730	11.9	246.4	14.03	Primero

* Por 100,000 nacidos vivos registrados.

** Causa de mortalidad entre las enfermedades infecciosas.

En México, no existen reportes de identificación del agente etiológico que señalen al virus sincitial respiratorio como el principal agente etiológico involucrado en padecimientos respiratorios. Sin embargo, en base a las evidencias epidemiológicas de morbilidad y mortalidad referentes a enfermedades de las vías respiratorias inferiores señaladas anteriormente, así como,

los reportes de bronquitis crónica en adultos, justifica el estudio de la prevalencia del virus sincitial respiratorio en nuestro país (12).

Virus Sincitial Respiratorio.

Estructura del virión. El virus sincitial respiratorio pertenece al grupo de pneumovirus dentro de la familia Paramixoviridae. Es un virus pleomórfico de 150 a 300 nm de diámetro con una envoltura lipoprotéica esférica rugosa, la cual presenta en su superficie glicoproteínas denominadas "espículas" que participan en la unión y penetración del virus a la célula huésped (14). La nucleocápside es una hélice simétrica con un diámetro que va de 12 a 15 nm. En el interior de la nucleocápside se localiza el genoma viral constituido por una hebra sencilla de RNA no segmentada de polaridad negativa de 15,222 nucleótidos, con un peso molecular estimado de 5×10^6 a 5.62×10^6 kDa determinado con base a su movilidad electroforética y tomando en cuenta la sumatoria de los transcritos generados *in vivo* (14,15,16,17,18,19,20).

Proteínas estructurales. El virión está constituido por ocho proteínas (N, P, L, F, G, SH, M, 22K). En la nucleocápside se localizan N, P y L. La proteína N o de nucleocápside (pm 42.5 kDa), cuya función es fundamentalmente estructural, está fuertemente unida al RNA genómico (14). La proteína P o fosfoproteína de nucleocápside (pm 27.2 kDa), que está altamente fosforilada e involucrada al igual que la proteína L en transcripción y replicación del RNA viral y la proteína L de nucleocápside (pm 200 kDa), relativamente hidrofóbica (6). Existen tres proteínas de envoltura F, G y SH. La proteína F o de fusión (pm 68-70 kDa), media la liberación de la nucleocápside hacia el citoplasma, a través de la fusión de la envoltura lipoprotéica viral con la superficie de la membrana de la célula huésped, esta proteína es sintetizada como un precursor inactivo de 540 a 580 aa (Fo), el cual adquiere la actividad de fusión por una modificación post-traduccional mediada por enzimas proteolíticas de la célula infectada, produciendo dos subunidades F₂ (pm 20 kDa) y F₁ (pm 48 kDa) unidas a través de puentes disulfuro, que estabilizan la estructura tridimensional del complejo; ambas subunidades están N-glicosiladas (14). La proteína G (pm 84-90 kDa) de 298 aa, altamente glicosilada principalmente a través de uniones O-glicosídicas se encarga de mediar la unión del virus a la célula huésped, éstas proteínas son importantes en la inducción de anticuerpos neutralizantes (6,14). La proteína SH (pm 7.5 kDa) de carácter hidrofóbico, se encuentra intracelularmente a muy bajas concentraciones y se sugiere su participación en la fusión (6,22,23,24,63,67). Además tiene dos proteínas no glicosiladas, la proteína matriz (pm 28.7 kDa), localizada en la cara interna de la envoltura del virión, al parecer está involucrada en el reconocimiento envoltura-cápside durante el ensamblaje del virión y participa en la formación de la envoltura y una segunda proteína matriz o de membrana M2 ó 22K (pm 22 kDa), de la cual se desconoce la función; éstas últimas se caracterizan por ser moderadamente hidrofóbicas y relativamente básicas (6,14,21).

Proteínas no estructurales. En células infectadas se han detectado únicamente dos proteínas no presentes en el virión y corresponden a NS1 (1B, pm 14.7 kDa), NS2 (1C, pm 15.6 kDa). A diferencia de los otros Paramixovirus, éstas proteínas están codificadas por unidades génicas independientes (20,21). Aunque de las dos primeras no se han definido sus papeles funcionales, sus transcritos son sintetizados muy tempranamente, por lo que se sugiere que los productos génicos pueden estar involucrados en la modulación de la transcripción (21).

Mapa Genético.

El orden de los genes del virus sincitial respiratorio, así como, las secuencias intergénicas y secuencias flanqueantes se han establecido por el método de lectura transcripcional y mapeo por UV (25,64). Los resultados sugieren la presencia de un promotor único localizado en el extremo 3' (19). El tamaño de las secuencias intergénicas del virus sincitial respiratorio no es constante y varía de uno a cincuenta y cuatro nucleótidos. Las secuencias no son conservadas, excepto en los extremos 3' y 5' en donde se presenta una adenosina, así como tampoco su estructura primaria y secundaria, por lo que muy probablemente estas regiones no representan ninguna señal de reconocimiento para la polimerasa viral (6). El orden de transcripción corresponde del extremo 3' al 5' a: NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L (6,19,20,26).

Multiplicación Viral.

Unión y entrada. Son las fases iniciales de la infección. La interacción virus-célula es mediada por la proteína G, lo que se demostró por estudios realizados con anticuerpos monoespecíficos dirigidos contra la proteína G del virus sincitial respiratorio cepa Long, los cuales inhibieron la unión del virus a monocapas de células HeLa (65). Se cree que la unión se lleva a cabo muy probablemente a través del ácido siálico presente en el receptor de la célula huésped cuya naturaleza puede ser glicoproteico o glicolípido (27,28). Posterior a esta fase de unión, la envoltura del virión se fusiona a la membrana celular, lo cual permite la liberación de la nucleocápside del citoplasma, el proceso anterior es mediado por la proteína F (14,66).

Transcripción y Traducción. El proceso de transcripción es el paso inmediato a la liberación de la nucleocápside al interior del citoplasma. A partir del genoma viral se genera un RNA policistrónico [RNAm que codifica para más de una proteína], el cual probablemente sea procesado, produciendo 10 RNAm cuyos tamaños varían de 405 a 6500 nucleótidos (19). La generación de estos mensajeros independientes posiblemente se regula a nivel de transcripción a través de un mecanismo de señales de inicio y término, ubicadas en las uniones intergénicas. La presencia de secuencias consenso en estas uniones, las cuales son análogas a pequeñas secuencias involucradas en iniciación y terminación de la transcripción de DNA celular y genoma de virus de DNA, apoyan este mecanismo para la generación de 10 RNAm cada uno codificando para una proteína específica (14,29). Las secuencias correspondientes para inicio son CCCC/UGUUUA/U y término: UCAA/UUUUA/UA/UA/UUUU, cuya función es la de dirigir al complejo de la polimerasa viral durante la transcripción secuencial del RNA viral (6,30).

La síntesis de cada una de las proteínas virales, probablemente se lleva a cabo a partir de un solo marco de lectura. Sin embargo, es importante señalar que para la proteína M y M2 se ha encontrado un segundo marco de lectura que puede codificar para proteínas de 75 aa y 90 aa respectivamente, cuyos productos aún no han sido caracterizados (6,31).

Ensamblaje y liberación del virión.

A. Primera Fase.

El ensamblaje de la nucleocápside se lleva a cabo en el citoplasma; como primer paso, la unión de una estructura constituida por subunidades de proteínas y el genoma viral (RNA de cadena negativa), dando lugar al complejo ribonucleoproteico, al cual en un segundo paso se le unen el resto de las proteínas auxiliares de nucleocápside L y P.

B. Segunda Fase.

Las glicoproteínas F y G migran hacia la cara citoplásmica de la membrana celular, sustituyendo una gran proporción de proteínas celulares, posteriormente moléculas de proteína M se agregan a la región interna de la envoltura en formación a través de uniones no covalentes con las regiones citoplásmicas de las glicoproteínas.

C.Tercera Fase.

Las nucleocápsides migran hacia la superficie celular, donde se unen a la envoltura, constituyendo partículas virales completas (viriones), las cuales son liberadas por gemación (32).

Persistencia viral.

Las infecciones virales persistentes se clasifican en dos diferentes categorías: a) Infección crónica o productiva, en la cual el virus infeccioso está presente y puede ser aislado por métodos convencionales, durante todo el tiempo aunque la sintomatología no sea aparente. b) Infecciones latentes. En las cuales el genoma viral está presente pero por lo general no se produce virus infeccioso excepto durante episodios de reactivación que por lo general son intermitentes (61).

El establecimiento de una infección persistente requiere de dos factores, el primero de ellos es que el virus tenga una estrategia de replicación que asegure un fenotipo no lítico a través de: a)generar mutantes o variantes; b)disminuir la expresión de genes virales o sus productos y c) partículas virales defectuosas o incompletas. El segundo, es que el hospedero presente una respuesta inmune incapaz de reconocer y eliminar partículas virales y/o células infectadas. Los mecanismos que se han reportado son: a)evasión del sistema inmune; b)alterar las funciones biológicas de linfocitos y/o macrófagos y c)alterar la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

La infección persistente por virus de RNA, se lleva a cabo muy probablemente a través de un mecanismo basado en la reducción o control de la transcripción viral de genes virales específicos o bien de sus transcritos (33).

Infección persistente por el Virus Sincticial Respiratorio.

El establecimiento *in vitro* de una infección persistente por RSV ha sido reportado en líneas celulares no linfoides como HEp-2 (carcinoma de laringe humano); en la cual se observó un decremento en la producción de virus extracelular respecto a una infección aguda y un incremento de virus asociado a la membrana celular sin causar muerte celular (34). En células BS-C1 (riñón de mono verde *Cercopithecus aethiops*), los resultados de ensayos de centros de infección e inmunofluorescencia realizados en ésta línea persistentemente infectada indicaron que todas las células expresaban el genoma viral. Los cultivos fueron resistentes a superinfección por virus homólogos y por algunos heterólogos. En el sobrenadante se detectaron pequeñas cantidades de virus (.002 a .2 UFP/ml), los cuales formaban placas pequeñas. El cariotipo del cultivo con infección persistente no difiere de las células no infectadas, lo que sugiere que para que una infección persistente se establezca se requiere de alguna alteración del genotipo de la célula huésped y del viral (35). La línea persistentemente infectada Balb/C (fibroblastos transformados de ratón), presenta un alto porcentaje de células con espículas y antígenos ribonucleoproteicos virales y produce virus extracelular que se incrementa en forma dependiente al número de pases de 100 a 1000 UFP/ml (36).

