



11261

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

FACULTAD DE MEDICINA

**EFFECTO DE LA PERSISTENCIA DEL VIRUS
SINCITAL RESPIRATORIO EN LAS PROPIEDADES
INMUNES DEL MACROFAGO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

AREA: MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

P R E S E N T A :

Q.F.B. MARIA ANTONIETA GUERRERO PLATA

ASESORA: DRA. BEATRIZ GOMEZ GARCIA

COASESOR: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

MEXICO, D. F.

1997

**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.

“Dedico íntegramente lo que representa esta tesis para mí, al principal motivo por el cual mi vida tiene un sentido:

MI FAMILIA.

A la que debo todo lo que soy y todo lo que tengo y a la que siempre añoré a través de la distancia”.

*A mi padre: **Efrén Guerrero***

A ti, por darme la libertad de alcanzar mis sueños y ser parte de ellos. Por la promesa que te hice de lograrlo.

Seguirás aquí, en mí... Por siempre.

*A mi madre: **Carolina Plata***

A ti, porque eres lo más importante de todo lo que tengo.

*A mis hermanos con admiración: **Xóchitl, Pedro, Juany, Sandra y Claudia***

Mis mejores amigos que son el ejemplo que me empuja a superarme y que no me permitió claudicar. Pero sobretodo, por estar siempre unidos y presentes para compartirlo todo conmigo.

*A mis cuñados **Arturo y Elvira:***

Por ser parte de la familia que formamos.

*Y por supuesto, a nuestra pequeña **Arantxa:***

Por motivar con su presencia aún más mi deseo de regresar a casa.

"Agradezco a todos, porque en mucho, parte de ellos está implícito en cada una de las páginas de esta tesis y en cada uno de los recuerdos que serán inherentes a esta gran etapa de mi vida".

*A **Dios** por ser mi mejor consuelo aún en la mayor adversidad.*

*A **mi familia** por ser siempre mi mayor respaldo.*

*A la Dra. **Beatriz Gómez García**: por creer en mí y ser el apoyo fundamental en esta etapa de mi formación académica.*

*"La admiro mucho como investigadora, la valoro como asesora, pero la aprecio más como amiga, por no dejarme sola nunca. **Gracias por todo Bety**".*

*A mis amigos y profesores de licenciatura: **Q.F.B. Martha Oliva, Dr. José Rmz.** y **Dr. Humberto Leal** que fueron fundamentales en mi decisión de continuar en este apasionante mundo de la investigación.*

*A todos mis amigos y compañeros de maestría con quienes compartí muchos momentos inolvidables, pero muy especialmente a: **Irma** por... han sido tantas cosas, que sólo puedo decirle gracias por ser mi amiga y estar conmigo absoluta e incondicionalmente en todo.*

*A mis amigas: **Cecilia, Lupita, Brisa y Marcela**: por haber compartido conmigo además de los más amargos y felices momentos de mi vida, las intrascendencias de una vida cotidiana y todos los pequeños detalles que fortalecen aún más el profundo sentimiento que me une a ellas.*

*A **Amparito** y a **Don Emilio** quienes más que darme un espacio en su vida ya son parte de mí.*

*A toda la familia **Hernández** por permitirme convivir con ellos y por quienes siento un particular afecto.*

*A **César** porque a pesar de la enorme distancia, siempre supo estar cerca de mí.*

*A mis amigos y compañeros del laboratorio: **Ángel, Enrique, Ignacio, Jesús, Marcella, Mirza, Rocío, Rosa Elena** y **Lino** por su amistad, por las enseñanzas, y por su ayuda incondicional durante toda esta odisea en la que he sido parte de este excelente equipo de trabajo.*

*A la Dra. **Emma Melendro** y al Dr. **Enrique Ortega** por sus acertadas críticas y sugerencias a los resultados de mi trabajo como miembros de mi comité tutorial. Además, por el apoyo moral y amistad como personas.*

*A **Eva** y a la Lic. **Bertha Pérez de la Mora** por su amistad y por ayudarme eficazmente en todos mis trámites como alumna de maestría.*

*A Lic **Teresa García** por su amistad, atención y ayuda en todos mis trámites como becaria del CONACyT.*

*A **Antonio Rdz.** por su ayuda en los análisis del FACS.*

*A la Dra. **Cristina Morán** por su ayuda en el análisis estadístico de este trabajo.*

*Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por distinguirme como becaria durante mis estudios de maestría.*

“A nuestros momentos únicos que he de recordar toda mi vida y que permanecerán en mi memoria y en mi corazón eternamente. A la nostalgia de una ilusión que es inherente a todos los bellos recuerdos que de esta ciudad me llevo”.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:	Dr. Enrique Ortega Soto.
SECRETARIO:	Dra. Emma I. Melendro Lozano.
PRIMERVOCAL:	Dra. Beatriz Gómez García.
SUPLENTE:	Dra. Blanca Lilia Barrón Romero.
SUPLENTE.:	Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Virología. Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina. Y en el laboratorio del Dr. Enrique Ortega Soto. Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Con el apoyo de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico. del Programa Universitario de Investigación en Salud y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

**EFEECTO DE LA PERSISTENCIA DEL VIRUS
SINCITAL RESPIRATORIO EN LAS
PROPIEDADES INMUNES DEL MACROFAGO**

ÍNDICE

ABREVIATURAS	v
RESUMEN	I
INTRODUCCIÓN	
1. Persistencia viral.....	3
2. Inmunidad a virus.....	4
3. Aspectos generales del virus sincitial respiratorio (RSV).....	5
3.1. Importancia epidemiológica.....	5
3.2. Estructura.....	6
3.3. Replicación.....	8
4. Aspectos inmunes e inmunopatológicos de la infección por el RSV.....	9
5. Interacción RSV-Macrófago.....	11
5.1. Características generales de los macrófagos.....	11
5.1.1. <i>Morfología</i>	11
5.1.2. <i>Funciones</i>	12
5.1.2.1. Fagocitosis.....	12
5.1.2.2. Receptores FcγR.....	13
5.1.2.3. Monocinas.....	15
a). TNF-α.....	15
b). IL-6.....	17
6. Alteraciones en los macrófagos ocasionadas por infección aguda con RSV.....	17
7. Infección persistente por RSV.....	19
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	22
METODOLOGÍA	
1. Virus.....	23
1.1. Virus sincitial respiratorio (RSV) cepa Long.....	23
2. Células.....	23
2.1. Línea celular P388D ₁ (IL-1).....	23
2.2. Línea celular HEp-2.....	23
2.3. Línea celular L929.....	23

2.4. Hibridoma 2.4G2.....	24
3. Propagación del virus.....	24
4. Titulación del virus.....	24
5. Propagación de la línea celular HEp-2.....	25
6. Propagación de la línea celular L929.....	25
7. Propagación del cultivo persistente.....	25
8. Conteo de células.....	25
9. Determinación de la persistencia del RSV en los cultivos celulares.....	26
9.1. Determinación de proteínas virales por inmunofluorescencia indirecta.....	26
9.2. Amplificación del gen que codifica para la proteína N por RT-PCR.....	26
9.2.1. Extracción de RNA celular total.....	26
9.2.2. RT-PCR.....	27
10. Microensayo para la determinación de proteínas.....	28
11. Determinación de la actividad fagocítica.....	28
11.1. Obtención de eritrocitos.....	28
11.2. Sensibilización de eritrocitos.....	28
11.3. Titulación del anticuerpo anti-DNP.....	29
11.4. Oponización de eritrocitos.....	29
11.5. Ensayo colorimétrico para cuantificar la fagocitosis específica mediada por receptores Fcγ.....	29
11.6. Ensayo colorimétrico para cuantificar la fagocitosis inespecífica.....	30
12. Determinación de los receptores FcγRII y FcγRIII.....	30
13. Determinación de la actividad del TNF-α.....	31
14. Determinación de la IL-6.....	31
15. Análisis estadístico.....	32

RESULTADOS

1. Confirmación de la persistencia del RSV en las células P388D ₁	33
1.1. Detección de antígeno viral en células del cultivo RSV persistente a través de inmunofluorescencia directa.....	33
1.2. Detección de la expresión del genoma del RSV a través de RT-PCR en células persistentemente infectadas.....	34
2. Determinación del efecto del RSV sobre las funciones de las células P388D ₁ persistentemente infectadas con el virus.....	36
2.1. Determinación de la actividad fagocítica mediada por receptores Fcγ.....	36
2.1.1. Determinación de la actividad fagocítica no mediada por receptores Fcγ.....	39
2.1.2. Determinación de la expresión de los receptores FcγRII/FcγRIII en células persistentemente infectadas con RSV.....	42
2.1.3. Determinación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) en los sobrenadantes de las células persistentemente infectadas con RSV.....	46
2.1.4. Determinación de la IL-6 en los sobrenadantes del cultivo RSV persistente.....	47

DISCUSIÓN

50

CONCLUSIONES	55
<hr/>	
APÉNDICES	
1. Material y reactivos.....	56
2. Preparación de soluciones.....	59
<hr/>	
BIBLIOGRAFÍA	62

ABREVIATURAS

- BSA	Albúmina sérica bovina
- BBS	Solución amortiguadora de boratos
- Da	Dalton
- DEPC	Diethyl pirocarbonato
- 2,4'-DNP	2,4'-Dinitrofenol
- DGVB ^{2*}	Solución amortiguadora dextrosa-gelatina-veronal
- DMSO	Dimetil sulfóxido
- DNP	Dinitro fenol
- ELISA	Inmunoensayo enzimático
- EIA/RIA	Inmunoensayo enzimático/Radioinmunoensayo
- FITC	Isotiocianato de fluoresceína
- IL-()	Interleucina
- rIL-()	IL-recombinante
- IFN- γ	Interferón gamma
- Ig	Inmunoglobulina
- kDa	Kilo Dalton
- m.o.i.	Multiplicidad de infección
- MEMi	Medio mínimo esencial incompleto
- MEMc	Medio mínimo esencial completo
- pb	Pares de bases
- PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
- PFA	Paraformaldehído
- rTNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa recombinante
- RPMIi	RPMI incompleto
- RPMIc	RPMI completo
- SFB	Suero fetal bovino
- 2,4,6-TNBS	2,4,6-Ácido trinitrobencen sulfónico
- 2,4,6-TNP	2,4,6-Trinitrofenol
- TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
- Th	Célula T cooperadora
- TBE	Solución Tris-base EDTA

RESUMEN

EFFECTO DE LA PERSISTENCIA DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO EN LAS PROPIEDADES INMUNES DEL MACRÓFAGO

El virus sincicial respiratorio (RSV) se considera a nivel mundial como la causa principal de enfermedades del tracto respiratorio bajo en niños menores de dos años, además origina bronquitis y neumonías severas y aumenta la susceptibilidad a infecciones secundarias.

Los macrófagos son las principales células inmuno-efectoras de las vías respiratorias y están expuestos al RSV durante el curso de la infección. A pesar de que la persistencia del RSV en humanos no ha sido totalmente demostrada, existen evidencias circunstanciales que lo sugieren. Estudios *in vivo* e *in vitro* durante la infección aguda de macrófagos murinos y de humanos con RSV han demostrado modificaciones en las propiedades inmunes de estas células. Sin embargo, no se tienen reportes del efecto en las funciones inmunes de macrófagos en infecciones persistentes por este virus.

Por lo anterior, decidimos investigar si la presencia y expresión del genoma de RSV en macrófagos altera dichas funciones, para lo cual establecimos un modelo de persistencia viral *in vitro*. El modelo se estableció con la cepa *Long* de RSV en la línea celular murina similar a macrófagos (P388D₁). La persistencia del genoma viral se confirmó amplificando por RT-PCR una región del gen que codifica para la proteína N del virus. La expresión del RSV por detección del antígeno viral por inmunoquímica. La producción del virus a través de titular el virus extracelular por TCID₅₀/ml en células HEp-2. De las propiedades inmunes del macrófago se estudiaron: la producción de IL-6 por ensayos de ELISA y la actividad del TNF- α por ensayos de citotoxicidad en células L929, ambas citocinas fueron determinadas en el sobrenadante del cultivo persistente. En las células infectadas se analizó la actividad fagocítica tanto específica con eritrocitos de camero opsonizados con IgG monoclonal murino como inespecífica con eritrocitos de camero sin opsonizar. Además, se estudió la expresión de receptores para la fracción Fc de IgG (Fc γ R) por citometría de flujo utilizando un anticuerpo monoclonal.

Los resultados con respecto a la confirmación de la persistencia por inmunofluorescencia indican que alrededor del 80% de la población celular estuvo infectada por el virus. A partir del pase 28 hasta el 36 se investigó la presencia del gen N por RT-PCR encontrándose en todos. Con excepción de los pases 21 al 36 se detectó virus extracelular se encontraron en todos los pases analizados. Sin embargo, aún en ausencia de virus extracelular en los pases mencionados si se encontró el gen N. Con base a lo anterior consideramos que la línea celular estaba persistentemente infectada. En cuanto a las propiedades inmunes estudiadas observamos que la expresión de la citocina IL-6, así como la actividad en la fagocitosis específica y la expresión de los FcγR se incrementó. En cambio disminuyó la actividad del TNF-α. Finalmente, la fagocitosis inespecífica no se alteró de manera significativa.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que una infección persistente con RSV también altera las funciones del macrófago aunque de diferente manera que una infección aguda.

INTRODUCCIÓN

1. Persistencia viral

Para que un virus sobreviva en la naturaleza, requiere de infecciones continuas en individuos susceptibles. Dentro de un organismo infectado, el virus puede causar infección aguda o establecer persistencia. En la infección aguda puede haber un cuadro clínico, la respuesta inmune del huésped controla la multiplicación del virus, los síntomas y signos desaparecen y posiblemente se elimina el agente infeccioso. En cambio, en las infecciones persistentes la desaparición de los síntomas y signos no va acompañada de la eliminación del agente infeccioso, el virus permanece en el organismo a pesar de que el huésped responda a la infección.