Bangham y col. reportaron infección persistente por RSV en una línea celular de origen linfoide (BCL, células B de linfoma de ratón), la cual produce bajos niveles de virus infeccioso (3000UFP/ml), resultados similares fueron reportados por Fernie y col. (36,37).

La persistencia del virus en el cultivo celular pudo haber sido causada por mutaciones en el virus, o por cambios tanto en el virus como en la célula huésped, normalmente más de un factor es responsable de la persistencia (33).

Domurat y col. obtuvieron evidencia in vivo de infección persistente por RSV en linfocitos de pacientes infantiles que adquirieron RSV en forma natural (38). Goswami y col. demostraron por ensayos de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales que los paramixovirus pueden persistir en células de médula ósea (39). Por lo anterior se sugiere que el virus sincitial respiratorio puede causar infección persistente in vivo en linfocitos u otras células derivadas de médula ósea (37).

Macrófagos alveolares y su infección por el Virus Sincitial Respiratorio.

Los macrófagos alveolares son la primera línea de defensa contra patógenos inhalados y son expuestos al virus durante el curso de la infección. Las partículas virales modifican las funciones de los macrófagos alveolares, lo cual puede contribuir al riesgo de adquisición de infecciones bacterianas secundarias durante o después de la infección por el virus sincitial respiratorio u otros agentes virales (40).

Panuska y col., demostraron in vitro que macrófagos alveolares y periféricos expuestos a virus sincitial respiratorio expresaron proteínas virales, lo que indica que éstas células son permisivas a la infección. Así mismo (41), señalan con base a sus resultados que los macrófagos alveolares soportan todos los estadios del ciclo replicativo del virus sincitial respiratorio y producen virus infeccioso por más de 25 días. La infección por el virus sincitial respiratorio de los macrófagos alveolares puede alterar potencialmente importantes funciones biológicas sin alterar la viabilidad celular. Los mecanismos propuestos por los cuales los macrófagos alveolares soportan la replicación viral por más de dos semanas, incluyen la producción de partículas virales no infecciosas que requieren de virus homólogos infecciosos para su replicación, producción de mutantes termosensibles, factores celulares de resistencia viral, el equilibrio mantenido entre células infectadas y no infectadas, incapacidad de la célula huésped de procesar eficientemente glicoproteínas virales dando como resultado una producción viral reducida y producción de proteínas antivirales como el interferón que también reduce la producción viral (41).

N.M. Cirino y col., llevaron a cabo la caracterización de la subpoblación (clase II HLA-DR) de macrófagos alveolares permisiva a la infección por el virus sincitial respiratorio, a través de estudiar la replicación viral por célula, determinando las proteínas por medio de FACS (Fluorescence-Activated-Cell-Sorting) y por ensayo de centros de infección. (42). La replicación del RSV es reducida significativamente por el proceso de diferenciación in vitro que sufren los macrófagos alveolares y por tratamiento con TNF (Factor de Necrosis Tumoral). Los macrófagos alveolares fueron resistentes a la reinfección por el virus sincitial respiratorio a altas dosis virales debido probablemente a la diferenciación progresiva o bien posiblemente a mecanismos autocrinos o paracrinos de restricción de replicación del virus sincitial respiratorio mediado por TNF alfa. Por estudios in vitro se ha determinado que el TNF alfa puede promover la diferenciación de macrófagos, por lo que un posible mecanismo por el cual este factor puede restringir la

replicación del virus sincitial respiratorio, es através de aumentar o favorecer la diferenciación celular (43,44,45).

Evidencias experimentales en cobayos inoculados con el virus sincitial respiratorio humano vía intranasal demostraron que proteínas virales y RNA genómico pueden persistir en pulmón por al menos 60 días post-infección y tal persistencia en macrófagos alveolares puede contribuir a la patogénesis de una inflamación crónica bronquiolar (43).

La persistencia del virus sincitial respiratorio no se ha demostrado en forma concluyente, existen reportes como los estudios epidemiológicos de aislamiento y detección del virus sincitial respiratorio realizados en Estados Unidos de julio de 1990 a Julio de 1995. La detección y aislamiento del virus fue cercana a cero en los meses de junio a noviembre reapareciendo durante el periodo invernal (diciembre a marzo). Ya que posiblemente el humano es el único huésped natural del virus sincitial respiratorio se considera fuerte candidato a ser el reservorio donde permanece o persiste el virus durante los meses en los cuales su detección es mínima lo que nos hace suponer una fuerte evidencia de la persistencia viral (46). Figura 2.

Aislamiento e identificación del Virus Sincitial Respiratorio en Muestras Analizadas en Estados Unidos durante Julio 1990 - Julio 1995

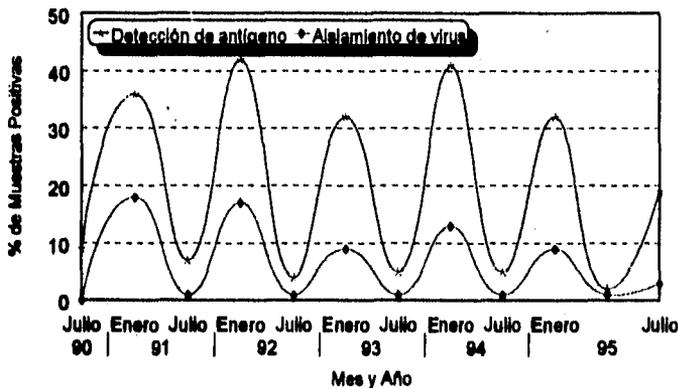


Fig. 2. Reporte de muestras positivas para RSV analizadas por métodos de detección de antígeno y aislamiento de virus en E.U.A. de Julio 1990 a Julio 1995.

En este estudio se pretende estudiar la expresión de proteínas de RSV en infecciones agudas y persistentes y para ello decidimos establecer un modelo *in vitro* de persistencia en la línea celular similar a macrófagos P388D1. Este modelo nos permitirá además, estudiar la interacción virus-célula, ya que por su naturaleza, ésta interacción no es factible estudiarla *in vivo*.

HIPOTESIS

LAS PROTEINAS VIRALES DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO QUE SE EXPRESAN DURANTE LA INFECCION AGUDA DE MACROFAGOS COINCIDEN CON LAS SINTETIZADAS EN LA INFECCION PERSISTENTE

OBJETIVO

DETERMINAR COMPARATIVAMENTE, EN CULTIVOS DE MACROFAGOS, LA EXPRESION DE PROTEINAS DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO EN INFECCION AGUDA Y PERSISTENTE.

MATERIAL Y METODOS

Células y Virus.

Células HEP-2, adquiridas de la ATCC (American Type Culture Collection). Es una línea aislada originalmente de carcinoma epidermoide de laringe de humano. Estas células se propagaron en medio mínimo esencial (MEM), suplementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF) previamente inactivado a 56°C durante 30 minutos, antibióticos (100 UI penicilina G/ml, 100 mg/ml de estreptomocina y nistatina al 1%, al cual denominaremos MEM_c (MEM completo)

Células P388D1, adquiridas de la ATCC (American Type Culture Collection). Es una línea celular similar a macrófagos aislada originalmente de neoplasma linfoide (P388) de ratón DBA/2, y donada a nuestro laboratorio por el Dr. A. Tingle. Estas células se propagaron en RPMI 1640, suplementado con 10 % de SBF, antibióticos (100 UI penicilina G/ml, 100 mg/ml de estreptomocina).

Cepa Long del Virus Sincitial Respiratorio (RSV), donada al laboratorio por el Dr. Michael Trudel (Instituto Armand Frappier, Ville de Laval, Canadá).

Propagación del Virus

Monocapas de células HEP-2 semiconfluentes crecidas en botellas de 162 cm² se infectaron con el virus sincitial respiratorio previamente purificado por placa a una multiplicidad de infección de 0.5 en MEM suplementado con 1% de SBF. Después de una hora de adsorción a 37°C, se retiró el sobrenadante y se reemplazó con medio fresco al 2.0% de suero bovino fetal y 1% de antibióticos al cual denominaremos MEM_i (MEM para infectar). Los sobrenadantes fueron colectados a las 24 y 48 horas post-infección. Los restos celulares fueron eliminados por centrifugación a baja velocidad (1500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente). Para la estabilización de la infectividad del virus se añadió MgSO₄ a una concentración final de 0.1 M (36).

Concentración y purificación del virus.

La suspensión viral obtenida en el paso anterior se concentró con 6 % de Polietilenglicol [PEG 6000 SIGMA Cat. P-2138] (54) durante 18 a 24 horas a 4°C; posteriormente se centrifugó a 9500 rpm una hora a 4°C, en un rotor 45 Ti. El botón se resuspendió en 7 ml de TNE (50 mM TRIS-HCl, pH 7.5; 0.1 M NaCl, 10mM EDTA), el sobrenadante se reprecipitó y se obtuvo un segundo botón que se resuspendió en 4 ml de TNE. La presencia del antígeno viral se determinó por ensayo inmunoenzimático (ELISA) y titulación de la infectividad en células HEP-2 que se expresó en TCID₅₀/ml.

El virus concentrado se purificó por un gradiente lineal de sacarosa 20-60 % (16,17), se centrifugó a 25000 rpm durante 6 horas a 4°C en un rotor SW27. Se colectó la fracción que presentó banda visible así como las dos anteriores y dos posteriores a ésta y se titularon en células HEP-2

Titulación de la infectividad viral en células HEp-2.

La suspensión viral se diluyó en serie 1:3 en MEM_i (35ul/70ul) y se utilizaron 50ul de cada dilución para infectar monocapas semiconfluentes de células HEp-2, crecidas en placas de 96 pozos y dejando adsorber durante una hora a 37 °C. Posteriormente se retiró el inóculo y se reemplazó por 150 ul de MEM_i incubando hasta observar efecto citopático, lo que ocurre después de 3 a 4 días a 37 °C. Cada ensayo se realizó por cuatruplicado y el título se determinó por TCID₅₀ utilizando para ello la fórmula de Käber (47):

$TCID_{50} = -\Delta + [-1 (s - \frac{1}{2})]$ donde:

Δ = última dilución donde todos los pozos presentan efecto

S= Suma de los % de todas las diluciones donde se presentó efecto citopático (100% a 0%).

Obtención de anticuerpos.

Se inmunizaron conejos Nueva Zelanda de 2.5-3.0 Kg de peso con un volumen de 150ul a 200ul de virus purificado cuyo título era de 4.3×10^4 TCID₅₀/ml y con un contenido de 200 a 300 ug de proteína. Se aplicaron tres inyecciones subcutáneas a intervalos de 21 días; utilizando adyuvante completo de Freund en la primera aplicación e incompleto en las dos siguientes. Los anticuerpos obtenidos fueron purificados en columna de afinidad de sefarosa acoplada a proteína A y titulados por neutralización. El título se expresó en TCID₅₀/ml neutralizados

Determinación del título de anticuerpos neutralizantes (Microneutralización).

El título de anticuerpos neutralizantes se determinó de dos maneras: 1) La suspensión viral con un título de 2.8×10^8 TCID₅₀/ml se diluyó en serie 1:3 en medio Dulbecco suplementado con 2.5% de SBF en una proporción de 35ul/70 ul; 50 ul de cada una de las diluciones se mezclaron con un volumen igual de suero hiperinmune sin diluir, se incubaron 60 minutos a 37°C. Se añadieron 50 ul de la mezcla virus-anticuerpo a monocapas de células HEp-2 propagadas en placas de 96 pozos, se dejaron adsorber durante 2 horas a 37°C, después de éste tiempo el inóculo se retiró y se reemplazó por 150 ul de medio Dulbecco con 2.5% de SBF, se incubó a 37°C hasta observar efecto citopático y el título se expresó como la última dilución donde no se observa efecto citopático. 2) Se realizaron diluciones seriadas del suero hiperinmune 1:3 en el medio anteriormente descrito, a 50 ul de cada dilución se le agregaron 50 ul de la suspensión viral sin diluir (2.8×10^8 TCID₅₀/ml) y se continuó de acuerdo al procedimiento anteriormente descrito. Cada ensayo se realizó por duplicado (48).

Cromatografía de Afinidad. Proteína A-Sepharosa.

La proteína A se hidrató en una proporción de 1 gramo en 4 ml de H₂O desionizada para una columna de 7 ml, la cual se montó en una jeringa de 20 ml. La columna se lavó con 40 ml de amortiguador de fosfatos 0.5 M pH 8.0 (fosfato monobásico de sodio 0.5 M, fosfato dibásico de sodio 0.5 M), seguido por un lavado con 20 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 8. Se aplicó la muestra y se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Se eluyó con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 8 hasta obtener una densidad óptica de cero (280 nm) en las fracciones recogidas (1ml). Se eluyeron las IgG's (Inmunoglobulinas clase G) tratando con ácido acético 0.1

M/NaCl 0.15 M. Las fracciones colectadas se leyeron a 280 nm en un espectrofotometro y se trabajó con las que dieron valores de densidad óptica entre 1.241- 2.172. Se juntaron las fracciones y se ajustó el pH a 7 con PBS 10X. Se lavó la columna con amortiguador de fosfatos 0.5 M pH 8 y se dejó con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 8. La mezcla de fracciones se dializó contra PBS pH 7.4 y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry obteniéndose un valor de 2.6 mg/ml. La composición protéica de la mezcla se analizó en geles de acrilamida al 10% en condiciones reductoras (49,50).

Ensayo inmunoenzimático.

Se sensibilizaron placas de 96 pozos para EIA/RIA añadiendo 100 ul/pozo (.06 mg de proteína) de suspensión viral e incubando a 4°C durante toda la noche. Se lavó 3 veces, durante 3 minutos por cada lavado con PBS con Tween 20 al 0.05% y Albúmina Sérica Bovina (ASB) al 0.1% (PBS-T20). Se bloqueó con 150 ul de PBS con ASB al 1% (PBS-ASB), durante 90 minutos a 37°C. Se lavó 3 veces con PBS-T20, durante 3 minutos por cada lavado. Se adicionaron 200 ul de anticuerpo anti-RSV a una dilución de 1:100 en PBS-ASB al 0.5% (PBS-ASB 0.5%) se incubó durante 60 minutos a 37°C. Se lavó 3 veces con PBS-T20, durante 3 minutos por cada lavado. Se adicionaron 100 ul del conjugado anti-IgG de conejo-peroxidasa a una dilución de 1:1000 en PBS-ASB 0.5%, se incubó durante 60 minutos a 37°C y se lavó con PBS-T20, durante 3 minutos por cada lavado. Se adicionaron 100 ul del sustrato, orto-fenilendiamina al 0.04% en Tris-HCl 0.5 M, pH 7.6 con H₂O₂ al 0.05%. La reacción se dejó de 20-30 minutos y se detuvo con 50 ul/pozo de H₂SO₄ 0.3 N. Se leyó la absorbancia a 492nm en un lector de ELISA.

Extractos celulares.

Los extractos celulares se obtuvieron de macrófagos P388D1 con infección aguda o persistente, así como, de macrófagos control sin infectar, propagados como se describió en material y métodos. Para cada ensayo se utilizaron macrófagos de 3 cajas petri (1.5x10³ células/ml por caja) de 60 mm², se rasparon y centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. El botón celular se resuspendió en un amortiguador de lisis a 4°C (10mM TRIS-HCl pH 7.5; 140 mM NaCl; 1% Triton X-100; 1% Desoxicolato de sodio). La suspensión celular se agitó en vórtex durante 30 segundos, para posteriormente centrifugarla durante 5 minutos a 15000g en una microfuga Eppendorf, el sobrenadante se recuperó y se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry.

Inmunofluorescencia.

La inmunofluorescencia indirecta se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Garcia-Barreno y col.(48). Los macrófagos P388D1 persistentemente infectados se crecieron durante 24 horas a 37°C en cámaras para inmunofluorescencia previamente tratadas con 500 ul de polilisina a una concentración de 10ug/ml durante 20 minutos a temperatura ambiente y lavadas una vez con PBS estéril. Las células se fijaron con metanol a -20 °C durante 5 minutos y con acetona a -20 °C durante 30 segundos. Después de que se dejó secar al aire, la preparación se bloqueó toda la noche a 4°C con suero de caballo. Posteriormente, se lavaron las células con PBS y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con el primer anticuerpo [inmunoglobulinas clase G (IgG's)] purificado a una dilución de 1:100 en PBS-ASB al 0.25%. Transcurrida la incubación, se lavó la preparación dos veces con PBS por diez minutos y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con el conjugado anti-Ig de conejo unido a fluoresceína como segundo

anticuerpo. Después de éste tiempo de incubación, se lavaron tres veces las células con PBS durante diez minutos y finalmente se hizo un lavado abundante con agua destilada. Como control se usaron células no infectadas las cuales se procesaron en forma paralela.(51).

Infección aguda en macrófagos P388D1.

Se infectaron macrófagos P388D1 a una multiplicidad de infección de 10 en presencia de RPMI 1640 con SBF al 1% y se mantuvieron durante 96 horas a 37 °C en el mismo medio suplementado con 3% de SF. Se determinó viabilidad celular por la técnica de exclusión de azul tripano y se tituló la infectividad del sobrenadante en células HEp-2, los títulos se expresaron en TCID50/ml. Los extractos celulares se obtuvieron a las 24, 48, 72 y 96 horas post-infección.

Infección persistente en macrófagos P388D1.

Para el establecimiento de la infección persistente, se infectaron macrófagos P388D1 con el virus sincitial respiratorio a una multiplicidad de infección de 0.001 en presencia de 1% de SBF en RPMI 1640. Se dejó adsorber durante dos horas a 35°C, se retiró el medio y se reemplazó por medio fresco al 1% de SBF y se incubaron 24 horas a 35°C. Posteriormente, los pases sucesivos se mantuvieron en presencia de 10% de SBF. Los pases se realizaron 2 a 3 veces por semana. La presencia del virus sincitial respiratorio en los cultivos persistentes se determinó a través de ensayos de inmunofluorescencia indirecta con suero policlonal para la detección de antígeno celular y de virus extracelular por titulación de la infectividad en células HEp-2. Se obtuvieron extractos celulares de diez diferentes pases.

Superinfección.

Los cultivos persistentes se superinfectaron con RSV a una multiplicidad de infección de 10, en presencia de 1 % de SBF a 35°C durante 24 horas. Se determinó el porcentaje de células viables por exclusión de azul tripano. Las células que sobrevivieron continuaron subcultivándose. Se obtuvieron extractos celulares de 8 diferentes pases.

SDS-PAGE. Inmunoblot.

Las proteínas de los extractos celulares de macrófagos P388D1 con infección aguda se separaron en geles SDS-poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras [1% de mercaptoetanol] y corriendo 60 ug de proteína por carril (52). Posteriormente fueron transferidas a papel de nitrocelulosa durante 30 minutos a 500mA (53). Las proteínas virales transferidas se revelaron con anticuerpos anti-RSV purificados (1mg/ml) a una dilución 1:10 en PBS con Tween 20 al 0.3%. Como segundo anticuerpo se utilizó un conjugado anti-IgG de conejo unido a peroxidasa a una dilución 1:250 en PBS-Tween 20 al 0.3%. Como sustrato 4-cloronaftol en Tris-HCl 10mM/NaCl 0.14 M pH 7.5 y metanol al 20% previamente enfriado a -20 °C con 0.04% de H₂O₂. En el caso de la detección de proteínas virales de macrófagos persistentes y superinfectados la incubación con anticuerpos anti-RSV se llevó a cabo toda la noche a temperatura ambiente con agitación.