En general, las infecciones virales de un organismo pueden ser divididas en varias categorías: *a)* infección aguda seguida por la eliminación del virus por la respuesta inmune, *b)* infección aguda seguida por infección latente en la cual el genoma viral persiste y posiblemente partículas virales también, sólo que no es posible aislarlas entre los periodos de reactivación, *c)* infección aguda seguida por infección crónica en la cual el virus infeccioso es continuamente liberado de los tejidos infectados e *d)* infección crónica sin infección aguda. Sin embargo, estos mecanismos no se consideran como definiciones rígidas, ya que muchos virus muestran diferentes tipos de infección en diferentes tejidos o tipos celulares, o combinan algunos de estos patrones generales (*Ahmed R. et al., 1996*). Más aún, el hecho de que no se logre aislar el virus en los periodos de ausencia de manifestaciones clínicas en la infección latente, puede deberse a que la sensibilidad de nuestras técnicas no lo permite.

Durante el periodo de persistencia, los virus pueden permanecer dentro de un organismo por largos periodos de tiempo, iniciándose el proceso de infección como una infección aguda, para progresar a infección latente o crónica, donde es necesario que se cumplan tres condiciones fundamentales: *a)* el virus debe ser capaz de infectar a células huésped sin originar efecto citopático o un daño excesivo, *b)* el virus debe de tener algún mecanismo para mantener el genoma viral en la célula infectada y *c)* el virus tiene que lograr evadir el sistema inmune del organismo evitando su detección y consecuente eliminación. (*Haywood A. 1986. Southern P. & Oldstone M., 1986; Oldstone M., 1989; Ahmed R. &*

Stevens J. 1990. Oldstone M. 1990. Oldstone M. 1991. Oldstone M & Rall G. 1993. Martin A. et al. 1994. Ahmed R., et al. 1996).

El genoma viral logra persistir en un organismo cuando se integra a la célula huésped utilizando diferentes mecanismos o puede permanecer en forma episomal de manera extracromosómica. Entre los virus que causan infección persistente en humanos se pueden mencionar los siguientes: a) **virus con DNA**: adenovirus, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus herpes simplex 1 y 2, herpes virus humano 6, virus de varicela zoster, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis D, virus del papiloma, parvovirus B19, poliomavirus BK, poliomavirus JC. b). **virus con RNA**: virus de la hepatitis C, virus del sarampión, virus de la rubéola. c). **Retrovirus**: virus de inmunodeficiencia humana, virus tipo I y II de la leucemia humana de células T (*Haywood A. 1986. Oldstone M. 1989. Ahmed R., et al. 1996).*

2. Inmunidad a virus

La función primaria del sistema inmune del huésped es el reconocimiento y eliminación de materiales extraños, de tal manera que un factor importante involucrado en la persistencia viral es la evasión de la vigilancia inmunológica, siendo los anticuerpos y las células T los dos principales sistemas efectores que reconocen antígenos específicos para resolver las infecciones virales.

Los anticuerpos pueden reconocer virus libre o antígeno viral presentado en la superficie de las células. La acción antiviral de los anticuerpos se lleva a cabo neutralizando las partículas virales y destruyendo a las células infectadas a través de citotoxicidad mediada por complemento o por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). El anticuerpo puede controlar las infecciones virales por diferentes mecanismos, y el evento crítico para la neutralización parece estar en las glicoproteínas de la envoltura viral, o en las proteínas de la cápside viral, por lo que una posible estrategia utilizada por los virus para evitar el efecto antiviral de los anticuerpos es el modificar la cadena de aminoácidos o la estructura tridimensional de estas proteínas.

En contraste, las células T solamente ven el antígeno viral en asociación con el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la célula huésped. Las células T CD4⁺ reconocen péptidos (10-20 a.a.) virales en asociación con MHC clase II, mientras que T CD8⁺ reconocen péptidos (8-10 a.a.) virales unidos a las moléculas MHC I. Las células T CD4⁺ contribuyen a la inmunidad antiviral en muchas diferentes maneras, producen citocinas antivirales, participan en la activación y reclutamiento de macrófagos y colaboran en la producción de anticuerpos y la respuesta de los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL). Los CTL son altamente eficientes y pueden lisar células infectadas por dos

mecanismos: a) una vía secretoria y membranolítica que involucra perforinas y granzimas y b) una vía no secretoria mediada por un receptor que involucra a Fas, una proteína de la familia del receptor del TNF (Zinkernagel R., 1993; Kagi D., et al. 1994; Ahmed R., et al. 1996; Lindsay J. & Oldstone M., 1996; Nagata S. et al. 1997).

3. Aspectos generales del virus sincitial respiratorio (RSV)

3.1. Importancia epidemiológica

Las enfermedades respiratorias agudas presentan alta tasa de mortalidad de la niñez aún en naciones desarrolladas (Hayes E., et al. 1989) y dentro de los agentes causales es precisamente el virus sincitial respiratorio (RSV) la principal causa de los brotes de estas enfermedades. El sitio inicial de la replicación del virus es el epitelio del tracto nasal y nasofaringe, pero en ciertas instancias, el virus llega al tracto respiratorio bajo infectando el epitelio bronquial y bronquiolar, además de las células del parénquima pulmonar. El virus causa por lo tanto una variedad de síndromes respiratorios, los cuales varían en severidad, desde fiebre común hasta severa, bronquitis, bronquiolitis y neumonía (Anderson J. et al. 1989) que frecuentemente llegan a ocasionar la muerte (Berstein J. & Hruska J., 1981; Lemen R. 1995). Según datos epidemiológicos, un 60 a 90% del síndrome clínico de bronquiolitis es causado por la infección del RSV, ya que infecta a casi todos los infantes en el primer año de vida, siendo los niños entre los 2 y 6 meses los que presentan el porcentaje de incidencia más alto (Tercier J. 1983; Saijo M., et al. 1994; Boeck K., 1996). Las secuelas pulmonares de la infección por RSV son particularmente serias en neonatos y en niños con enfermedad cardiopulmonar severa o inmunodeficiencia (Goldman D., 1989). Los adultos de edad avanzada e individuos con una inmunodeficiencia celular también se ven afectados por este virus mostrando un cuadro de neumonía severa, que conduce a alta morbilidad y mortalidad (Levenson R. & Kanter O., 1987; Vilkerfors T., et al. 1987; Welliver R. & Ogra P., 1988; Panuska J., et al. 1990; Wendt C. & Hertz M., 1995; Dowell S., et al. 1996).

Las epidemias por el RSV, ocurren a nivel mundial, principalmente durante el invierno, con una mayor incidencia durante los meses de enero y febrero. Se considera que hay una alta mortalidad asociada al RSV la cual incluso es mayor que la ocasionada por el virus de influenza (Winter G. & Inglis J., 1987; *MMWR*, 1995, *MMWR*, 1996; Nicholson K. 1996). Sin embargo hay evidencias de que la infección puede ocurrir durante todo el año (Nwankwo M., et al. 1988; Dawson K. & Nogrudge N., 1989; Washburne J., et al. 1992; Saijo M., et al. 1993; Dowell S., et al. 1996).

Reportes de Estados Unidos de América estiman que se producen aproximadamente 90,000 hospitalizaciones con 4,500 muertes cada año por infección con este virus causando enfermedades del tracto respiratorio inferior tanto en infantes como en niños pequeños (*MMWR* 1996). En México no existen datos estadísticos que reporten la

incidencia de infección por el RSV; sin embargo, si existen estadísticas en nuestro país donde se indica que las infecciones respiratorias agudas (IRA) ocupan el primer lugar de morbilidad y mortalidad infantil dentro de las enfermedades infecciosas. En 1989 la tasa de morbilidad de las vías respiratorias inferiores correspondió a 2985.04 en niños de 1 a 4 años y de 1300.46 en menores de un año por cada 100.000 niños nacidos vivos respectivamente (SSA, 1979-1996). No obstante que las estadísticas de las infecciones transmisibles no especifican al agente etiológico, las evidencias circunstanciales como: la alta incidencia de bronquitis severas y de neumonía infantil durante los meses de invierno y primavera sugieren al RSV como el agente causal (Gómez B., 1994).

Por lo tanto, el desarrollo de una vacuna contra el RSV es un reto importante y sobre el cual se investiga intensamente, ya que los intentos de elaborar algunas vacunas como la producida con virus inactivado con formalina o virus precipitado con alumina o con virus completo, no protegieron a niños de la infección, sino por el contrario, por reinfección los niños vacunados presentaron cuadros clínicos más severos que los no vacunados (Jeffcoate T., 1969; Kapikian A. et al. 1969; Kim H. et al 1969; Gaham B., 1995; Openshaw P., 1995).

3.2. Estructura

El RSV es el componente prototipo del género *Pneumovirus* dentro de la familia *Paramixoviridae*. Es un virus envuelto y pleomórfico con un diámetro de 150 a 300 nm. Su nucleocápside es una hélice simétrica cuyo diámetro varía entre 12 y 15 nm o incluso hasta 18 nm. Su envoltura consiste en una bicapa lipídica, derivada de la membrana plasmática de la célula huésped, la cual contiene glicoproteínas de superficie codificadas por el virus, formando "espículas" cortas (11 a 20 nm) que participan en la unión y penetración del virus a la célula huésped (Collins D. et al., 1996; White D. & Fenner F., 1986; Kingsbury D. 1991).

Este virus presenta un genoma no segmentado que consta de una cadena de RNA de polaridad negativa con 15.222 nucleótidos y su peso molecular está estimado entre 5.0 y 5.62×10^6 Da. (Lambert D. & Pons M., 1980; Huang Y. & Hertz G., 1982; Huang Y. et al., 1983; Dickens L. et al., 1984; Collins P. et al., 1984; McIntosh K. & Chanock R., 1990; Barik S., 1992; Collins P. et al., 1996). Dicho genoma cuya secuencia se conoce totalmente, sirve como plantilla para la transcripción de 10 mRNAs poliadenilados, dando origen a las 10 proteínas del virus, ocho de las cuales se encuentran en el virión (N, P, L, F, G, SH, M y M2) y dos son no estructurales (NS1 y NS2); es decir que sólo se encuentran en células infectadas.

La distribución de las proteínas virales en la célula infectada y en el virión se observa en la **Figura 1** y la función de cada una de ellas corresponde a la descripción siguiente: la proteína **F** o de fusión (70 kDa) participa en la penetración y formación de

sincitios, su precursor inactivo F_0 es modificado postraduccionalmente por una proteasa celular dando lugar a las subunidades F_1 y F_2 unidas entre si por un puente disulfuro. La proteína **G** o glicoproteína (90 kDa) ha sido identificada como la proteína responsable de la unión del virus a la célula huésped. La función específica de la proteína **SH** o hidrofóbica (7.5 kDa) se desconoce; sin embargo se sugiere que participa en la unión, penetración y desnudamiento del virus o en la mortogénesis del virión (Collins P. et al. 1996) y su coexpresión con las proteínas F y G aumenta la capacidad de fusión del virus, jugando un papel crítico en la formación de sincitios (Hemmav B. et al. 1993). La proteína **N** o nucleoproteína (43.4 kDa) tiene una función estructural y se encuentra estrechamente unida al RNA genómico. La proteína **P** o fosfoproteína (27.1 kDa) y la proteína **L** (250 kDa) juegan un papel en la transcripción y replicación del RNA viral. En cuanto a la proteína **M** o de matriz (28.7 kDa) se piensa que tiene dos funciones generales, como la de sostener la nucleocápside transcripcionalmente inactiva antes de su empaquetamiento y mediar la asociación de esta con la envoltura. La proteína **M2** (22.1 kDa) se cree que también puede estar íntimamente involucrada en las funciones de la nucleocápside. Por último, la función de las proteínas no estructurales **NS1** (o 1C) (15.6 kDa) y **NS2** (o 1B) (14.6 kDa) aún se desconoce (Collins P. et al. 1996).

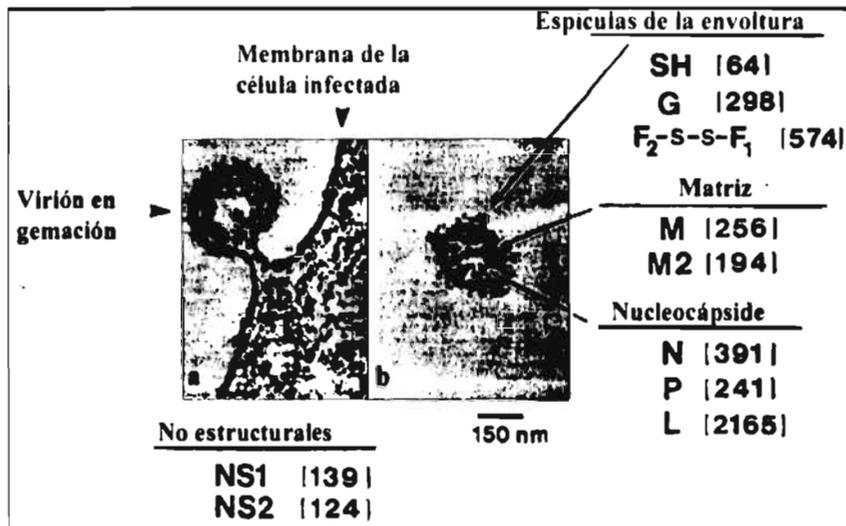


Figura 1. Microfotografía electrónica del RSV. (a) En gemación y (b) en forma libre. Las flechas indican la localización de las proteínas virales y las cifras entre paréntesis se refieren a la cantidad de aminoácidos en cada una de ellas. (Collins P. et al. 1996).

3.3. Replicación

La macromolécula celular que utiliza el RSV como receptor para su unión se desconoce, sin embargo, se sabe que la unión del virus a la célula está mediada por la proteína G. Una vez unido, el virus penetra a la célula fusionándose con la membrana plasmática del huésped, donde participa la proteína F. Después de la penetración, la envoltura viral parece ser incorporada a la superficie celular y la nucleocápside es liberada hacia el citoplasma. La transcripción se inicia cuando la polimerasa del virus establece contacto con el RNA viral el cual no presenta cap ni está poliadenilado, en este proceso se presenta un mecanismo secuencial guiado por las señales de inicio y de paro ubicado entre los genes, produciéndose la síntesis de los RNAm correspondientes a las 10 proteínas virales. El orden de transcripción de los genes del virus es de 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5', donde los primeros nueve genes están separados por regiones intergénicas que varían de tamaño entre 1-52 nucleótidos. Los dos últimos genes M2 y L, comparten una región de 68 nucleótidos, de tal manera, que la señal de inicio del gen L está localizado dentro del gen M2 (*Figura 2*). Durante la replicación, la polimerasa utiliza el templado para los transcritos de las proteínas virales, pero ignora las señales de paro, generando un RNAm o antigenoma que sirve como plantilla para la síntesis de las progenies genómicas virales (*Collins P., et al., 1996; Lamb R. & Kolakofski D., 1996*).