Determinación de peso molecular.

La determinación del peso molecular de las bandas de proteínas obtenidas en los inmunoblots de cada uno de los diferentes pases del cultivo persistente y superinfectado se llevó a cabo con base al cálculo de la movilidad relativa de las proteínas denominado R_f . El cálculo del R_f se realizó midiendo la distancia recorrida por cada una de las bandas de los pesos moleculares de referencia (macroglobulina 191 kDa, galactosidasa 117 kDa, fructosa 6-fosfato cinasa 91.8 kDa, piruvato cinasa 72.7 kDa, fumarasa 57.8 kDa, deshidrogenasa láctica 40.8 kDa, triosa fosfato isomerasa 34.1 kDa), el valor obtenido se divide entre la distancia recorrida por el frente del gel. En cada ensayo se corrieron los estándares de peso molecular. Con estos valores se hizo una curva estándar graficando el \log_{10} del peso molecular contra el R_f . Se determina el valor de R_f para las bandas problema y se extrapoló en la curva estándar (54). (Figura 3).

CURVA ESTANDAR DE PESOS MOLECULARES

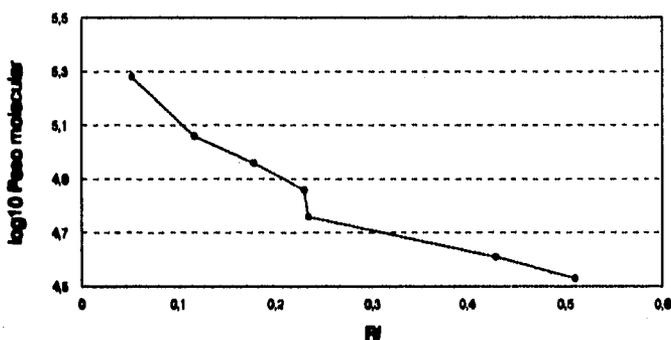


Figura 3. La determinación de peso molecular (PM) se llevó a cabo en base al cálculo de la movilidad relativa de las proteínas (R_f). El cálculo del R_f se realizó midiendo la distancia recorrida por cada una de las bandas de los pesos moleculares dividido por la distancia recorrida por el frente del gel.

RESULTADOS.

Concentración y Purificación del virus sincitial respiratorio.

La suspensión viral utilizada para la concentración y purificación de virus tenía un título de 2.5×10^8 TCID₅₀ en un volumen total de 225 ml. Se precipitó con polietilén glicol (PEG 6000), de acuerdo a lo descrito en material y métodos. Se obtuvieron 2 fracciones: la A recuperada de la primera precipitación de la suspensión viral, la cual se resuspendió en 7 ml de TNE, el sobrenadante se reprecipitó y se obtuvo la fracción B que se resuspendió en 4ml de TNE. El rendimiento total con respecto a la infectividad fue del 62%. Se determinó la presencia de antígeno por ELISA en las fracciones precipitadas así como en el sobrenadante.

Las fracciones A y B, presentaron un título de 2.2×10^7 TCID₅₀/ml y 1.3×10^5 TCID₅₀/ml respectivamente. La fracción A se sometió a centrifugación en un gradiente de sacarosa 20-60% obteniéndose 8 subfracciones y un precipitado, los cuales se titularon en células HEp-2. La banda correspondiente al virus se encontró en la subfracción 5 con un título de 1.3×10^5 TCID₅₀/ml las dos subfracciones anteriores no presentaron título y en las dos posteriores los títulos fluctuaron desde 1.45×10^4 TCID₅₀/ml hasta 4.37×10^4 TCID₅₀/ml, obteniéndose un rendimiento final del 20%, este valor concuerda con lo reportado por Lambert y col. 1980 quienes señalan un porcentaje de recuperación de la infectividad del 18.1% (16).

Determinación del título de anticuerpos neutralizantes.

En la fracción de IgG's purificadas se encontró un título de anticuerpos neutralizantes correspondiente a 4.74×10^3 TCID₅₀/ml neutralizadas, éste valor fue 5 logaritmos menor que el obtenido con el suero sin purificar (2.8×10^8 TCID₅₀/ml neutralizadas), pensamos que esto se debió a problemas en el pH durante el proceso de purificación.

Cinética de Infección e Inmunotransferencia de macrófagos P388D1 con infección aguda.

La cinética de infección en macrófagos P388D1 se llevó a cabo empleando una multiplicidad de infección de 10 (de acuerdo a como se señala en material y métodos), determinándose la viabilidad celular y el título viral en células HEp-2 en cada punto de la cinética de infección. Como se observa en la figura 4, la disminución en la viabilidad celular a 24 horas post-infección (p.i.) se correlaciona con el incremento en la producción de virus extracelular en cada punto de la cinética. Simultáneamente se analizaron macrófagos P388D1 no infectados como control y se determinó que bajo las mismas condiciones de 3% de suero fetal no había multiplicación celular durante el período de 24 a 72 horas (1×10^6 células/ml- 1.068×10^6 células/ml) y solo a las 96 horas se observó incremento significativo en el número de células (2.960×10^6 células/ml), lo que nos indicó que la muerte celular determinada en los macrófagos P388D1 con infección aguda durante la cinética de infección muy probablemente se debe al efecto del virus.

CINETICA DE INFECCION MOI 10

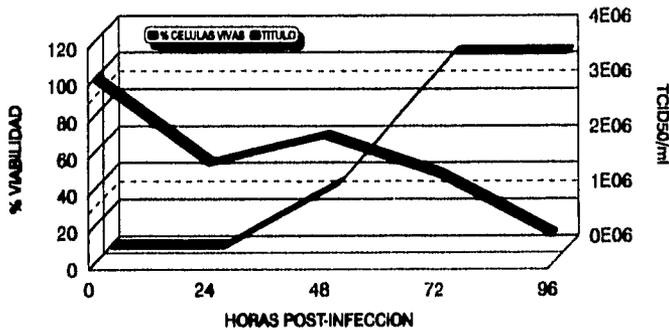


Fig. 4. Cinética de infección en la línea de macrófagos P388D1. Macrófagos P388D1, se infectaron a una multiplicidad de infección de 10. Se determinó el título por TCID50 y la viabilidad celular por exclusión de azul tripano en cada punto de la cinética (24, 48, 72 y 96 horas post-infección).

La identificación de proteínas virales en macrófagos P388D1 con infección aguda se llevó a cabo por inmunotransferencia. Se obtuvieron extractos celulares a las 24, 48, 72 y 96 horas post-infección. Paralelamente se corrió un control de macrófagos P388D1 sin infectar.

A las 24 horas post-infección no se observaron proteínas virales en los macrófagos P388D1 infectados; a las 48 y 72 horas p.i. se detectaron las proteínas G (80.4 kDa), F1 (47.7), N (43.5 kDa) y P (27.1 kDa); a las 96 horas p.i. se detectaron únicamente G y F1 (48.0 kDa), esto debido probablemente a que a tiempos prolongados de infección las células infectadas mostraron una reducida síntesis de proteínas (54). Los resultados se muestran en la tabla 2 y en la figura 5.

HORAS POST-INFECCION	PROTEINAS VIRALES			
	N	P	F1	G
24	ND	ND	ND	ND
48	+	+	+	+
72	+	+	+	+
96	ND	ND	+	+

N (43.5 kDa), P (27.6 kDa); F1 (47.7 kDa) y G (80.4 kDa)

+. Presencia de proteínas virales.

ND. No se detectaron.

Las proteínas L, M y 22K no se identificaron en ningún punto de la cinética.

Los pesos moleculares determinados en el ensayo difirieron de los reportados en aproximadamente 1 kDa debido al cálculo de Rf.

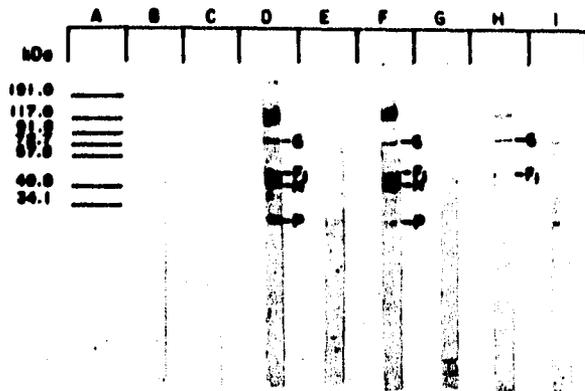


Figura 5. Inmunotransferencia de proteínas obtenidas de macrófagos P388D1 con infección aguda por RSV. Monocapas semiconfluentes de macrófagos P388D1 (1.4×10^6 células/ml) se infectaron con virus sincitial respiratorio a una MOI de 10. Se prepararon extractos celulares, las proteínas se separaron en gels SDS-acrilamida al 10% en condiciones reductoras, se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se revelaron con anti-RSV como primer anticuerpo y anti-IgG unido a peroxidasa como segundo anticuerpo. Estándar de pesos moleculares (línea A), líneas B, D, F y H: 24, 48, 72 y 96 horas p.i. Líneas C, E, G e I: control no infectado 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo.

Cultivo Persistente.

El cultivo persistente de macrófagos P388D1 se estableció a una multiplicidad de infección de 0.001 con el virus sincitial respiratorio, de acuerdo a lo señalado en material y métodos. El seguimiento de la persistencia del virus sincitial respiratorio en el cultivo se hizo por la detección de antígeno viral por inmunofluorescencia y del virus extracelular por titulación en células HEP-2. El ensayo de inmunofluorescencia se llevó a cabo en diferentes pases comprendidos del 1 al 36. En la figura 6 se demuestra la presencia de antígeno viral en la superficie de los macrófagos persistentemente infectados del pase 24.