El proceso de ensamble inicia cuando unidades de la proteína N se unen al nuevo RNA viral y forman la estructura helicoidal, para unirse después al complejo de proteínas P-L, formando así la nucleocápside. Las proteínas F y G migran hacia la membrana citoplasmática y aunque se desconoce el mecanismo por el cual el virus es ensamblado en la membrana plasmática, se piensa que la proteína M se agrega a la región interna de la envoltura para mediar la unión de la nucleocápside a la membrana celular. De esta manera se forman los viriones o partículas virales completas que posteriormente serán liberadas al exterior de la célula por el proceso de gemación (*Collins P., et al., 1996; Lamb R. & Kolakofski D., 1996*).

a la infección. Se ha observado que los anticuerpos contra la proteína de fusión son importantes para limitar la infección por el virus. Sin embargo la protección no es suficiente para evitar que en algunos casos se presenten cuadros de neumonía y bronquitis (Bangham Ch. & McMichael A. 1986; Bangham Ch. 1986).

2. La inmunidad dada por anticuerpos maternos también produce protección aunque parcial (Englund J. 1994). En niños con títulos elevados de anticuerpos maternos los síntomas de la infección se manifiestan en el tracto respiratorio alto, se producen pocos virus y la infección desaparece pronto. Sin embargo, existen datos contradictorios ya que la bronquiolitis y neumonía asociada a RSV ha ocurrido más frecuentemente en los primeros cuatro meses de vida cuando los anticuerpos maternos transmitidos han estado en sus más altos niveles, que durante los meses posteriores de infancia donde los niveles de anticuerpos pasivos han disminuido o desaparecido (Kapikian A. et al. 1969).

Respecto a la inmunidad celular también se tienen resultados que indican la importancia de esta respuesta para limitar la infección.

1. En pacientes cuya inmunidad celular es deficiente el virus se encuentra en forma persistente (Nadal D. & Ogra P. 1990; Openshaw P. et al. 1995; Gaddum R. et al. 1996).

2. La eliminación de células CD4⁺ en ratones, antes de la infección por RSV, ha resultado en una prolongada replicación del virus (Garofalo R. et al. 1996).

3. Las células TCD8⁺ están implicadas en la eliminación de células infectadas principalmente durante la infección primaria del RSV (Nadal D. & Ogra P. 1990; Garofalo R. et al. 1996). Y en forma pasiva en la eliminación del RSV persistente en animales inmunodeficientes (Kimpfen J. et al. 1992).

Por otra parte las observaciones que sugieren daño ocasionado por la respuesta inmune pueden resumirse en los resultados obtenidos en los años sesenta al intentar vacunar a niños con virus inactivado con formalina (Jeffcoate T. 1969; Kim H. et al. 1969; Kapikian A. et al. 1969), donde los niños que recibieron la vacuna mostraron cuadros más severos a la reinfección que los niños que no habían sido vacunados (Bangham Ch. et al. 1986). En un principio el efecto fue atribuido a la reacción de complejos inmunes (IgG+antígeno) donde se involucraron a los anticuerpo de origen materno (Jeffcoate T. 1969; Nadal D. & Ogra P. 1990), posteriormente, se ha involucrado a la respuesta celular donde se encuentran fuertemente implicadas las células TCD4⁺ (Th2) y presumiblemente estas células causaron el incremento de la enfermedad antes mencionado (Alwan W. et al. 1994), ya que la producción de IL-4 se incrementó, siendo esta una interleucina de acción inflamatoria generada por las células Th2 (Anderson L. et al. 1994; Openshaw P. 1995). Además en modelos experimentales *in vivo*, después de una reinfección y en ausencia de células CD4⁺, el daño histopatológico en el pulmón de ratones BALB/c se ha visto reducido (Connors M. et al. 1994). En cuanto a las células T CD8⁺, se tienen reportes de que causan gran daño en el pulmón principalmente durante la infección primaria (Cannon M. et al. 1988).

Graham B et al. 1991, Alwan W et al. 1992, Alwan W et al. 1994, Openshaw P 1995, Garofalo R, et al. 1996, Hussell T 1996).

Por otro lado, las infecciones por RSV son generalmente acompañadas por infecciones bacterianas secundarias, conduciendo a un curso más severo de la enfermedad (Wahlgreen H. et al 1984; Abramson J. 1988) lo cual puede ser el resultado de diferentes mecanismos: por una parte, el daño al tejido del pulmón durante la infección por RSV facilitando así la adherencia y proliferación de bacterias dentro del pulmón, o bien a que el virus interfiere con la función de defensa inespecífica, alterando las funciones protectoras de células involucradas en esta defensa como los macrófagos, cuyas funciones pueden ser inhibidas por la IL-4 e IL-10 que son producidas durante la infección por RSV (Hussell T 1996). Por lo tanto resulta interesante conocer la interacción RSV-macrófago durante la infección. Además estudios *in vitro* (Panuska J et al 1990) e *in vivo* (Panuska J et al 1992) han descrito que los macrófagos alveolares participan en el curso natural de la infección por RSV en humanos (Franke G et al 1994).

5. Interacción RSV-macrófago

Los macrófagos son una de las principales células infectadas por el virus además de las células epiteliales. Además, se ha demostrado que estas células resultan ser un blanco adecuado para la replicación del virus (Panuska J et al 1990). Por lo tanto, existe una interacción directa entre el RSV y los macrófagos. Los trabajos que se han hecho al respecto corresponden a estudios principalmente con macrófagos alveolares, analizando la interacción virus-célula tanto *in vivo* como *in vitro*. A continuación se describe en forma breve a las células en cuestión.

5.1. Características generales de los macrófagos

Los macrófagos son componentes del sistema fagocítico mononuclear (Auger M. & Ross J. 1992), el cual incluye a los macrófagos de tejido, monocitos y promonocitos de sangre periférica, los cuales son derivados de promonocitos de médula ósea (Hunninghake G et al 1985). Este sistema cumple dos funciones principales:

- Eliminar partículas antigénicas a través de los macrófagos fagocíticos <<profesionales>>.
- Ingerir, procesar y presentar los antígenos a las células T a través de las células presentadoras de antígeno (CPA).

5.1.1. Morfología

Los macrófagos se pueden identificar morfológicamente por microscopía de luz como células grandes, de unos 25-50 μm de diámetro y de superficie irregular. Comúnmente el núcleo no se encuentra en el centro de la célula y su forma es arrionada.

La ultraestructura citoplasmática de estas células revela un citoesqueleto conformado por microtúbulos y microfilamentos, que rodea al núcleo y se reparte ordenadamente por todo el citosol. En la cara interna de la membrana celular se encuentran filamentos de actina que intervienen en la formación de pseudópodos, en la movilidad celular y en los procesos de endocitosis. El citoplasma presenta un complejo de Golgi bien desarrollado, un número variable de vacuolas y vesículas pinocíticas, mitocondrias grandes, y lisosomas asociados a membranas (Auger M & Ross J. 1992).

5.1.2. Funciones

Los macrófagos intervienen en todas las fases de la respuesta inmunitaria. Primeramente, constituyen un mecanismo protector de acción rápida, que puede actuar antes de que se haya producido la amplificación mediada por las células T. Además intervienen en las primeras fases de la activación de las células T, procesando y presentando los antígenos. Finalmente, tras ser activados por las células T, participan en la fase efectora de las respuestas mediadas por células, en donde se comportan como células inflamatorias, antitumorales y antimicrobianas (Rook G 1997).

En forma general, las actividades del macrófago pueden resumirse de la siguiente manera:

- Actividad fagocítica
- Secreción de factores capaces de activar otros componentes inmunológicos del sistema inmune (Welliver R. & Ogra P. 1988).
- Presentación de antígeno a través de las moléculas clase I y II del MHC.

De las actividades anteriores, fueron consideradas dentro de este estudio tanto la actividad fagocítica como la secreción de algunas citocinas como el TNF- α e IL-6.

5.1.2.1. Fagocitosis

En el proceso de fagocitosis el macrófago ingiere materiales de más de 1 μ m de diámetro a través de pseudópodos formados por filamentos de actina y el proceso puede ser inhibido por citocalasina o bien por bajas temperaturas (4°C). Durante la fagocitosis el macrófago es activado, lo que conduce a un incremento en el consumo de oxígeno, en la producción del anión superóxido y peróxido de hidrógeno, en la liberación de varias enzimas como la lisozima y en la producción de factores quimiotácticos para neutrófilos (Humminghake G. et al 1985). Se han descrito dos diferentes mecanismos para fagocitar, en uno de ellos se rodea al material englobándolo con la membrana, y en el otro, el fagocito extiende un brazo que se enrolla a la partícula dando varias vueltas (Speert D. 1992). Para la internalización del material, y posterior unión a las membranas, es necesario un punto inicial de fusión a partir del cual las áreas restantes de las membranas se unan con sus contrapartes (*modelo del zipper*). La fagocitosis se clasifica como específica (mediada por

receptores), o inespecífica cuando los receptores no se conocen. Los macrófagos poseen receptores para distintas moléculas del sistema inmune que median fagocitosis, como los receptores para las inmunoglobulinas del isotipo IgG, y receptores para los componentes del complemento.

5.1.2.2. Receptores Fc γ (Fc γ R)

Los receptores sobre la superficie del macrófago determinan el control de sus actividades, tales como proliferación, diferenciación, activación, reconocimiento, endocitosis, migración y secreción (Auger M & Ross J. 1992).

Existe una gran variedad de moléculas receptoras que median la fagocitosis en el macrófago, principalmente los receptores para inmunoglobulinas y para algunos componentes del complemento, aunque otros receptores como los que reconocen oligosacáridos terminados en manosa, también pueden participar en la fagocitosis. En la **Tabla 1** se enlistan las principales receptores del macrófago que participan en la fagocitosis (Greenberg S. & Silverstein S., 1993; Fearon D., 1994)

Tabla 1. Principales receptores expresados en macrófagos que están involucrados en la fagocitosis (Greenberg S. & Silverstein S., 1993)

LIGANDO	RECEPTOR
IgG2a e IgG3	Fc γ RI (CD64)
IgG1, IgG2b	Fc γ RII (CDw32)
IgG1, IgG2a, IgG3	Fc γ RIII (CD16)
IgE	Fc ϵ RII (CD23)
IgA	Fc α RIII
C3b, C4b, iC3b	CR1 (CD35)
iC3b	CR3
Oligosacáridos con residuos de manosa	Receptor manosa

Los receptores Fc γ (Fc γ R) reconocen el dominio Fc de la inmunoglobulina G. Estos receptores están involucrados en un número de funciones celulares incluyendo la generación de señales transmembranales, conduciendo a la reorganización de los filamentos del citoesqueleto al sitio de unión facilitando la fagocitosis, producción de anión superóxido, liberación de varias citocinas y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Greenberg S. & Silverstein S., 1993).

En la actualidad, se conocen tres grupos de receptores IgG humana en la superficie celular: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16). Todos ellos se caracterizan por presentar dominios extracelulares que muestran una considerable homología con las regiones V de las inmunoglobulinas, es decir, pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y expresan dos (FcγRII y FcγRIII) o tres (FcγRI) dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina. Varios de estos receptores se encuentran formando complejos con diversas subunidades, unidas entre sí mediante enlaces disulfuro. Tanto FcγRI como FcγRIIIa se encuentran asociados a dímeros de cadenas γ, que se descubrieron inicialmente formando parte del complejo FcεRI de alta afinidad. También se ha observado la unión entre FcγRIIIa y dímeros de cadenas ζ del complejo TCR-CD3. En el caso de FcγRIIIa, estas subunidades se pueden asociar dando lugar a homodímeros (γ-γ o ζ-ζ) o a heterodímeros (γ-ζ). Parece que son esenciales para la expresión en la superficie celular y en la transducción de señales. En el caso de las interacciones con FcγRI, se cree que el receptor se une a una estructura situada alrededor de la Leu 235 del dominio CH2 de la IgG1, IgG3 e IgG4 (Turner M., 1997).

Los monocitos de humano no estimulados expresan aproximadamente 10.000 a 40.000 moléculas de FcγRI (72 kDa) sobre su superficie, esta expresión es aumentada por varios factores como el INFγ, glucocorticoides y el componente del complemento C5a. La característica que distingue FcγRI de otros receptores Fcγ es su relativamente alta afinidad a la porción Fc de de IgG [K_d de 10^8 - 10^9 M⁻¹ en humanos y 10^7 - 10^8 M⁻¹ en el ratón], su sensibilidad a la tripsina (sólo en FcγRI murina) y su reconocimiento por anticuerpos monoclonales. FcγRI une IgG2a monomérica murina así como IgG3. Además de su importancia en la fagocitosis este tipo de receptor induce la producción de TNF-α y de anión superóxido y en la ADCC por monocitos (Greenberg S & Silverstein S., 1993; Turner M. 1997).

El receptor FcγRII (40-50 kDa) es expresado en monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, plaquetas y células B. La expresión en superficie de FcγRII varía de aproximadamente 30.000 en neutrófilos a casi 260.000 receptores en el macrófago alveolar humano. Se une con baja afinidad ($<10^7$ M⁻¹) exclusivamente a las IgG que se encuentran formando complejos o están polimerizadas. FcγRII une preferencialmente (pero no exclusivamente) IgG1 y IgG2b murina. FcγRII además media ADCC y la producción de anión superóxido y TNF-α (Greenberg S. & Silverstein S., 1993; Turner M. 1997).

FcγRIII está altamente glicosilado, una característica única de este receptor es su expresión como un proteína de transmembrana (FcγRIIIa) y como una proteína unida por fosfatidilinositol glicano (PIG) (FcγRIIIb). Su isoforma FcγRIIIa (53 kDa) es expresada por los macrófagos (pero no por monocitos), células asesinas naturales (NK), y una subpoblación de linfocitos T periféricos. FcγRIIIb es expresado en neutrófilos. Los receptores FcγRIII interactúan tanto con la IgG monomérica como con la que se

encuentra formando complejos (afinidad $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$). Reconoce IgG2a, IgG3 e IgG1 murinas. Aproximadamente 120.000 copias del FcγRIII son expresadas sobre la superficie de neutrófilos humanos (Auger S. & Ross S., 1992; Fearon D., 1994; Indik Z. et al., 1995; Turner M., 1997).

5.1.2.3. Monocinas

Los macrófagos son responsables de la secreción de muchas citocinas que participan en el control de la respuesta inmune amplificando la respuesta local a la infección. El término citocina incluye a las que protegen al organismo de infecciones virales y a las que inician la reacción inflamatoria para proteger de infecciones por bacterias (Abbas A. et al., 1995). Las citocinas son proteínas (generalmente glucoproteínas) de masa molecular relativamente pequeña (raramente mayor de 8-25 kDa) y que suelen estar formadas de una sola cadena (Feldman M., 1997). Su síntesis es estimulada cuando los macrófagos reconocen microbios o sus componentes. Se les denomina monocinas porque son producidas principalmente por células de la serie monocito-macrófago y son un diverso grupo de moléculas que incluyen interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interleucina 12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) (Auger M. & Ross J., 1992; Gray D., 1994)

a). TNF-α

La actividad biológica de esta proteína está en función de la cantidad producida en respuesta a estímulos A concentraciones bajas (10^{-9} M), el TNF-α dentro de la respuesta inflamatoria actúa localmente como un regulador paracrina y autocrino de los leucocitos y células endoteliales, ya que su acción es a través del estímulo en la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales vasculares, activa neutrófilos, eosinófilos y fagocitos mononucleares y estimula fagocitos mononucleares y a otros tipos de células a producir citocinas (IL-1, IL-6, TNF-α y quimiocinas). Ejerce un efecto protector similar al de interferón contra los virus e incrementa la expresión de las moléculas de clase I y II del MHC, aumentando la lisis por las células CTL de las células infectadas por virus (Auger M. & Ross J., 1992).

Los macrófagos producen TNF-α en respuesta a las infecciones virales y bacterianas, así como al contacto con células extrañas y tumorales. Las bacterias gram negativas son las que inducen la síntesis de TNF-α a concentraciones más altas debido a las moléculas de lipopolisacárido (LPS) como su componente activo (Abbas A., 1995).

El principal efecto local del TNF-α es iniciar una respuesta inflamatoria, la cual es caracterizada por dolor, rubor, calor e hinchazón en el sitio de la infección, refleja dos tipos de cambios inducidos por TNF-α en los vasos sanguíneos locales. El primero de estos es un incremento en el diámetro vascular, lo que conduce a un

incremento del flujo sanguíneo (calor y rubor) y de la permeabilidad vascular, conduciendo a la acumulación local de fluido (hinchazón y dolor) además de la acumulación de inmunoglobulinas y otras proteínas de la sangre. El segundo efecto del TNF- α sobre el endotelio es inducir la expresión de moléculas de adhesión que se unen a la superficie de los monocitos circulantes y leucocitos polimorfonucleares y aumenta la velocidad a la cual estas células fagocíticas migran a los tejidos a través de las paredes de los vasos sanguíneos. En los primeros minutos de la infección, el TNF- α induce la expresión en el endotelio de las moléculas de adhesión P-selectinas y pocas horas después las E-selectinas. Estas moléculas reconocen epítopos de carbohidrato (sialyl-Lewis^x) en las glicoproteínas de los leucocitos. La interacción de las selectinas con estas glicoproteínas de superficie conduce a una débil adhesión de los leucocitos a la pared de los vasos sanguíneos, de tal manera que los leucocitos "ruedan" a lo largo del endotelio que ha sido tratado con las citocinas inflamatorias. Esta débil interacción adhesiva permite que otras interacciones más fuertes se lleven a cabo. Posteriormente, el TNF- α induce también la molécula ICAM-1 en las células endoteliales la cual reacciona con las integrinas LFA y Mac-1, las cuales son expresadas sobre la superficie de los fagocitos. Estas integrinas tienen una baja afinidad por ICAM-1, pero IL-8 y otras monocinas liberadas por los macrófagos estimulados provocan un cambio conformacional en LFA-1 y Mac-1 sobre los leucocitos rodantes que incrementa la afinidad por ICAM-1. En consecuencia los leucocitos se unen firmemente a endotelio para dejar de rodar. Después, los leucocitos cruzan la pared endotelial o se extravasan involucrándose a PECAM o CD31, la cual es expresada tanto en los leucocitos y en las uniones de las células endoteliales. Estas interacciones entre leucocitos y las células endoteliales finalmente capacitan al fagocito para cruzar la pared endotelial, por un proceso llamado diapedesis, y entran al sitio de la infección. Por último, la migración de los leucocitos se lleva a cabo a través del tejido bajo la influencia de la IL-8 y otras moléculas relacionadas (Gray D. 1994).

El TNF- α puede también entrar en el torrente sanguíneo si el estímulo es lo suficientemente fuerte, donde puede actuar como hormona endocrina. Actúa sobre células de regiones reguladoras del hipotálamo para inducir fiebre, como consecuencia de la síntesis aumentada de prostaglandinas, estimula la secreción de IL-1 e IL-6 en fagocitos mononucleares y quizás en células endoteliales, aumenta la síntesis de proteínas séricas en hepatocitos y activa el sistema de coagulación en el endotelio vascular.

A concentraciones extremadamente altas el TNF- α puede ser mortal provocando un síndrome similar al choque endotóxico (Auger M & Ross J., 1992; Abbas A., et al. 1995).

La liberación sistémica del TNF- α causa vasodilatación y pérdida del volumen plasmático incrementando la permeabilidad vascular, conduciendo a shock. En el shock séptico, la coagulación intravascular diseminada es además provocada por TNF- α conduciendo a la generación de microtrombos y el consumo de proteínas coagulantes, de

tal manera que la actividad del paciente para coagular la sangre se pierde. Esta condición frecuentemente conduce a la falla de órganos vitales tales como el riñón, hígado, corazón y pulmones, los cuales son rápidamente comprometidos por la falla de perfusión normal, y consecuentemente el shock séptico tiene una alta velocidad de muerte (Gray D 1994).

b). IL-6

Denominada previamente factor de diferenciación de las células B o factor estimulante de los hepatocitos, es producida por muchos tipos de células, entre las que se encuentran las células T, los macrófagos, las células B, los fibroblastos y las células endoteliales. Ejerce acciones sobre la mayoría de las células, pero su función más importante es la inducción de la diferenciación de las células B, para dar lugar a las células productoras de anticuerpo. A nivel hepático estimula la producción de proteínas que contribuyen a la respuesta de fase aguda como el fibrinógeno, proteína C reactiva (RCP) y proteína que se une a residuos de manosa (MBP). Las RCP y MBP que reconocen componentes comunes de las membranas microbianas (fosforilcolina y residuos de manosa respectivamente), se unen a las bacterias actuando como opsoninas o bien, activan la cascada del complemento lo que conduce a la lisis del microorganismo (Auger M. & Ross J. 1992, Gray D 1994, Abbas A. et al. 1995, Feldman M. 1997).

El receptor de la IL-6 consta de una proteína de unión de 60 kDa y una subunidad transductora de la señal de 130 kDa. La proteína de unión contiene un dominio de Ig y una estructura característica de receptores triptófano-serina-X-triptófano-serina, que interacciona con las citocinas que comparten un patrón de plegamiento en hélice.

Además de estas acciones bien descritas, experimentos *in vitro* sugieren que el IL-6 puede ser un co-estimulador de las células T y de timocitos. La IL-6 sirve también como co-factor de otras citocinas para la proliferación precoz de células madre hematopoyéticas en la médula ósea. Finalmente, debe señalarse que una de las primeras actividades adscritas a la IL-6, la del interferón, no se ha confirmado utilizando preparaciones recombinantes de IL-6, habiéndose abandonado el otro nombre de INF- β_2 para esta citocina (Abbas A. et al 1995).

6. Alteraciones en los macrófagos ocasionadas por infección aguda con RSV

Existen reportes recientes en modelos experimentales *in vitro*, donde se ha estudiado el efecto de la infección aguda del virus sobre las funciones del macrófago. En la **Tabla 2**, se resumen los resultados obtenidos en nueve investigaciones relacionadas, los cuales serán discutidos en la sección correspondiente. En dicha tabla se observa que la concentración de TNF- α en macrófagos alveolares se incrementó por la infección con RSV, en cambio disminuyó en las células de sangre periférica humana. La concentración

de IL-1 e IL-6 también se incrementó. De tres reportes la concentración de IL-8 aumentó en dos de ellos. La fagocitosis no mediada por receptores FcγR se vió disminuída, así como la producción de los reactivos intermediarios metabólicos del oxígeno. Finalmente la expresión de la región del MHC clase II se vió incrementada (Becker S et al 1991, Cirino N et al 1993, Franke G et al 1994, Franke G et al 1995, Midulla F. et al. 1993, Arnold R et al. 1995, Panuska J et al. 1995, Roberts N et al. 1986).

TABLA 2. Diferentes efectos por infección aguda *in vitro* del RSV en macrófagos

MACRÓFAGOS	INF-α	IL-1	IL-6	IL-8	IL-10	INF-γ	F.I.	R.O.I.	MHC II
^{1,2} Alveolares murinos (BALB/c)	↑	↑	↑			↑	↓	↓	
³ Alveolares murinos (BALB/c)		↑							
⁴ Alveolares humanos	↑		↑	↑					
⁵ Alveolares humanos									↑
⁶ Alveolares humanos	↑	↑							↑
⁷ Alveolares humanos	↑	SC		↓	↑				
⁸ Sangre periférica humanos		↑							
⁹ Sangre periférica humanos	↓		↑	↑					

NOTA: ↑=aumento; ↓=disminución; SC=Sin cambio. F.I = Fagocitosis inespecífica (no mediada por receptores Fcγ); INF-1= Interferón tipo 1. ROI= Reactivos intermediarios metabólicos del oxígeno. MHC II=Complejo principal de histocompatibilidad clase II

1 Franke G et al 1994. 2 Franke G et al 1995. 3 Standik A et al 1997. 4 Becker S et al 1991. 5 Cirino N et al 1993. 6 Midulla F. et al 1993. 7 Panuska J et al 1995. 8 Roberts N et al. 1986. 9 Arnold R. et al 1995

Por otra parte se tienen datos *in vivo* de la producción de TNF-α e IL-6 en secreciones nasofaríngeas en infantes y niños pequeños (19 días a 16 meses) infectados por el virus, donde la producción de TNF-α aumenta en la fase aguda de la enfermedad y declina posteriormente hasta cantidades casi indetectables. En niños menores de 5 meses la IL-6 también registra una actividad más alta durante la fase aguda de la infección disminuyendo después, pero en niños mayores permanece el incremento, alcanzando un pico al inicio de la convalecencia. Dichas observaciones sugieren que la citocinas son producidas *in vivo* en infantes y niños en respuesta a la infección primaria por RSV y pueden estar involucradas en la patogénesis de la enfermedad (Matsuda K. et al 1995).

Cabe mencionar también la existencia de estudios con el virus sincitial respiratorio bovino (BRSV) por la similitud que tiene este virus con el RSV humano. Olchowoy T. y cols. estudian el efecto del BRSV en un modelo de infección aguda *in vivo* utilizando macrófagos alveolares de terneras. Estos autores reportan disminución en la fagocitosis inespecífica y en la fusión fagolisosoma, además observan un aumento en la expresión de los receptores FcγR y en la actividad fagocítica mediada por receptores FcγR. No

encuentran un cambio significativo en la producción de los reactivos intermediarios del OXIGENO (Olechov T. et al. 1993).

7. Infección persistente por RSV

A pesar de que la persistencia *in vivo* en humanos no ha sido totalmente demostrada, existe una serie de evidencias circunstanciales que así lo sugieren.

Se le ha asociado con la enfermedad de Paget, la cual es una enfermedad degenerativa de huesos, demostrando la presencia de antígeno viral en forma de cuerpo de inclusión en osteoclastos, tanto en biopsias como en células cultivadas de lesiones de pacientes (Mills B. et al. 1981; Mills B. et al. 1984; Mills B. & Singer F. 1987), así como también la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus en individuos con esta enfermedad (Pringle C. et al. 1985). Cabe señalar que la enfermedad de Paget se encuentra postulada entre las enfermedades ocasionadas por persistencia viral (Haywood A. 1986).

Krivitskaia V. y cols. detectan la persistencia del RSV en pacientes con bronquitis obstructiva crónica y bronquitis recurrente (Krivitskaia V. & Iakovleva N. 1992; Krivitskaia V. et al. 1996).

Por otra parte, con la finalidad de explicar las frecuentes reinfecciones del RSV en infantes, se han diseñado modelos experimentales de persistencia *in vivo* en cobayos. Se ha mostrado que las proteínas y el RNA genómico del RSV persisten en células del pulmón después de la resolución de la bronquiolitis aguda, por lo que se sugiere que la persistencia del virus dentro de los macrófagos alveolares puede contribuir a la patogénesis de la inflamación bronquiolar crónica (Hegele R. et al. 1994). Streckert H. y cols. reportan persistencia del genoma del RSV en cobayos después de 6 meses de la infección, a pesar de encontrar altos títulos de anticuerpos neutralizantes, interpretando que la persistencia viral se mantiene a pesar de la presencia de anticuerpos neutralizantes (Streckert H. et al. 1996).