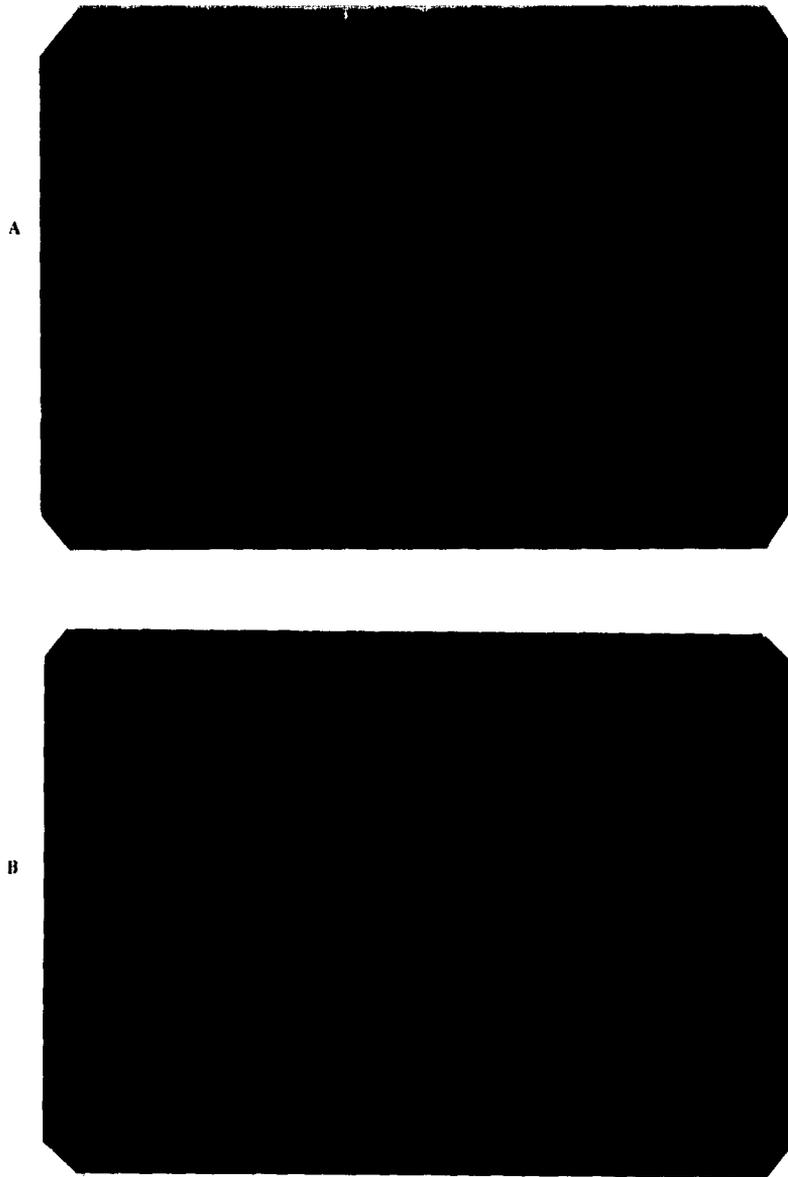


Figura 6. Detección de RSV por inmunofluorescencia en macrófagos P388D1 persistentemente infectados. Macrófagos persistentemente infectados se crecieron en cámaras para inmunofluorescencia durante 24 horas a 37°C. (A) Macrófagos persistentes, (B) Macrófagos control (células no infectadas). Los complejos inmunes se desarrollaron con un conjugado anti-conejo-fluorescencado.

Los títulos obtenidos a lo largo de 35 pases fluctuaron desde 6×10^1 hasta 1.3×10^3 TCID₅₀/ml. A partir del pase 36 al 47 no se detectó virus extracelular. Como lo muestra la figura 7.

PERSISTENCIA VIRAL MOI 0.001

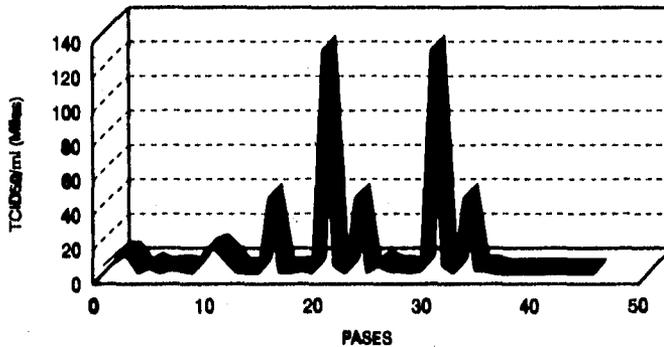


Fig. 7. Persistencia viral en macrófagos P388D1. Se estableció la persistencia viral con el virus sincitial respiratorio a una multiplicidad de infección de .001 en la línea de macrófagos P388D1.

Detección de proteínas virales por inmunotransferencia en macrófagos persistentemente infectados

La presencia de proteínas virales en los cultivos persistentes (P) que no producían virus extracelular, se investigó por inmunotransferencia. Se trabajó con cultivos del pase 37 al 47 los cuales se denominaron (P1-P10) por facilidad de nomenclatura.

La expresión de proteínas virales de los pases P1-P10, se presentan en la tabla 3 y figura 8. P10 fue el único pase en el cual no se detectó ninguna proteína.

PASES	PROTEÍNAS VIRALES			
	N	P	F1	G
P1	ND	+	+	+
P2	ND	+	+	+
P3	ND	+	+	ND
P4	ND	+	+	+
P5	ND	+	+	ND
P6	ND	ND	+	+
P7	ND	+	+	+
P8	ND	+	+	+
P9	ND	+	+	+
P10	ND	ND	ND	ND

P (25.7 kDa), F1 (47.7 kDa) y G (80.4 kDa)

P1-P10. Pases persistentes.

+. Presencia de proteínas virales.

ND. No se detectaron.

Las proteínas L, M y 22K no se identificaron en ninguno de los pases analizados. Los pesos moleculares determinados en el ensayo difirieron de los reportados en aproximadamente 1 kDa debido al cálculo de Rf.



Figura 8. Inmunotransferencia de proteínas obtenidas de macrófagos persistentemente infectados. Se prepararon extractos celulares de 10 diferentes pases de macrófagos P388D1 persistentemente infectados con virus sincitial respiratorio, las proteínas se separaron en gels SDS-acrilamida al 10% en condiciones reductoras, se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se revelaron con anti-RSV como primer anticuerpo y anti-IgG peroxidado como segundo anticuerpo. Estándar de pesos moleculares (línea A), P1 (línea B), P2 (línea C), P3 (línea D), P4 (línea E), P5 (línea F), P6 (línea O), P7 (línea H), P8 (línea I), P9 (línea J), P10 (línea K), macrófagos P388D1 con infección aguda 72 horas post-infección (línea L), control de macrófagos P388D1 no infectados (línea M).

Detección de proteínas virales por inmunotransferencia en macrófagos superinfectados.

Con la finalidad de disminuir el número de células no infectadas en el cultivo persistentemente infectado se superinfectó con una multiplicidad de infección de 10 tanto cultivos control de macrófagos no infectados como ocho diferentes pases del cultivo persistentemente infectado (S1-S8). Al medir muerte celular encontramos que en los cultivos control a las 24 horas la mortalidad fue de 52% y a las 48 hrs. de 65%. En los diferentes pases del cultivo persistente sometidos a superinfección la muerte celular fue de de 16 a 18%. Estos datos nos podrían indicar que el 80% de la población celular de estos cultivos estaba ya infectada y no fue susceptible a la infección. Los resultados se muestran en la tabla 4.

	MACRÓFAGOS P388D1 MOI = 10	MACRÓFAGOS SUPERINFECTADOS
24 hrs. post-infección	52%	18%
48 hrs. post-infección	65%	16%

El ensayo de superinfección se llevó a cabo a una multiplicidad de infección de 10. El porcentaje de muerte celular se calculó con base al número de macrófagos P388D1 (5.1×10^5 células/ml) en el tiempo cero.

Interesante fue la observación que los ocho cultivos persistentes superinfectados (S1-S8) que no producían virus extracelular antes de la superinfección, después de ésta se detectó nuevamente virus extracelular. Sin embargo, después del pase 10 y 12 para los pases S5 y S7 respectivamente ya no se detectó virus extracelular. Los resultados se muestran en la figura 9. En el resto de los cultivos superinfectados el título de virus extracelular cayó a cero después del cuarto o quinto pase (los datos no se muestran).

SUPERINFECCION MOI 10

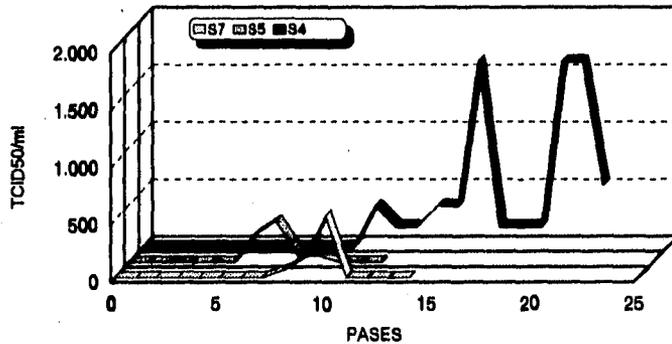


Fig. 9. Superinfección de macrófagos persistentemente infectados. Los pases de macrófagos persistentemente infectados que no producían virus extracelular se sometieron a superinfección con el virus original a una multiplicidad de infección de 10.

Se analizó la síntesis de proteínas virales en los ocho cultivos persistentes superinfectados (S1-S8) por inmunotransferencia. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5 y en la figura 10.