Dakhama y cols. demuestran además que el RSV puede persistir en forma infecciosa y replicarse en cobayos inmunocompetentes. Durante dicha infección persistente, obtienen títulos elevados de anticuerpos IgG1 (equivalentes a la IgE en humanos) RSV-específicos, los cuales juegan un rol predominante en las respuestas alérgicas en estos animales. En el humano se ha demostrado la producción elevada de anticuerpos IgE RSV-específicos en niños con bronquiolitis aguda. Por lo tanto, se podría sugerir que el RSV pudiera actuar por sí mismo como alérgeno y que además la persistencia crónica de RSV en el pulmón junto con la respuesta de IgE RSV-específicos pueden ser factores importantes en la patogénesis de asma en niños infectados con RSV (Dakhama A. et al. 1997).

También se ha establecido la persistencia del RSV en modelos *in vitro*, utilizando células linfoides BCL (Bangham C.h. & McMichael A. 1986), y no linfoides BS-C-1 (Pringle C et al. 1978), HEp-2 (Balldridge P et al. 1976), HeLa (Yankevich O & Dreizin R. 1977) y células de ratón BALB/c (Ferne B. et al. 1981).

Con base a los antecedentes mencionados y tomando en cuenta la ausencia de trabajos relacionados con la respuesta del macrófago en una infección persistente por el RSV, decidimos diseñar un modelo de persistencia *in vitro* utilizando la línea celular parecida a macrófagos P388D₁ infectada con la cepa Long del RSV. En tal modelo proponemos determinar las alteraciones ocasionadas por la persistencia del virus en el macrófago.

HIPÓTESIS

La persistencia y expresión del genoma del virus sincitial respiratorio altera las funciones inmunes en macrófagos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el efecto ocasionado por la persistencia del virus sincitial respiratorio (RSV) en las funciones inmunes en macrófagos.

Objetivos Específicos

1. Comprobar la persistencia del RSV en la célula.
2. Comparar las siguientes funciones de los macrófagos en un cultivo persistentemente infectado con RSV versus el cultivo control (células no infectadas):
 - a) *Fagocitosis específica (mediada por FcγR)*
 - b) *Fagocitosis inespecífica (no mediada por FcγR)*
 - c) *Receptores FcγII y FcγIII*
 - d) *Producción de Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α)*
 - e) *Producción de Interleucina 6 (IL-6)*

METODOLOGÍA

1. Virus

1.1 Virus Sincitial Respiratorio (RSV) cepa Long (*American Type Culture Collection VR-26*).

Aislada por Chanock en 1963 de un niño con infección aguda del tracto respiratorio bajo. Donado por el Dr. M. Trudel (Instituto Armand Frappier, Ville de laval, Canadá). El RSV se recibió en el laboratorio en células HEp-2 infectadas. El sobrenadante obtenido se propagó nuevamente en células HEp-2.

2. Células

2.1 Línea celular P388D₁(IL-1) (*American Type Culture Collection. TIB 63*).

Obtenida por Dawe y Potter, derivada de un neoplasma linfoide (P388) inducido en ratón DBA/2 (H-2^d) con metilclorantreno. Presenta características morfológicas y funcionales similares a las del macrófago, especialmente una alta producción de IL-1. Fué donada a nuestro laboratorio por el Dr. A. Tingle (Universidad de Columbia Británica, Vancouver, Canadá.). Las células fueron mantenidas en RPMIc.

2.2. Línea celular HEp-2 (*American Type Culture Collection. CCL 23*).

Establecida por Moore, Sabachewsky y Toolan después de inducir la propagación de células de carcinoma epidermoide de laringe humana en ratas inmunosuprimidas. Fué proporcionada por el Dr. M. Trudel (Instituto Armand Frappier, Ville de Laval, Canadá). Las células se propagaron en MEMc

2.3. Línea celular L929 (*American Type Culture Collection. CCL 1*).

Obtenida por Sanford, Earle y Likely. La cepa parental L fué derivada de tejido aereolar subcutáneo normal y adiposo de ratón C3H/An, y la clona 929 fué establecida de la 95va generación de la cepa parental. Fué gentilmente proporcionada por el Dr. Alejandro Zentella (Instituto Fisiología Celular,U.N.A.M). Esta línea presenta una morfología similar a fibroblastos, así como el receptor para TNF α y β . Las células fueron propagadas en MEMc.

2.4. Hibridoma 2.4G2 (*American Type Culture Collection, HB 197*)

Esta línea se obtuvo fusionando células de mieloma P3U1 con células esplénicas de ratas Sprague-Dawley, las cuales fueron inmunizadas con la línea celular de macrófagos murinos J774. El hibridoma secreta un anticuerpo monoclonal de rata (IgG2b) que reacciona con los receptores Fc- γ de ratón (FcRII y FcRIII) ya que inmunoprecipita los receptores Fc- γ de 50 a 70 KDa expresados en macrófagos. El hibridoma fue mantenido en medio MEMc. El anticuerpo fue proporcionado por el Dr. Enrique Ortega (Instituto de Investigaciones Biológicas, U.N.A.M.).

3. Propagación del virus

La propagación del virus se hizo en monocapas semi-confluentes de células HEp-2 en botellas de 162 cm², las células se infectaron con el RSV a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 1.0 en medio MEMi suplementado con SFB al 2% y 1% de antibióticos. Después de 2 horas de adsorción a 37°C/5% CO₂, el sobrenadante (virus no adsorbidos) se retiró y se reemplazó por medio MEMi al 2% de SFB y 1% de antibióticos. El sobrenadante se recolectó después de transcurridas 48 horas post-infección o hasta observar efecto citopático, se eliminaron los restos celulares por centrifugación (1500 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente), se tituló y se distribuyó en alícuotas de 1.5 ml aprox., agregándoles MgSO₄ a una concentración final de 0.1 M para estabilizar la infectividad del virus. (*Ferne B & Germ J. 1982*). Por último, los viales se marcaron con la fecha, número de lote y título viral correspondiente. Se guardaron a -70 °C.

4. Titulación del virus

El virus se tituló por dosis infectiva 50 (TCID₅₀) (*Payment P. & Trudel M. 1993 (a)*), la cual se refiere a la cantidad de virus que produce efecto citopático en el 50% de los pozos infectados. Para su realización se sembraron células HEp-2 en una placa de 96 pozos, una vez alcanzada la confluencia celular, las células se infectaron con las diluciones de la suspensión de virus que se deseó titular. Las diluciones del virus se hicieron 1:3 en serie en medio MEMi al 2% de suero fetal bovino. Se utilizaron 4 pozos por dilución. El título se calculó por el método de Kärber de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$TCID_{50} = -\Delta \cdot \delta(S-0.5)$$

Donde:

Δ : es el log₁₀ de la última dilución donde el 100% de los pozos presentaron efecto citopático.

δ : es el log₁₀ del factor de dilución.

S: es la suma de los pozos que presentaron el efecto citopático por dilución incluyendo aquella en donde el porcentaje es 100%, dando a esta última el valor de 1 y a las otras la fracción correspondiente (1/4=0.25).

5. Propagación de la línea celular HEP-2

Esta línea celular se propagó en medio MEMc, donde una vez alcanzada la confluencia celular en botellas de 25 cm² las células fueron tratadas con 5 ml de EDTA durante 15 minutos, y después tripsinizadas con 0.3 ml de tripsina (0.1% en PBS) y una vez resuspendidas totalmente, se adiciono medio MEMc. El 50%, se pasó a una botella nueva o bien se centrifugó y el botón celular fué congelado a -70C en 500µl de medio para congelar (90% SFB y 10% DMSO).

6. Propagacion de la línea celular L929

Esta línea celular fué propagada de forma similar a las células HEP-2, utilizando verseno con tripsina al 0.1% para desprender las células. Para congelarlas se utilizó medio MEMc/10% de DMSO (Payment P & Trudel M, 1993 (c)).

7. Propagacion del cultivo persistente

El cultivo persistentemente infectado con RSV fué establecido por el grupo de trabajo del laboratorio virologia de la Facultad de Medicina a partir del mes de mayo de 1995. Brevemente, este cultivo se obtuvo infectando macrófagos P388D₁ a una m.o.i. de 1.0, las células que sobrevivieron a la infección se propagaron a través de pases sucesivos. En este proyecto se empezó a trabajar aproximadamente a partir del pase 12. Para la propagación celular se trabajo de la siguiente manera: una vez alcanzada una confluencia celular del 80% en la placa de cultivo (100 mm), el medio fué retirado y sustituido por medio RPMIc, las células fueron resuspendidas por pipeteo, y el 50% (1.5x10⁶ células aprox.) fueron pasadas a una caja nueva (100 mm). El 50% restante se mantuvo en la placa original agregándole medio RPMIc marcando las placas de acuerdo al número de pase y fecha o bien se centrifugó y el botón celular fué congelado en 500µl de suero para congelar (90% SFB y 10% DMSO) a -70°C.

8. Conteo de células

Las células fueron contadas con azul de tripano bajo el criterio de que las células viables tendrán la habilidad de excluir el colorante y sólo penetrará en las células no viables. (Payment P. & Trudel M, 1993 (b)). Una vez obtenida la suspensión celular que se requiere contar, en un tubo 13X100mm se disponen 0.1ml de colorante azul de tripano (1% en PBS) y 0.4 ml de la suspensión celular. De la mezcla anterior se dispone una gota en una cámara de Neubauer con una pipeta Pasteur. Se cuentan las células no teñidas dentro la sección central (25 cuadros). Las células viables/ml serán calculadas aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Células no teñidas} \times 10,000 \times 5/4 = \text{células/ml}$$

Donde: El factor de 10.000 corresponde a una constante de acuerdo al volumen contado en la cámara y 5/4 al factor de dilución de la mezcla.

9. Determinación de la persistencia del RSV en los cultivos celulares

9.1. Detección de proteínas virales por inmunofluorescencia indirecta

La determinación de antígenos virales en las células infectadas se hizo de acuerdo al método descrito por García-Barreno y cols. (García-Barreno B. et al. 1988) con algunas modificaciones. Para este ensayo, se utilizaron portaobjetos para cultivo celular de 8 pozos, los cuales fueron tratados con polilisina, favoreciendo de esta manera la unión de las células a la superficie del portaobjetos. Para lo anterior se dispusieron 500 μ l/pozo de polilisina (10 μ g/ml) durante 20 minutos a temperatura ambiente, se hizo un lavado con PBS y se dejó secar. Posteriormente se dispusieron 1×10^6 células/pozo de macrófagos persistentemente infectados o sin infectar durante 10 minutos a 37°C/5% CO₂. Después del tiempo de incubación se lavó una vez con agua destilada y se fijaron las células, para lo cual se introdujo el portaobjetos en metanol a -20°C por 5 minutos e inmediatamente después en acetona durante 30 segundos a la misma temperatura. La preparación se secó al aire y después se bloqueó el reconocimiento inespecífico con 100 μ l/pozo de suero de caballo sin diluir, incubando toda la noche a 4°C. Se lavó 2 veces con PBS y se agregó el anticuerpo anti-RSV (1:100 en PBS/0.25% BSA) incubándose por 30 minutos a temperatura ambiente. Enseguida, se hicieron 2 lavados con PBS (para cada lavado se mantuvo la placa en agitación constante durante 10 minutos) y se agregó un anticuerpo secundario marcado con fluoresceína (1:500 en PBS/0.25% BSA) incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados con PBS de la misma forma anterior. Finalmente la placa se lavó de manera abundante con agua destilada y se mantuvo protegida de la luz, hasta que se observó en el microscopio invertido Nikon Diaphot.

9.2. Amplificación del gen que codifica para la proteína N del virus a través de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

9.2.1. Extracción de RNA celular total

La extracción se hizo modificando el método de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski P. & Sacchi N. 1987). Brevemente, las células del cultivo persistente y no infectado se resuspendieron por pipeteo, se colocaron en un tubo Eppendorf y se centrifugaron por 5 segundos en la microfuga (15 000 r.p.m.). El botón celular se lavó 2 veces con PBS y a las células obtenidas se les agregó 250 μ l de solución D (Isotiocianato de guanidina 4M, N-lauril sódico 0.5%, citrato de sodio 2mM pH 7.0. Se adiciona 1mM de 2-mercaptoetanol en el momento de uso), se agitó en vortex durante 10 segundos y la mezcla se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 500 μ l de fenol saturado en agua, 500 μ l de acetato de sodio 2M (pH 4.0) y 100 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico 25:1. Se agitó en vortex durante 10 segundos y se centrifugó entre 10 y 15 minutos en la microfuga a temperatura ambiente. Se obtuvo el sobrenadante y se adicionaron 500 μ l de isopropanol frío. La mezcla se mantuvo toda la noche a -20°C para precipitar la mayor cantidad de RNA. Después se centrifugó 10

minutos en la microfuga y se eliminó el sobrenadante para obtener una pastilla en el fondo del tubo. La pastilla se lavó dos veces con 200 µl de etanol tetanol al 75% y se disgregó suavemente con la punta de la micropipeta, ya una vez hechos los lavados, la pastilla se dejó secar. Por último el precipitado final se resuspendió en 20 µl de agua tratada con dietil pirocarbonato (agua-DEPC) para eliminar las posibles RNAsas.

Posteriormente, para verificar que el RNA obtenido no estuviera degradado, se hizo una electroforesis con un gel de agarosa al 1.2% en solución amortiguadora TBE 1X, adicionando bromuro de etidio (0.5 µg/ml). De cada muestra se tomaron 3 µl del RNA obtenido y 3 µl del colorante de muestra (EDTA 0.2M; ficoll 400 25% y azul de bromofenol al 0.1%). El gel se corrió en solución amortiguadora TBE 1X a 80 Volts, durante 40 minutos. Para determinar la concentración de RNA obtenido, se hizo una dilución de la muestra 1:100 en TBE 1X y se hicieron las lecturas correspondientes a 260nm, cada lectura se multiplicó por el factor de dilución (100) y luego por 20, ya que 1 D.O. corresponde a 20 µg/ml de RNA. Las muestras se guardaron a -20°C.

9.2.2. RT-PCR

En un tubo Eppendorf de 650 µl se colocaron: 3-5 µg de la muestra de RNA para amplificar, 4 µl de amortiguador de reacción 5X, 2 µl de 100 mM dithiothreitol, 2 µl de la mezcla de deoxinucleósidos trifosfato (dNTP) (10mM de cada dNTP), 0.5 µl (20U) de inhibidor de RNAsa y el volumen final se completa a 20 µl con agua-DEPC. Después de la adición de 50 µl de aceite mineral, la mezcla fue incubada a 80°C durante 5 minutos y enfriada inmediatamente en hielo, después se agregaron 20 pmol del iniciador 2 y se incubó a 60°C durante 10 minutos. La mezcla fue enfriada por 5 minutos en hielo y después se le agregó 1 µl (200 U) de transcriptasa reversa, la mezcla fue incubada a 37°C por 60 minutos y después a 99°C por 2 ½ minutos.

A un volumen aproximado de 20 µl el cual corresponde al producto total de transcripción, se le agregó 8 µl del amortiguador 10X para PCR, 40 pmol de los dos iniciadores para el gen N (sentido y antisentido) y 0.5 µl (25 U) de la Taq polimerasa (*Thermus aquaticus*). La mezcla se cubrió con 50 µl de aceite mineral para evitar su evaporación durante la amplificación y el tubo se introdujo en el termociclador de DNA (*PERKIN-ELMER*) hasta completar 35 ciclos de amplificación (cada ciclo: 94°C por 1 min.; 65°C por 1 ½ min.; 72°C por un min. y 72°C por 7 min.). Después, se confirmó la amplificación para lo cual se tomaron 10 µl del producto obtenido y se corrió un gel de agarosa de manera similar que para la extracción del RNA. La banda de DNA problema debió ser de 278 pb. El peso molecular de la banda amplificada se calculó de acuerdo a los marcadores de peso molecular estándar. El resto se matuvo a -20°C. Los iniciadores que se utilizaron fueron diseñados para amplificar una región entre los nucleótidos 858-1135 del gen N del RSV humano (*Cane P et al 1991*). Los iniciadores 1 y 2 corresponden a las siguientes secuencias:

iniciador 1 (RNAm sentido) 5'GGAACAAGTTGTTGAGGTTTATGAATATGC3'
iniciador 2: (RNAm antisentido) 5'CTTCTGCTGTCAAGTTCTAGTACACTGTAGT3'

10. Microensayo para la determinación de proteínas

Se utilizó el método colorimétrico de Bradford cuya intensidad es función de la concentración de aminoácidos, ya que el colorante se une principalmente a residuos de aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos, obteniéndose el cambio de color del azul brillante de Coomassie G-250 en respuesta a varias concentraciones de proteínas (*Bradford M., 1976*).

El microensayo se hizo agregando 50 µl/pozo de detergente (0.05% Tritón X-100) sobre las células contenidas en la placa de 96 pozos, de cada uno de ellos se tomaron 10 µl y se transfirieron a otro pozo limpio, como blanco se utilizaron 10 µl del detergente y a todos los pozos se les agregó 200 µl/pozo del reactivo de color (diluido 1:5 en agua destilada). Paralelamente se realizó una curva patrón, diluyendo BSA en concentraciones conocidas en 0.05% Tritón X-100. La lectura de la placa se hizo 5 minutos después de iniciada la reacción en un lector de ELISA (*BIOTEK # EL307C*) a 495 nm. Las lecturas obtenidas se extrapolaron a la curva patrón y se multiplicaron por la cantidad de microlitros totales, calculando así la concentración de proteínas (mg/ml) en cada pozo.

11. Determinación de la actividad fagocítica

El ensayo colorimétrico utilizado en la determinación de este parámetro, se basa directamente en la actividad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina (Hb) contenida en los eritrocitos fagocitados por el macrófago, la cual cataliza la aparición de un producto colorido a partir de la 3,3'-Diaminobenzidina (DAB), en presencia de peróxido de hidrógeno. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de Hb.

11.1. Obtención de eritrocitos

En condiciones de esterilidad, se obtuvieron 20 ml de sangre de camero joven. Inmediatamente después se mezcló con una solución de Alsevers en proporción de 1:1.5 y 0.02% de azida de sodio. Los eritrocitos se conservaron a 4 °C por un periodo no mayor de 6 semanas.

11.2. Sensibilización de eritrocitos

La sensibilización de los eritrocitos se basó en la reacción dada entre el hapteno 2,4,6'-TNBS y los grupos amino libres de las proteínas en la superficie de los eritrocitos. Bajo las condiciones ligeramente alcalinas del proceso, se libera un grupo sulfónico quedando el grupo 2,4,6'-TNP unido covalentemente a la célula.

Para la sensibilización se disolvieron 3.2 mg de TNBS en 3.5 ml de BBS, para mezclarse con 400µl del paquete globular de los eritrocitos de camero, los cuales fueron

previamente lavados 2 veces con DGVB²⁺ (resuspendiendo el botón celular en 5ml de DGVB²⁺ y centrifugando 5 minutos a 1500 r.p.m. en cada lavado). La suspensión se mantuvo en oscuridad agitándose suavemente durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para retirar el exceso de TNBS libre, se hicieron nuevamente 2 lavados con DGVB²⁺. El botón celular resultante se resuspendió a una concentración del 2% en DGVB²⁺.

11.3. Titulación del anticuerpo anti-DNP

Tomando en cuenta que gran parte de los anticuerpos específicos dirigidos contra el hapteno 2,4'-DNP tienen reacción cruzada con los grupos 2,4,6'-TNP, se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-DNP (IgG2b) denominado 4F8 (obtenido y proporcionado por el laboratorio del Dr. Enrique Ortega).

El anticuerpo fue titulado por ensayos de hemaglutinación, utilizando placas de 96 pozos con fondo en V, donde se hicieron diluciones seriadas del anticuerpo con DGVB²⁺. A 25 µl de cada dilución del anticuerpo se agregaron 25 µl de la suspensión al 2% de los eritrocitos previamente sensibilizados, el contenido de los pozos se mezcló cuidadosamente y se dejó sedimentar (aproximadamente 30 minutos sobre una superficie húmeda). Los eritrocitos aglutinados se sedimentaron en forma de malla, en cambio los no aglutinados como un botón en el fondo del pozo. Los controles fueron 25 µl de DGVB²⁺ y 25 µl eritrocitos no sensibilizados. El título se calculó de acuerdo a la última dilución que presentó aglutinación.

11.4. Oponización de eritrocitos

La primera dilución no aglutinante del anticuerpo 4F8 se consideró como la concentración adecuada para la oponización (Bright S., 1986), de esa manera se evitó la formación de agregados celulares que difícilmente podrían fagocitarse.

La oponización se llevó a cabo mezclando la suspensión de eritrocitos sensibilizados, con la cantidad de anticuerpo según el título obtenido. La mezcla se incubó en agitación constante y protegida de la luz por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los eritrocitos se lavaron dos veces con DGVB²⁺ y el botón fue resuspendido a una concentración del 1% en medio RPMI. Los eritrocitos se oponizaron para cada ensayo y el volumen que se utilizó estuvo en función de los requerimientos del ensayo a realizar.

11.5. Ensayo colorimétrico para cuantificar la fagocitosis específica mediada por receptores Fc_γ

En placas de 96 pozos se sembraron 1×10^5 células/pozo (P388D, no infectadas o persistentes) en 100 µl de medio RPMI, la placa se incubó a 37°C/ 5%CO₂ por 6-12 horas. Una vez adheridas las células a la superficie de los pozos, se agregaron 25 µl de la suspensión al 1% de los eritrocitos oponizados. Se incubó nuevamente bajo las mismas

condiciones durante 90 minutos, después de los cuales se hizo un lavado sumergiendo la placa por completo en 400 ml de agua destilada (moviendo oscilatoriamente la placa durante 1 minuto, sin vaciar su contenido), a fin de romper por choque hipotónico a los eritrocitos no fagocitados. Inmediatamente después, se hicieron 2 lavados (en ocasiones 3) con PBS de la misma forma anterior a fin de eliminar la Hb liberada por los eritrocitos rotos, la placa se observó al microscopio para verificar la eficiencia de los lavados. El PBS se eliminó invirtiendo la placa y sacudiéndola rápidamente una sola vez. Se observó nuevamente al microscopio para verificar que las células permanecieran adheridas. Se añadieron 100 μ l/pozo de la solución de lisis (PBS/ 0.3% SDS) e inmediatamente después se agregaron 200 μ l/pozo del sustrato recién preparado (0.4 mg DAB/ 12 μ l H_2O_2 / 1 ml de PBS). El contenido de los pozos fue homogenizado con una micropipeta multicanal, para evitar interferencia en la lectura. Para eliminar las pequeñas burbujas, la placa se centrifugó durante 1 minuto a 1500 r.p.m. Se hizo la lectura en un lector de ELISA a 490 nm 40 minutos después de iniciada la reacción.

11.6. Ensayo colorimétrico para cuantificar la fagocitosis inespecífica

Para la determinación de este parámetro se sigue el mismo procedimiento que en el inciso anterior pero utilizando eritrocitos sin opsonizar.

12. Determinación de los receptores Fc γ RII y Fc γ RIII

La cuantificación de la expresión de receptores Fc para IgG se realizó a través de ensayos de citometría de flujo por inmunofluorescencia directa utilizando el anticuerpo monoclonal de rata 2.4G2 (IgG2b) anti-Fc γ RII/Fc γ RIII marcado con FITC.

El método consistió en incubar tubos eppendorf con 1 ml de PBS/0.1% BSA durante 30 minutos a 37°C en Baño María, para obtener una superficie lisa dentro del tubo. Después de eliminar el sobrenadante, se dispusieron en cada tubo 1×10^5 células P388D₁ no infectadas o persistentes en 300 μ l de medio RPMIc y 9 μ g del anticuerpo 2.4G2 marcado con FITC. Las muestras se incubaron por 2 horas a 4°C en agitación constante y se centrifugaron para retirar los sobrenadantes. El botón celular se lavó 2 veces (*resuspendiendo para cada lavado en 500 μ l PBS/0.1% BSA frío*). Las células se fijaron agregando 1 ml de PFA recién preparado (*PBS/0.5% PFA, disolviendo el precipitado con calor ligero y con NaOH 0.1 N, el pH fué ajustado a 7.4 con HCl*) e incubando por 30 minutos a 4°C en agitación constante. Después de lavar 2 veces, el botón fué resuspendido en 1 ml de PBS/0.1%BSA y transferido a un tubo especial para su lectura en el citómetro. Como blancos se utilizaron las células de ambos tipos de cultivo sin agregarles el anticuerpo. Las muestras se mantuvieron a 4°C y al día siguiente se leyeron y analizaron en el FACScan Becton-Dickinson. Es importante señalar que todas las soluciones utilizadas en el ensayo se filtraron a través de 0.22 μ antes de usarse, a fin de evitar interferencia en la lectura.

13. Determinación de la actividad del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

Para determinar la actividad de esta citocina en el sobrenadante de células infectadas o controles, se utilizó un ensayo biológico de alta sensibilidad, basado en la lisis celular ocasionada por la unión del TNF- α a su receptor expresado en fibroblastos murinos (L929) tratados con actinomicina-D para detener la división celular. La actinomicina-D inhibe la síntesis de RNA ya que se une al DNA y bloquea el movimiento de la RNA polimerasa (*Currents Protocols in Immunology 1991*).

Para el ensayo, se sembraron células L929 en una placa de 96 pozos, a una densidad de 5×10^4 células/pozo en 100 μ l de medio MEMc. Después de incubar por 12 horas a 37°C/5% CO₂ y retirar totalmente el medio, se adicionaron 100 μ l de los sobrenadantes de prueba (*1x10⁵ células P388D₁ no infectadas o persistentes en 300 μ l de medio RPMc, después de 24 horas los sobrenadantes se recogieron individualmente en tubos eppendorf, y se centrifugaron por 5 segundos en la microfuga a fin de evitar la presencia de células en los sobrenadantes y ocasionar falsos positivos*) según los pozos correspondientes. Una vez dispuestos los sobrenadantes, se agregaron 50ng de actinomicina-D/pozo incubándose nuevamente la placa por 17 horas a 37°C/5% CO₂. Se retiraron los sobrenadantes y se hizo un lavado con 200 μ l de PBS, para después adicionar 50 μ l/pozo de la solución colorante (*0.05% de cristal violeta en 20% de etanol*) incubando 10 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el colorante y se hicieron dos lavados llenando los pozos con agua fría y eliminando muy cuidadosamente el agua con una micropipeta, evitando dañar la monocapa celular. La placa se dejó secando toda la noche a temperatura ambiente. Por último se agregaron 100 μ l/pozo de metanol (*100%*) y se leyó inmediatamente en un lector de ELISA a 595 nm. Se utilizó como control negativo 100 μ l de medio RPMc (observándose una confluencia celular del 100%), y como control positivo 100 μ l de TNF- α recombinante murino.

14. Determinación de la interleucina 6 (IL-6)

Esta interleucina se determinó a través de un ELISA de captura, utilizando un anticuerpo conjugado con biotina como anticuerpo secundario.

En una placa de 96 pozos para EIA/RJA se añadieron 50 μ l/pozo del anticuerpo monoclonal anti IL-6 (*5 μ g/ml en solución amortiguadora de captura*) utilizándose como anticuerpo de captura. Se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se retiraron los sobrenadantes y se hicieron 2 lavados (*300 μ l/pozo PBS/0.05% Tween-20, para cada lavado se mantuvo esta solución al menos 1 minuto en contacto con la placa antes de aspirarla y retirarla totalmente sobre papel secante. Los lavados posteriores se hicieron de acuerdo de acuerdo al procedimiento decrito*). Posteriormente se añadieron 200 μ l/pozo de una solución bloqueadora (*PBS/10% SFB*) y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente, se hicieron nuevamente 2 lavados. Se adicionaron 100 μ l de los controles y de sobrenadantes de prueba a los pozos correspondientes (*5-7.5x10⁴ células P388D₁ no infectadas o persistentes en 300 μ l de medio RPMc, después de 24 horas los sobrenadantes de prueba se recogieron de la misma manera que para TNF- α*), se incubó toda la noche a 4°C y se hicieron 4 lavados. Se agregaron 100

μl del anticuerpo monoclonal biotinilado anti-IL-6 ($2\mu\text{g}/\text{ml}$ PBS/10%SFB), se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente y se hicieron 6 lavados. Posteriormente, se agregaron $100\mu\text{l}$ de streptavidina-peroxidasa (1:300 en PBS/10% SFB), se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se hicieron un mínimo de 8 lavados. Se adicionaron $100\mu\text{l}$ del sustrato [150 mg 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-ácido sulfónico) en 500 ml de ácido cítrico 0.1M pH 4.35 ajustando con NaOH. Antes de usarse se agregaron $10\mu\text{l}$ de H_2O_2 al 30% por cada 11 ml de sustrato]. Se esperó a que la reacción desarrollara color (10-80 minutos) y se leyó a 405 nm en un lector de ELISA. En el control negativo se utilizaron $100\mu\text{l}$ de medio RPMIc. Paralelamente a cada ensayo se hizo una curva patrón de rIL-6 en diluciones seriadas de 20 a 1 ng/ml en medio RPMIc, donde se extrapolaron los datos obtenidos.