PASES	P	F1	G	22K
S1	+	+	+	+
S2	+	ND	ND	ND
S3	ND	ND	+	ND
S4	+	+	+	+
S5	+	ND	ND	ND
S6	ND	+	+	ND
S7	+	+	+	+
S8	+	+	+	+

P (27.1 kDa); F1 (48.0 kDa); G (80.4 kDa) y 22K (22.2 kDa)

S1-S8. Pases superinfectados.

ND. No se detectaron.

+. Presencia de proteínas.

Las proteínas L, N y M no se detectaron en ninguno de los pases superinfectados.

Los pesos moleculares determinados en el ensayo difirieron de los reportados en aproximadamente 1 kDa debido al cálculo de Rf.

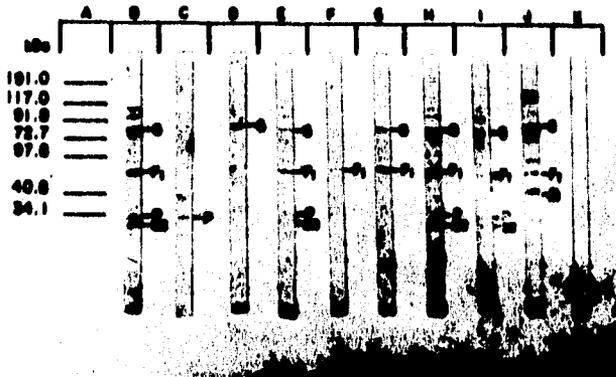


Figura 10. Inmunotransferencia de proteínas obtenidas de macrófagos superinfectados. Se prepararon extractos celulares de macrófagos P388D1 superinfectados a una MOI de 10 con virus sincitial respiratorio, las proteínas se separaron en geles SDS acrilamida al 10% en condiciones reductoras, se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se revelaron con anti-RSV como primer anticuerpo y anti-IgG peroxidado como segundo anticuerpo. Estándar de pesos moleculares (línea A), S1 (línea B), S2 (línea C), S3 (línea D), S4 (línea E), S5 (línea F), S6 (línea G), S7 (línea H), S8 (línea I), macrófagos con infección aguda (línea J) y control de macrófagos P388D1 no infectados (línea K).

La tabla 6 compara y resume brevemente el patrón de síntesis de proteínas virales en el ensayo de infección aguda, persistente y superinfectado

Proteínas Virales	Macrófagos P388D1 en Infección Aguda	Cultivo Persistente	Cultivo Superinfectado
G	+	+	+
F1	+	+	+
N	+	ND	ND
P	+	+	+
22K	ND	ND	+

+ Presencia de proteínas virales.
ND. No se detectaron.

DISCUSION.

El objetivo de éste trabajo fue el de analizar comparativamente la síntesis de proteínas virales en macrófagos P388D1 con infección aguda vs diferentes pases del cultivo de macrófagos persistentemente infectado y superinfectado con el virus sincitial respiratorio. Los resultados obtenidos en este trabajo, demostraron la síntesis continua de proteínas virales en diferentes pases del cultivo persistentemente infectado así como del superinfectado. Aunque es importante señalar que las proteínas virales expresadas difieren entre los pases persistentes y los pases superinfectados, principalmente en la expresión de la proteína 22K, identificada únicamente en los pases superinfectados; ya que las proteínas G, F1 y P fueron comunes en ambos ensayos.

Los sobrenadantes del cultivo persistente se titularon a lo largo de 47 pases; en los primeros 35 pases encontramos fluctuaciones de 6×10^1 hasta 1.3×10^5 TCID50/ml. A partir del pase 36 y hasta el 47 no se detectó virus. La ausencia de virus extracelular en estos pases puede deberse a partículas defectuosas generadas durante la persistencia e involucradas en el establecimiento y mantenimiento de una infección persistente y que pueden interferir en la detección por infectividad del virus extracelular (62). Sin embargo, a pesar de la ausencia de virus infeccioso extracelular a partir del pase 36 fue posible identificar, por inmunotransferencia, 3 proteínas virales estructurales (G, F1 y P) en pases posteriores, lo cual demostró la persistencia del virus en el cultivo.

De la cinética de expresión de proteínas virales en la infección aguda a una multiplicidad de infección de 10 y en ausencia de suero fetal, no se obtuvieron resultados satisfactorios debido a la pronta muerte celular no nos permitió continuar por el tiempo necesario y por lo tanto definir si la muerte celular se debió a la ausencia de suero fetal o al efecto del virus sobre éstas. Con base a los resultados reportados en experimentos hechos con macrófagos alveolares humanos a una multiplicidad de infección de 3 y en presencia de 3% de suero fetal para mantenimiento de las células decidimos infectar bajo las mismas condiciones a los macrófagos P388D1 (41). La viabilidad celular fue en promedio de 82%, durante las 96 horas de la cinética de infección; sin embargo la expresión de proteínas virales analizadas por inmunotransferencia fue mínima. Se decidió entonces infectar a una multiplicidad de infección de 10 y mantener las células durante toda la cinética de infección aguda en presencia de 3% de suero fetal. La viabilidad disminuyó en forma proporcional al tiempo post-infección y se observó sólo una calda significativa a las 96 horas post-infección (15.07%), lo cual nos permitió evaluar satisfactoriamente en cada punto de la cinética la síntesis de proteínas y fue posible además identificar por inmunotransferencia bandas correspondientes a proteínas virales del virus sincitial respiratorio.

Nuestro estudio se basó en el análisis comparativo del patrón de síntesis de proteínas virales estructurales en un cultivo persistente, superinfectado y con infección aguda. Bajo nuestras condiciones de trabajo fue posible identificar 5 proteínas virales estructurales (G, F1, N, P y 22K) de un total de 7 que constituyen al virion en concordancia con otros estudios reportados (11,55). En nuestro estudio no se determinó cual de las proteínas virales estructurales fue la primera en aparecer debido a que los tiempos seleccionados para la cinética de infección aguda fueron muy amplios y lo único que nos permitió establecer fue una diferencia en el patrón de síntesis de proteínas en cada uno de los puntos (24, 48, 72 y 96 horas post-infección). Algunos autores (57, 58) reportan a la proteína N como la primera en aparecer, seguida de P y M. En el caso del cultivo persistente y el superinfectado no se estableció un tiempo específico para la obtención de

los extractos celulares utilizados en el análisis del patrón de síntesis de proteínas por lo que tampoco se determinó una cinética de aparición de las proteínas virales.

Durante la infección aguda solo se identificaron cuatro proteínas virales: G, F1, N y P. A las 24 hrs. no encontramos ninguna proteína viral debido probablemente a que las condiciones de nuestro ensayo no fueron lo suficientemente sensibles. A las 48 y 72 hrs. encontramos el mismo patrón de expresión (N, P y G), y finalmente a las 96 hrs. solo se observan 2 proteínas G y F1.

A partir de las 48 hrs se observaron bandas de alto peso molecular, no correspondientes a los previamente reportados y que son específicos de los cultivos infectados ya que no aparecen en los controles de células no infectadas. Estas proteínas pudieran ser precursores no procesados de algunas de las proteínas virales o proteínas que hayan sufrido modificaciones (e.g. glicosilaciones, fosforilaciones, etc.).

La síntesis de proteínas virales durante la infección persistente después de que ésta deja de producir virus extracelular se caracterizó por la expresión de 3 de ellas (G, F1 y P). En el pase P3 solo se identificaron F1 y P y en el pase P10 no se identificó ninguna proteína. Estos resultados pueden explicarse con base a que los pases analizados proceden de líneas persistentes independientes por lo que el patrón de expresión de proteínas virales haya sido diferente; en el caso específico de P10 la ausencia de virus extracelular y de proteínas virales nos hace suponer que probablemente en este pase se haya perdido la persistencia viral. En 9 de 10 pases analizados, la única proteína no identificada en los macrófagos persistentes en relación a los de una infección aguda correspondió a N. Es importante señalar que a pesar de que en estos pases no se detectó virus extracelular, si fue posible identificar al menos 3 proteínas virales. Los resultados obtenidos en éste análisis apoyan la presencia de RSV en forma persistente en los macrófagos, sin determinar exactamente el mecanismo a través del cual el virus es capaz de persistir.

La expresión de las proteínas virales difiere significativamente entre los ocho pases superinfectados (S1-S8) analizados debido en primer lugar a que son pases independientes entre si y que además no se encontraban sincronizados en su ciclo celular, razones por las que probablemente el patrón de expresión de proteínas virales haya sido diferente; en segundo lugar en este ensayo no se realizó una cinética de la síntesis de proteínas virales que nos hubiera permitido definir paso a paso y en forma más exacta si además de las proteínas que se identificaron los pases sintetizaban y expresaban al resto de las proteínas virales que bajo nuestras condiciones no se observaron y en tercer lugar la producción de virus extracelular varió entre los pases lo que nos hizo suponer que esto pudo influir en el número de proteínas expresadas. Resultan interesantes las observaciones de que en ninguno de nuestros cultivos se identificó a la proteína L y de que en los cultivos superinfectados no se haya detectado la proteína N, ya que junto con las proteínas P y L constituyen la maquinaria de replicación, transcripción del genoma viral y regulación de la expresión (14). Podríamos proponer que el que la proteína L no se haya identificado se debió a que la regulación transcripcional de la concentración de RNA mensajeros en los paramixovirus, está determinada por el orden de éstos a lo largo del genoma viral, esto es que la eficiencia de transcripción disminuye en forma directamente proporcional a la distancia del gen con respecto al extremo 3'; el gene L se localiza en el extremo 5' del genoma del virus sincitial respiratorio, por lo que la concentración de RNA mensajero correspondiente a éste gen es considerablemente menor (100 veces), respecto a los genes N y P, lo cual se ve reflejado directamente en la composición de la nucleocápside L:N:P: en una proporción de 1:100:100. Además podría participar el fenómeno de la atenuación de la expresión de genes, por la presencia de señales de término de un gen comprendida dentro de otra secuencia génica. Este mecanismo está claramente ejemplificado por el gen L del virus sincitial respiratorio, el cual presenta la señal

de término del gen 22K, ocasionando una disminución en la transcripción del gen L y por lo tanto en la concentración de la proteína correspondiente (14). Es importante señalar que en 4 de 8 pases de macrófagos persistentes superinfectados analizados se identificó a la proteína de 22K, no expresada en ningún punto de la cinética de infección aguda en macrófagos P388D1

En el ensayo de superinfección llevado a cabo a una multiplicidad de infección de 10, de la línea de macrófagos persistentemente infectados, los resultados reportaron evidencia de resistencia a la infección por el virus homólogo (RSV); lo cual se vió reflejado en los valores obtenidos para viabilidad celular: 70 y 72% en ensayos realizados a 24 y 48 horas post-infección respectivamente. Para el control representado por macrófagos persistentes no superinfectados, los valores correspondieron a 82 y 84%. Determinándose únicamente una diferencia no significativa del 12% que probablemente representaba a la población celular que no estaba persistentemente infectada.