15. Análisis estadístico

Los datos de los resultados fueron analizados por significancia estadística de acuerdo a la prueba de *U de Mann-Whitney*. Se aplicó esta prueba no paramétrica por tratarse de dos muestras independientes (controles y problemas) y por el tamaño de las mismas. La prueba se aplicó a cada una de las 5 propiedades inmunes analizadas, comparando la diferencia entre las células persistentemente infectadas (problemas) con respecto a las células no infectadas (control). La corrección para ligas se aplicó cuando se encontró más de un valor igual en cada propiedad. La diferencia entre los valores fue considerada significativa con $P \leq 0.05$ (Siegel S 1990).

RESULTADOS

1. Confirmación de la persistencia del RSV en las células P388D₁

1.1. Detección de antígeno viral en células del cultivo RSV persistente a través de inmunofluorescencia indirecta.

Una vez obtenido el cultivo de macrófagos infectados en forma persistente con el RSV (*MφP*), fue necesario comprobar la persistencia viral, para lo cual primero se determinó la producción de virus extracelular en los sobrenadantes de los diferentes pases del cultivo *MφP*, a través de titulación de virus sobre células HEp-2. En el laboratorio se hizo el seguimiento desde el primer pase hasta el pase 46, a partir del pase 9 los títulos fueron disminuyendo y en algunos pases no se detectó virus extracelular. Sin embargo, entre el pase 32 y 36 se detectó virus intracelular, ya que las células persistentes se sonicaron y los sobrenadantes presentaron virus infeccioso. Los títulos se observan en la **Figura 1** (Datos no publicados).

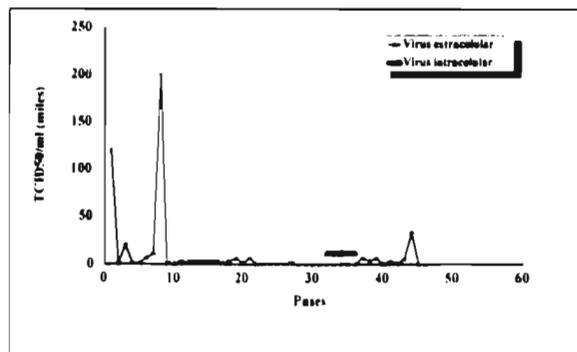


Figura 1. Virus extracelular presente en el sobrenadante de los *MφP*. Titulado por TCID₅₀/ml en células HEp-2 (Rosa Elena Sarmiento, datos no publicados).

Posteriormente, se valoró la proporción de células dentro del cultivo *MφP* en las cuales el genoma viral se expresaba, para tal efecto se determinaron antígenos virales por ensayos de inmunofluorescencia indirecta, utilizando un anticuerpo policlonal de conejo para reconocer las proteínas virales, usando como control negativo células sin infectar.

Este ensayo se llevó a cabo durante todo el trabajo como sistema de monitoreo, realizándolo antes de determinar cada una de las propiedades inmunes analizadas. Se analizaron diferentes pases del cultivo RSV persistente a lo largo de todo el estudio partiendo del pase 12. Los resultados reflejan la obtención de un cultivo heterogéneo donde existe un porcentaje de células infectadas de aproximadamente 75-80% (*Figura 2*).

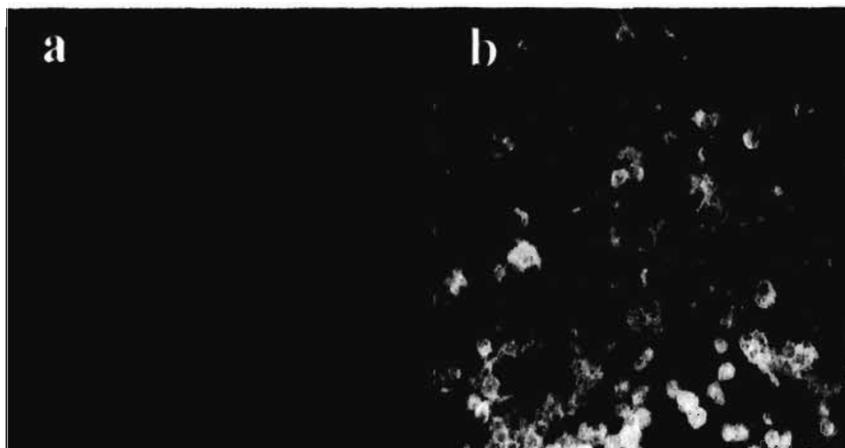


Figura 2. Inmunofluorescencia indirecta, mostrando la expresión de antígenos del RSV en un cultivo persistente. Células P388D₁ persistentemente infectadas con RSV fueron adheridas con polilisina en portaobjetos y fijadas con metanol-acetona, se utilizó un anticuerpo policlonal contra las proteínas virales y un anticuerpo secundario acoplado a FITC. El panel *a)* corresponde a células P388D₁ no infectadas utilizadas como control y el panel *b)* corresponde a las células del cultivo RSV persistente.

1.2. Detección de la expresión del genoma del RSV a través de RT-PCR en células persistentemente infectadas.

Otro criterio tomado en cuenta para comprobar la persistencia del RSV en las células P388D₁ fue determinar la presencia del genoma del virus en las células infectadas a través de la amplificación de alguno de los genes virales por medio de RT-PCR. Se decidió amplificar el gen que codifica para la proteína N del RSV, cuya selección obedeció a una serie de factores; ya que se consideró que la secuencia de este gen el cual consta de 1203 nucleótidos es conocida y es una de las más conservadas en el genoma del RSV, además de ser única, por lo que se descartó la unión inespecífica de los iniciadores como lo reporta Cane P. y cols. (Cane P *et al.* 1991). Por otra parte, se consideró la determinación de la expresión de este gen, ya que en ensayos de western-blot realizados en el laboratorio con anticuerpo policlonal, no fue posible detectar la presencia de las

proteínas P y N, por lo que se consideró determinarlos a través de una técnica más sensible y las condiciones experimentales para RT-PCR que primero se establecieron fueron para amplificar este gen.

Las condiciones establecidas en el laboratorio permitieron amplificar el RNAm de la proteína N, es decir el RNA positivo, identificando de esta manera el RNA sintetizado por la célula infectada y no el RNA del genoma viral cuya polaridad es negativa. Para lo anterior se analizó paralelamente como control a una concentración alta (10^{10} TCID₅₀/ml) de viriones donde no se amplificó el gen de la proteína N. En el laboratorio se analizaron distintos pases del cultivo RSV persistente tanto productores como no productores de virus extracelular (del pase 21 al pase 38) y todos mostraron la banda de 278 pb correspondiente al segmento ampificado del gen que codifica para la proteína N del RSV, lo que confirmó la sensibilidad de la técnica para amplificar RNA proveniente de las células infectadas.

En la **Figura 3** se observa un gel de agarosa que muestra el DNA correspondiente al segmento del gen que codifica para la proteína N del RSV amplificado por RT-PCR. Como control negativo se utilizaron células P388D₁ sin infectar. Para el control positivo se obtuvo RNA de una infección aguda, para lo cual se infectaron células P388D₁ con el RSV a una m.o.i. de 5 y el RNA se extrajo 48 horas post-infección. Se muestran 5 pases del cultivo RSV persistente correspondientes a los pases 30, 32, 33, 35, y 36 y todos presentaron la banda correspondiente de 278 pb (aunque el pase 35 presenta una banda de menor intensidad), calculada de acuerdo a los pesos moleculares (50-2,000 pb) que corresponden al DNA proveniente del plásmido pBR322.

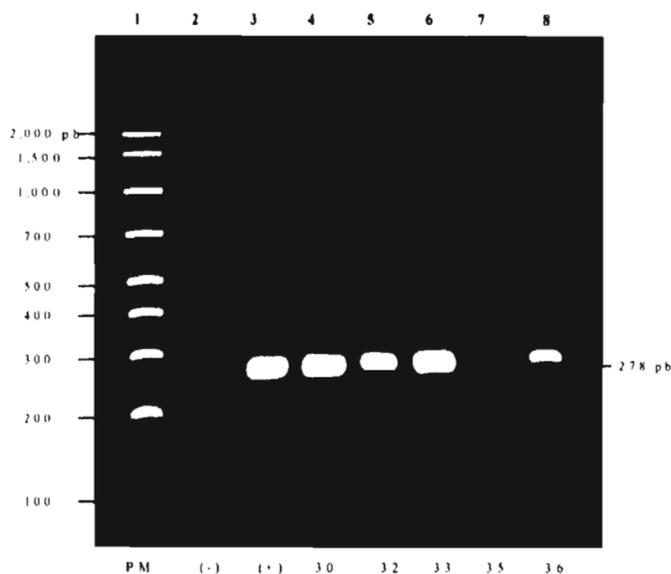


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. En el gel se observa el DNA correspondiente a los productos de amplificación del gen que codifica para la proteína N del RSV a través de RT-PCR (banda de 278 pb). Carril: **1)** Marcadores de pesos moleculares; Carril: **2)** Células P388D₁ sin infectar (-); Carril: **3)** Células P388D₁ con infección aguda con RSV (+); carriles **4)** - **8)**: Células P388D₁ RSV persistentes correspondientes a los pases: 30, 32, 33, 35 y 36.

2. Determinación del efecto del RSV sobre las funciones de las células P388D₁ persistentemente infectadas con el virus

Una vez comprobada la persistencia del RSV en las células P388D₁, se determinaron una serie de funciones en estas células parecidas a macrófagos, con la finalidad de evaluar el efecto de la persistencia del RSV sobre la célula. En todas las determinaciones se tomó como patrón de referencia a las células P388D₁ no infectadas (MφN).

2.1. Determinación de la actividad fagocítica mediada por receptores Fcγ.

En la determinación de este parámetro se realizaron 4 ensayos con un total de 8 pases del cultivo RSV persistente. La denominación de los pases se hizo de forma numéricamente secuencial, pero por ejemplo en el caso de los pases 20a y el pase 20b, ambos provienen del pase 19, pero fueron obtenidos en fechas distintas, existiendo un

mínimo de 5 días entre cada pase. La fagocitosis mediada por receptores Fc para IgG (FcγR) se determinó como se detalla en metodología. Después de disponer las células en los pozos y antes de realizar cada ensayo, se determinó la concentración de proteínas (mg/ml) por el método de Bradford en cada cultivo analizando un pozo de cada pase de MφP y células MφN para confirmar que la cantidad de células fueran las mismas en todos los pozos. Los resultados que se observan en la **Tabla 1** muestran las lecturas de densidad óptica (D.O.) que corresponden a la actividad fagocítica de cada cultivo, resultantes de un promedio de 6 determinaciones para cada uno de ellos. Las D.O. son más altas en las células persistentes con respecto a las células control. Sin embargo, para descartar que la diferencia en el número de macrófagos adheridos a los pozos influyera en las lecturas, nuevamente se determinó, después de los lavados, la concentración de proteínas (mg/ml) de 1 pozo de cada cultivo, extrapolando cada valor en D.O. a una curva patrón con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina disuelta en tritón X-100 (0.05%), que fue el detergente utilizado para romper las membranas de las células P388D₁ en la determinación de proteínas (ver metodología) (**Tabla 1**). Los datos sugieren que la

Tabla 1. Actividad fagocítica mediada por receptores Fcγ en células P388D₁ persistentemente infectadas con RSV. La actividad fagocítica expresada en unidades de D.O. se determinó utilizando eritrocitos de camero opsonizados con un anticuerpo monoclonal de ratón (IgG2b).

Macrófagos	Pase	Fagocitosis D.O.	D.S. (+/-)	Proteínas mg/ml	* Fagocitosis Proteínas mg/ml
No infectados		0.114	0.037	0.39	0.292
RSV persistentes	18	0.576	0.088	0.35	1.646
RSV persistentes	23 (a)	0.364	0.082	0.22	1.684
No infectados		0.396	0.032	2.93	0.136
RSV persistentes	20 (a)	0.896	0.095	1.25	0.716
RSV persistentes	25	1.286	0.152	2.595	0.486
No infectados		0.279	0.04	0.875	0.316
RSV persistentes	20 (b)	0.704	0.021	0.47	1.487
RSV persistentes	23 (b)	0.88	0.096	0.405	1.679
No infectados		0.154	0.007	1.11	0.138
RSV persistentes	22	0.359	0.084	0.865	0.416
RSV persistentes	21	0.256	0.035	1.22	0.207

* Valores correspondientes a la gráfica de la *figura 4*

concentración de proteínas no fue la misma. En algunos pozos de los cultivos persistentes se pierden más células durante el proceso. Sin embargo, es claro que la cantidad de eritrocitos fagocitados por las células con infección persistente por RSV es más alta con respecto a las no infectadas, como puede comprobarse al observar las muestras al microscopio de luz visible (*Figura 5*). Posteriormente, la actividad fagocítica se normalizó con respecto a la concentración de proteínas, obteniendo un valor para cada muestra (*Tabla 1*) los cuales fueron graficados en la *Figura 4*. El incremento en la actividad fagocítica mediada por FcγR presentado por los MφP con respecto a los MφN, fue estadísticamente significativo ($P < 0.004$).