El modelo in vitro de infección persistente en macrófagos P388D1 con el virus sincitial respiratorio, nos permitió llevar a cabo el análisis e identificación de las proteínas virales expresadas en forma continua durante una infección persistente y establecer que cada pase del cultivo persistente y superinfectado se comporta independiente esto es que no expresan entre sí las mismas proteínas virales. Este modelo permitira evaluar los cambios en las funciones inmunológicas de los macrófagos P388D1 persistentemente infectados, así como determinar la heterogeneidad genética de los virus obtenidos de cultivo persistente con respecto al virus de referencia a través de la técnica de Ensayo de Movilidad de DNA Heteroduplex (60).

CONCLUSIONES.

- 1.- La persistencia viral en macrófagos P388D1 se estableció a una multiplicidad de infección de 0.001.
- 2.- Las proteínas virales G, F1 y P se expresan en los tres tipos de infecciones analizadas como lo muestra la tabla 6.
- 3.- En la infección aguda de macrófagos P388D1 con el Virus Sincicial Respiratorio se identificó además la proteína N.
- 4.- Demostramos que en 9 de 10 pases analizados del cultivo persistente se expresaron 3 proteínas virales G, F1 y P.
- 5.- La proteína 22K se identificó solo en el cultivo superinfectado y solo en 4 pases de 8 analizados.
- 6.- La proteína L no se logró identificar en ninguno de los ensayos realizados.
- 7.- No encontramos diferencias significativas en el patrón de síntesis de proteínas virales estructurales entre los cultivos persistentes vs superinfectado vs infección aguda.

APENDICE

Material biológico.

Líneas celulares:

Células HEP-2 American Típe Culture Collection, Rockville, Maryland., Cat. CCL 23

Células P388D1 American Típe Culture Collection, Rockville, Maryland., Cat. TIB 63

Anticuerpos comerciales:

Anti-Ig de conejo unido a peroxidasa Amersham Life Science, UK., Cat. NA 934

Anti- Ig de conejo unido a fluoresceína Amersham Life Science, UK., Cat. N 1034

Medios de cultivo.

Medio Modificado Dulbecco (D-MEM) GIBCO Laboratories, Grand Island, NY., Cat. 12100-038

Medio Mínimo Esencial (MEM) GIBCO, Laboratories, Grand Island, NY., Cat. 12100-046

RPMI 1640 GIBCO Laboratories, Grand Island, NY., Cat. 31800-022

Suplementos.

Suero bovino fetal BIOEXPORT, México, Mex., Cat. 201

2-Mercaptoetanol GIBCO, Laboratories, Grand Island, NY., Cat. 670-1985AF

Reactivos químicos.

Antibióticos:

Penicilina G SIGMA, Chemical Co., St. Louis, MO., Cat. P3032

Estreptomina SIGMA, Chemical Co., St. Louis, MO., Cat. S6501

Antimicóticos:

Nistatina SQUIBB, Cat. 550

Sales:

Sulfato de magnesio ($MgSO_4$) J.T. Baker, Inc, Danvers, MA., Cat. 2500

TRIS-HCl SIGMA, Chemical Co., St. Louis, MO., Cat. T-3253

Cloruro de sodio ($NaCl$) MERCK., Cat. 6404

Etilendinitrilotetracetato disódico (EDTA) J.T. Baker, Inc, Danvers, MA., Cat. 8993

Fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4) J.T. Baker, Inc, Danvers, MA., Cat. 3818

Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) J.T. Baker, Inc, Danvers, MA., Cat. 3828

Adyuvantes:

Adyuvante completo de freund SIGMA, Chemical Co., St. Louis, MO., Cat. F-4258

Adyuvante incompleto de freund SIGMA, Chemical Co., St. Louis, MO., Cat. F-5506

Detergentes:

Tween 20 SIGMA, Chemical Co., St. Louis, MO., Cat. P-1379
Triton X-100 SIGMA, Chemical Co., St. Louis, MO., Cat. X-100
Desoxicolato de sodio Chemical Co., St. Louis, MO, Cat. D-6750
Dodecil sulfato de sodio (SDS) BIO-RAD, Laboratories, Hercules, Cal., Cat. 161-0302

Otros:

Azul tripano SIGMA, Chemical Co., St. Louis, MO, Cat. T-0776
Poliétilen glicol SIGMA, Chemical Co., St. Louis, MO Cat. P- 2339
Sacarosa J.T. Baker, Inc, Danvers, MA., Cat. 4072
Acido acético J.T. Baker, Inc, Danvers, MA., Cat. 9507
Albúmina sérica bovina SIGMA, Chemical Co., St. Louis, MO, Cat. A-4503
o-Fenilendiamina SIGMA, Chemical Co., St. Louis, MO, Cat. P-2903
4-Cloronaftol SIGMA, Chemical Co., St. Louis, MO, Cat. C-8890
Peróxido de hidrógeno PRODUCTOS QUIMICOS MONTERREY, Monterrey, Mex., Cat. 5600
Metanol MERCK, Cat. 3705B21583
Acetona QUIMICA DINAMICA, México, Mex., Cat. A0500
Polilisina SIGMA, Chemical Co., St. Louis, MO, Cat. 1399
Acrilamida BIO-RAD, Laboratories, Hercules, Cal., Cat. 161-0100
2-Mercaptoetanol BIO-RAD, Laboratories, Hercules, Cal., Cat. 161-0710
Pesos moleculares preteñidos SIGMA, Chemical Co., St. Louis, MO, Cat. SDS 7B

Material de plástico.

Botellas de cultivo de 162 cm² Costar, Broadway, Cambridge., Cat. 3151
Placas de 96 pozos Costar, Broadway, Cambridge., Cat. 3599
Placas para EIA/RIA Costar, Broadway, Cambridge., Cat. 3590
Cajas petri de 60 mm² Costar, Broadway, Cambridge., Cat. 3060
Cámaras para inmunofluorescencia Naperville, IL., Cat. 4818

Rotores.

45 Ti Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA.
SW27 Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA.

ESTO TIENE QUE SER
SALIR DE LA UNIDAD

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- **Karzon DT.** Control of acute lower respiratory illness in the developing world: an assesment of vaccine intervention. *Rev. Infect. Dis.* **1991**; 13 (suppl 6): s571-s577.
- 2.- **Breese CH.** Prospects for a respiratory syncytial virus vaccine. *Science.* **1994**; 265 (sept): 1393-1394
- 3.- **Tristram AD and Welliver CR.** Respiratory syncytial virus vaccines: Can we improve on nature?. *Pediatr. Ann.* **1993**; 22: 715-718
- 4.- **McIntosh K.** Respiratory syncytial virus-successful immunoprophylaxis at least. *N. Engl. J. Med.* **1993**; 18: 1572-1574.
- 5.- **Cerqueiro Ma. Cristina, Murtagh AH, Avila M and Weissenbacher M.** Epidemiology of acute respiratory tract infections in children. *Rev. Infect. Dis.* **1990**; 12 (suppl 8): s1021-s1028.
- 6.- **McIntosh K and Chanock RM.** Respiratory Syncytial Virus. *Virology, Second Edition Vol. 1.* New York: Raven Press, **1990**; Cap. 38: 1045-1071.
- 7.- **Hall CB, Powell KR, Mac Donald NE et al.** Respiratory syncytial virus infection in childrenwith compromised immune function. *N. Engl. J. Med.* **1986**; 315: 77-81.
- 8.- **Milner ME, de la Monte SM and Hutchins GM.** Fatal respiratory syncytial virus infection in severe combined immunodeficiency syndrome. *Am. J. Dis. Child.* **1985**; 135: 1111-1114.
- 9.- **Padman R, Bye MR, Schidlow DV and Zaeri N.** Severe RSV bronchiolitis in an immunecompromised child. *Clin. Pediatr.* **1985**; 24: 719-721.
- 10.- **Breese CH, Hall WJ and Speers DM.** Clinical and physiological manifestations of bronchiolitis and pneumonia. *Am. J. Dis. Child.* **1979**; 133: 798-802.
- 11.- **Bernstein JM and Jerome HF.** Respiratory syncytial virus proteins: identificaion by immuneprecipitation. *J. Virol.* **1981**; 38 (1): 278-285.
- 12.- **Zaroukian HM and Leader Y.** Respiratory syncytial virus pneumonia in hospitalized adults. *Arch. Intern. Med.* **1991**; 151: 2477-2484.
- 13.- **Boletín Semanal de la Dirección General de Epidemiología, S.S.A. 1979-1996 .**
- 14.- **Kingsbury WD.** Paramixoviridae and their replication. *Fundamental Virology, Second Edition.* New York: Raven Press **1991**; Cap. 20: 507-524.
- 15.- **Collins PL and Wertz GW.** The 1A protein gene of human respiratory syncytial virus: Nucleotide sequence of the mRNA and a related polycistronic transcript. *Virology.* **1985**; 141: 283-291.
- 16.- **Lambert DM, Pons MW and Dorsch-Haslerek.** Nucleic acids of respiratory syncytial virus glycoproteins. *J. Virol.* **1980**; 36 (3): 837-846.
- 17.- **Huang YT and Wertz GW.** The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species. *J. Virol.* **1982**; 43 (1): 150-157.
- 18.- **Huang YT and Wertz.** Respiratory syncytial virus mRNA coding assignments. *J Virol.* **1983**; 46 (2): 667-672.
- 19.- **Dickens LE, Collins PL and Wertz GW.** Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **1984**; 52 (2): 364-369.
- 20.- **Collins PL, Huang YT and Wertz GW.** Identification of a tenth mRNA of respiratory syncytial virus and assignment of polypeptides to viral genes. *J. Virol.* **1984**; 49 (2): 572-578.
- 21.- **Elango N, Satake M and Venkatesan S. J.** mRNA sequence of three respiratory syncytial virus genes encoding two nonstructural proteins and a 22K sstructural protein. *Virol.* **1985**; 55 (1): 101-110.
- 22.- **Collins PL, Dickens LE, Buckler-White A, Olmsted RA, Melanie K, Camargo E and Coelingh KVV.** Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial

- virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1986**; **83**: 4594-4598.
- 23.- **Adams JM, Imagawa DT and Zike K.** Relationship of pneumonitis in infants to respiratory syncytial virus. *Lancet.* **1961**; **81**: 502-506.
- 24.- **Bangham RM, Cannon MJ, Karzon DT and Askonas BA.** Cytotoxic T-cell response to respiratory syncytial virus in mice. *J. Virol.* **1985**; **56**: 55-59
- 25.- **Huang YT, Romito R, Bishop DE and Banerjee AK.** Characterization of in vitro system for the synthesis of mRNA from human respiratory syncytial virus. *Virology.* **1993**; **193**: 862-867.
- 26.- **Collins PL and Wertz GW.** Nucleotide sequence of IB and IC nonstructural protein mRNAs of human respiratory syncytial virus. *Virology.* **1985**; **143**: 442-451.
- 27.- **Markwell M, Portner A and Schwartz AL.** An alternative route of infection for viruses: entry by means of the asialoglycoprotein receptor of a sendai virus mutant lacking its attachment protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1985**; **82**: 978-982.
- 28.- **Markwell MA, Svennerhol ML and Paulson JC.** Specific gangliosides function as host cell receptor for sendai virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1981**; **78**: 5406-5410.
- 29.- **Gold L, Pribnow D, Schneider T, Shinedling S, Singer BS and Stormo G.** Translational initiation in prokaryotes. *Ann. Rev. Microbiol.* **1981**; **35**: 365-403.
- 30.- **Collins PL, Dickens LE and Buckler-White A.** Correct sequence for the major nucleocapsid protein mRNA of respiratory syncytial virus. *Virology.* **1985**; **146**: 69-77.
- 31.- **Collins PL and Wertz GW.** Gene products and genome organization of human respiratory syncytial virus. In Lerner RA, Chanock RM, Brown F, eds. *Modern Approaches to Vaccines* New York: Cold Spring Harbor Laboratory. **1985**: 297-301.
- 32.- **Dubois-Dalq M, Holmes KV and Rentier P.** Assembly of paramyxoviridae. In: *Assembly of enveloped RNA viruses.* Vienna Springer-Verlag. **1984**: 44-65.
- 33.- **Oldstone MB.** Molecular anatomy of viral persistence. *J. Virol.* **1991**; **65** (12): 6381-6386.
- 34.- **Baldrige P and Senterfit LB.** Persistent infection of cells in culture by respiratory syncytial virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1976**; **151**: 684-688.
- 35.- **Pringle CR, Shirodaria PV, Cash P, Chiswell DJ and Malloy P.** Initiation and maintenance of persistent infection by respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **1978**; **28** (1): 199-211.
- 36.- **Fernie BF, Ford EC and Gerin JL.** The development of Balb/c cells persistently infected with respiratory syncytial virus: presence of ribonucleoprotein on the cell surface. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1981**; **167**: 83-86.
- 37.- **Bangham C and McMichael AJ.** Specific human cytotoxic T cells recognize B-cell lines persistently infected with respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1986**; **83**: 9183-9187.
- 38.- **Domurat E, Roberts NJ, Walsh EE and Dagan R.** Respiratory syncytial virus infection of human mononuclear leukocytes in vitro and in vivo. *J. Infect. Dis.* **1985**; **152**: 895-902.
- 39.- **Goswami KK, Cameron KR, Russell WC, Lange LS and Mitchell DN.** Evidence for the persistence of paramyxoviruses in human bone marrows. *J. Gen. Virol.* **1984**; **65**: 1881-1888.
- 40.- **Franke G, Freihorst J, Steinmüller C, Verhagen W, Hockertz S and Lohmann-Mattnes ML.** Interaction of alveolar macrophages and respiratory syncytial virus. *J. Immunol. Methods.* **1994**; **174**: 173-184.
- 41.- **Panuska JR, Cirino NM, Midulla F, Despot JE, McFadden ER and Huang YT.** Productive infection of isolated human alveolar macrophages by respiratory syncytial virus. *J. Clin. Invest.* **1990**; **86**: 113-119.
- 42.- **Cirino NM, Panuska JR, Villani A, Taraf H, Rebert NA, Merolla R, Tsivitse P and Gilbert IA.** Restricted replication of respiratory syncytial virus in human alveolar macrophages. *J. Gen. Virol.* **1993**; **74**: 1527-1537.

- 43.- **Hegele RG, Hayashi S, Bramley AM and Hogg JC.** Persistence of respiratory syncytial virus genome and protein after acute bronchiolitis in guinea pigs. *Chest.* **1994**; 105 (6): 1848-1854.
- 44.- **Hegele RG, Robinson TJ, González S and Hogg JC.** Production of acute bronchiolitis in guinea-pigs by human respiratory syncytial virus. *Eur. Respir. J.* **1993**; 6 (9): 1324-1331.
- 45.- **Tristram DA, Welliver Rc, Hogerman DA, Hildreth SW and Paradiso P.** Second year surveillance of recipients of a respiratory syncytial virus F protein subunit vaccine, PFP-1: evaluation of antibody persistence and possible disease enhancement. *Vaccine.* **1994**; 12 (6): 551-556.
- 46.- *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR).* **1995**; Enero 20 /44(3).
- 47.- **Trudel M and Payment P.** **1993.** *Methods and Techniques in Virology.* Marcel Dekker, INC. 309 pags.
- 48.- **García Barreno B, Paloma C, Peñas C, Delgado T, Pérez- Preña P and Melero JA.** Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J. Virol.* **1989.** 63 (2): 925-932.
- 49.- **Ey PL, Prowse SJ and Jenkin CR.** Isolation of pure IgG₁, and IgG_{2a} immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Biochemistry.* **1978**; 15: 429-436.
- 50.- **Goding JW.** Use of staphylococcal protein A as immunological reagent. *J. Immunol. Methods.* **1978**; 20: 241-253.
- 51.- **Studier FW.** *J. Mol. Biol.* **1972.** 79: 237-248.
- 52.- **Towbin H, Stachelin T and Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamde gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1979**; 76: 4350-4354.
- 53.- **Garfin DE.** **1990.** One-dimensional gel electrophoresis. In: *Deutscher,MP., Methods in Enzymology.* Academic Press, INC. New York: 182: 439-440.
- 54.- **Cash P, Pringle CR and Preston CM.** The polypeptides of respiratory syncytial virus: products of cell free protein synthesis and post-translational modifications. *Virology.* **1979**; 92: 375-384.
- 55.- **Dubovi EJ.** Analysis of proteins synthesized in respiratory syncytial virus-infected cell. *J. Virol.* **1982**; 42 (2): 372-378.
- 56.- **Gruber C and Levine S.** Respiratory syncytial virus polypeptides. IV. The oligosaccharides of the glycoproteins. *J Gen. Virol.* **1985**; 66: 417-432.
- 57.- **Lambert DM, Hambor J, Diebold M and Galinsky B.** Kinetics of synthesis and phodphorylation of respiratory syncytial virus polypeptides. *J. Gen. Virol.* **1988**; 69: 313-323.
- 58.- **Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutcha FE, Grez M, RübSamen-Waimann H and Mullins JI.** *Science.* **1993**; 62: 1257-1261.
- 59.- **Gómez- García B.** **1994.** *Infecciones Respiratorias Agudas y Crónicas.* INDRE, S.S.A. Cap. 8: 373-379.
- 60.- **García Barreno B, Jorcana JL, Aukenbauer T, López Galíndez C and Melero JA.** Participation of cytoskeletal intermediate filaments in the infectious cycle of human respiratory syncytial virus. *Virus Research.* **1988**; 9:307-322.
- 61.- **Ahmed R and Stevens JG.** *Viral persistence.* *Fundamental Virology, Second Edition.* New York: Raven Press **1991**; Cap. 20: 507-524.
- 62.- **Ray NB, Ewalt LC, and Lodmell DL.** Rabies virus replication in primary murine bone marrow macrophages and in human and murine macrophage-like cell lines: implications for viral persistence. *J Virol.* **1995**; Feb. 764-772.
- 63.- **Collins PL and Mottet G.** Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **1993**; 74: 1445-1450.

- 64.- **Darnell J, Lodish H and Baltimore D.** *Molecular Cell Biology*, Second Edition. Scientific American Books, INC., 1990; Cap. 8: 269-270.
- 65.- **Levine S, Klaiber-Franco R and Paradiso PR.** Demonstration that glycoprotein G is attachment protein of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 1987; 68: 2521-2524.
- 66.- **Walsh E and Hruska JF.** Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. *J. Virol.* 1983; 47: 171-177.
- 67.- **Heminway BR, Yang YT, Tanaka Y, et al.** Role of the human respiratory syncytial virus small hydrophobic protein in membrane fusion. Abstracts of the IX International Congress of Virology, P17-2, 1993:167