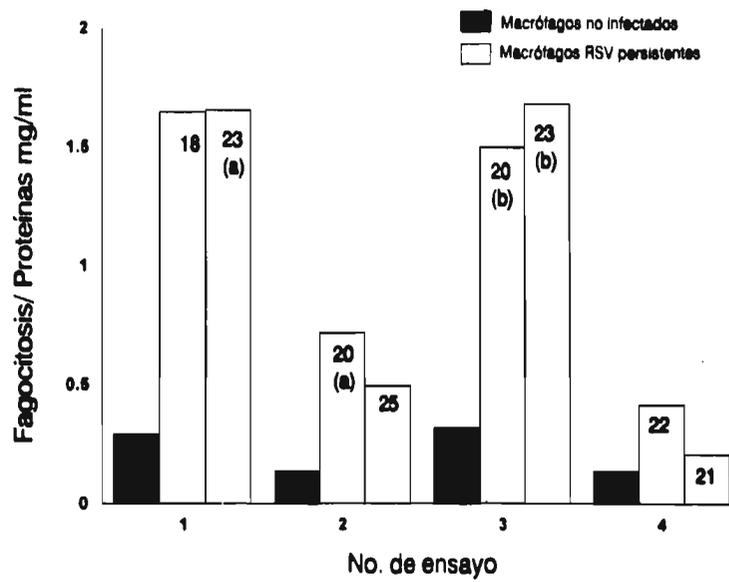


Figura 4 Actividad fagocítica mediada por receptores Fcγ en células P388D₁ persistentemente infectadas con RSV. Los valores en la ordenada corresponden a la columna de fagocitosis/proteínas mg/ml de la *Tabla 1*. Las barras oscuras representan las células sin infectar. Las barras claras representan los pases de los MφP, indicados con el número dentro de cada barra ($P < 0.004$).

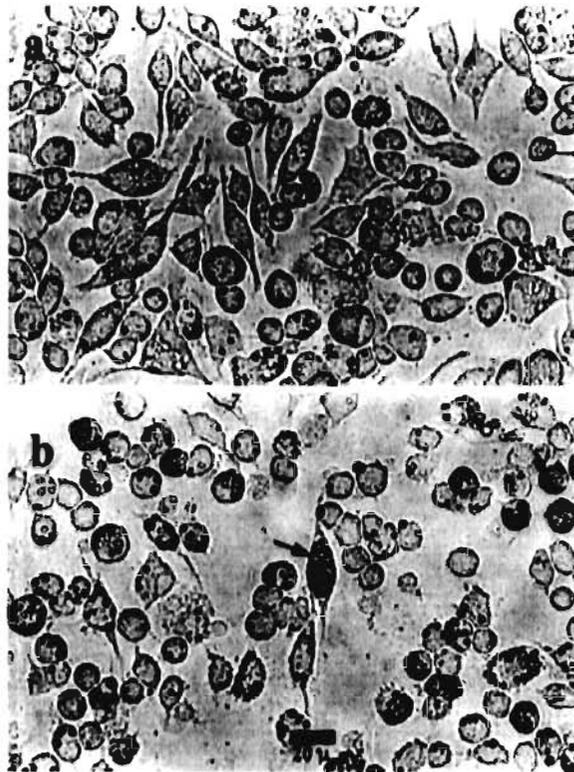


Figura 5. Actividad fagocítica mediada por receptores Fc γ . Células P388D $_1$ fagocitando eritrocitos de camero sensibilizados con un hapteno y opsonizados con un anticuerpo monoclonal. Panel **a)** Células P388D $_1$ no infectadas. **b)** Células P388D $_1$ RSV persistentes. Las flechas indican a los eritrocitos de camero fagocitados por el macrófago.

2.1. Determinación de la actividad fagocítica no mediada por receptores Fc γ

Un total de 4 ensayos fueron realizados para la determinación de esta actividad. Se probaron 9 pases del cultivo RSV persistente, utilizando la misma denominación para los pases como se mencionó en la fagocitosis mediada por receptores Fc γ . La **Tabla 2** muestra los datos de las lecturas de densidad óptica de la fagocitosis inespecífica así como la concentración de proteínas (mg/ml) al igual que en la fagocitosis mediada por receptores Fc γ . También se graficó la relación entre la actividad fagocítica y la

concentración de proteínas (*Figura 6*). En algunos casos se observó una diferencia de actividad entre las células infectadas con respecto a las no infectadas, sin embargo el efecto no se mantuvo constante. Por otro lado no se observó una diferencia significativa entre los cultivos al examinar las células en el microscopio de luz visible (*Figura 7*). La diferencia entre la actividad fagocítica no mediada por receptores Fcγ de las células infectadas persistentemente con RSV y las células no infectadas no fue estadísticamente significativa ($P>0.05$) por la prueba de *U de Mann-Whitney corregida para ligas*.

Tabla 2. Actividad fagocítica no mediada por receptores Fcγ, en células P388D₁ persistentemente infectadas con RSV. De acuerdo a la actividad pseudoperoxidasa de la Hb contenida en los eritrocitos de camero fagocitados por los macrófagos.

Macrófagos	Pase	Fagocitosis D.O.	D.S. (+/-)	Proteínas mg/ml	* Fagocitosis Proteínas mg/ml
No infectados		0.235	0.075	1.955	0.12
RSV persistentes	22 (a)	0.173	0.085	1.07	0.161
RSV persistentes	24	0.132	0.007	0.545	0.242
RSV persistentes	26	0.142	0.013	0.815	0.174
No infectados		0.142	0.013	2.575	0.053
RSV persistentes	20 (a)	0.124	0.014	0.865	0.143
RSV persistentes	25	0.125	0.01	1.245	0.1
No infectados		0.18	0.019	0.635	0.263
RSV persistentes	20 (b)	0.163	0.007	0.38	0.428
RSV persistentes	23	0.154	0.008	0.255	0.603
No infectados		0.127	0.006	0.785	0.161
RSV persistentes	22 (b)	0.122	0.006	0.705	0.173
RSV persistentes	21	0.128	0.013	0.76	0.168

* Valores correspondientes a la gráfica de la *figura 6*

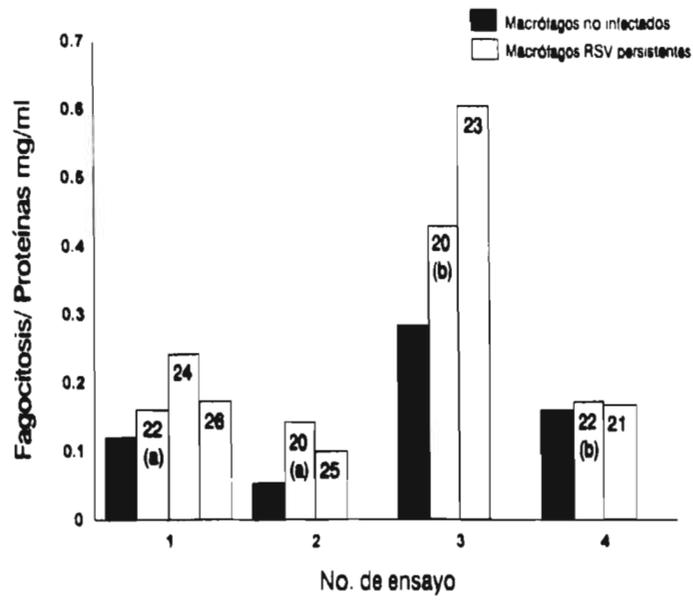


Figura 6. Actividad fagocítica no mediada por receptores Fcγ en células P388D₁ persistentemente infectadas con RSV. Los valores en la ordenada corresponden a la columna de fagocitosis/proteínas mg/ml de la **Tabla 2**. Las barras oscuras representan las células sin infectar. Las barras claras representan los pases de los MΦP, indicados con el número dentro de cada barra ($P > 0.05$).

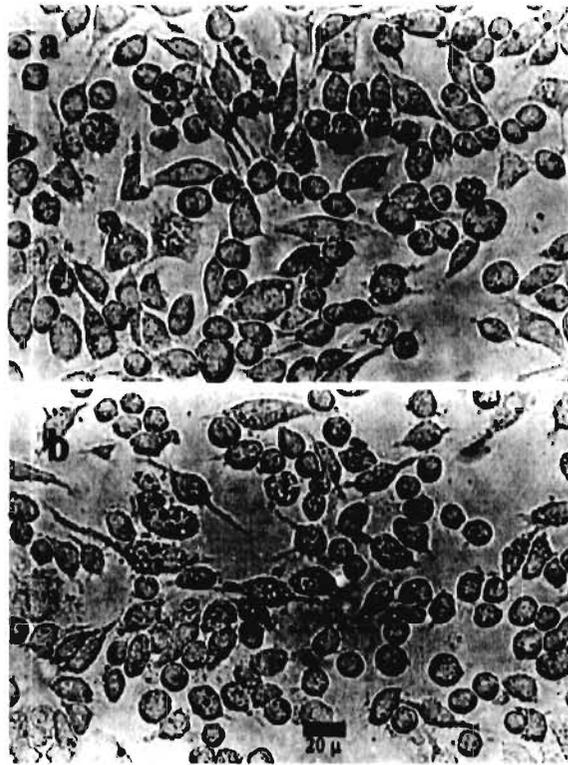


Figura 7. Actividad fagocítica no mediada por receptores Fc γ . Células P388D₁ fagocitando eritrocitos de carnero. Panel **a)** Células P388D₁ no infectadas (control). **b)** Células P388D₁ RSV persistentes. Las flechas indican a los eritrocitos de carnero fagocitados por el macrófago.

2.1.2. Determinación de la expresión de receptores Fc γ RII/Fc γ RIII en células persistentemente infectadas con RSV.

Con la finalidad de investigar si el aumento observado en la fagocitosis específica del cultivo M ϕ P estuvo dado por un incremento en los Fc γ R, se cuantificaron los receptores Fc γ RII/Fc γ RIII expresados en la superficie de las células P388D₁. Se realizaron tres ensayos con 9 pases del cultivo RSV persistente a través de citometría de flujo por inmunofluorescencia directa, utilizando un anticuerpo monoclonal de rata (IgG2b) marcado con FITC. En los ensayos realizados, se observó un incremento en la

expresión de los receptores en la superficie de las células persistentemente infectadas con el RSV. El aumento varió entre un 71 a un 171% tomando en cuenta los datos del factor correspondiente al promedio de la intensidad de inmunofluorescencia presentada por cada célula marcada. La población celular total fue de 1×10^4 células para la lectura de cada muestra (Tabla 3). Los promedios de intensidad de inmunofluorescencia fueron graficados en la figura 8, donde se señalan los pases y se muestra la proporción del incremento antes mencionado, el cual fue estadísticamente significativo ($P=0.05$). Además en la figura 9 se presentan los histogramas de las muestras, donde se señala un desplazamiento de los histogramas correspondientes a las células persistentemente infectadas con RSV (histogramas claros), los histogramas rellenos corresponden a las células sin infectar que sirvieron como control. En el extremo inferior se señala la población celular seleccionada, que se consideró para la lectura de cada ensayo correspondiendo a un grupo celular uniforme.

Tabla 3. Cuantificación de los receptores FcγRII/FcγRII expresados en la superficie de células P388D₁ sin infectar e infectados persistentemente con RSV. Determinados por inmunofluorescencia directa con un anticuerpo monoclonal de rata marcado con FITC en ensayos de citometría de flujo. Utilizando células P388D₁ no infectadas como control.

Macrófagos	Pase	♦ % Células marcadas	* Intensidad inmunofluorescencia	% de incremento
No infectados		94.36	194.13	
RSV persistentes	26	95.89	366.05	88.6
RSV persistentes	25	93.49	337.66	73.8
No infectados		88.17	119.27	
RSV persistentes	27	89.93	219.2	83.7
RSV persistentes	28	94.22	204.79	71.7
RSV persistentes	21	91.82	278.81	133.7
No infectados		95.74	93.19	
RSV persistentes	32	97.3	246.23	163.1
RSV persistentes	33	97.91	292.63	171.1
RSV persistentes	34	96.89	282.29	170.7
RSV persistentes	36	95.91	167.29	79.5

♦ % de un total de 10,000 células analizadas por muestra

* Promedio de intensidad de inmunofluorescencia por célula analizada

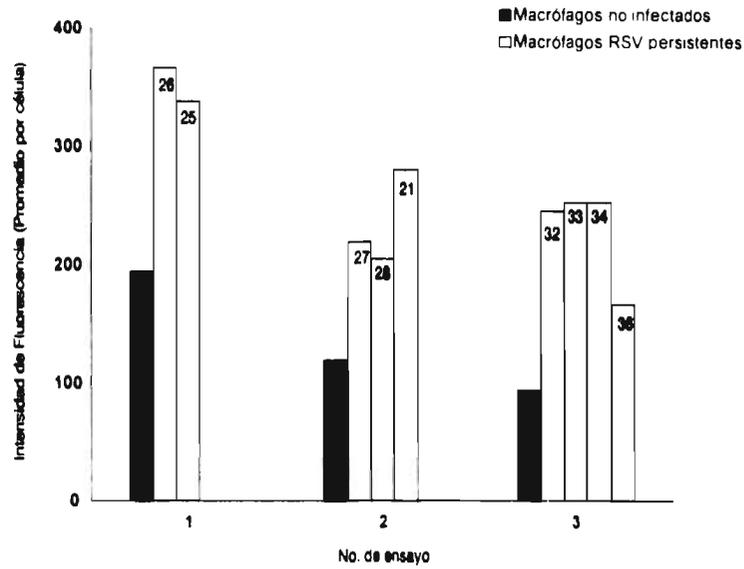


Figura 8. Cuantificación de los receptores Fc γ RII/Fc γ RIII expresados en la superficie de células P388D₁. RSV persistentes. Calculada a través del promedio de inmunofluorescencia presentada por célula en una población total de 10.000 células por muestra. Las barras oscuras representan las células sin infectar. Las barras claras representan los pase de los M ϕ P, indicados con el número dentro de cada barra. ($P=0.05$).

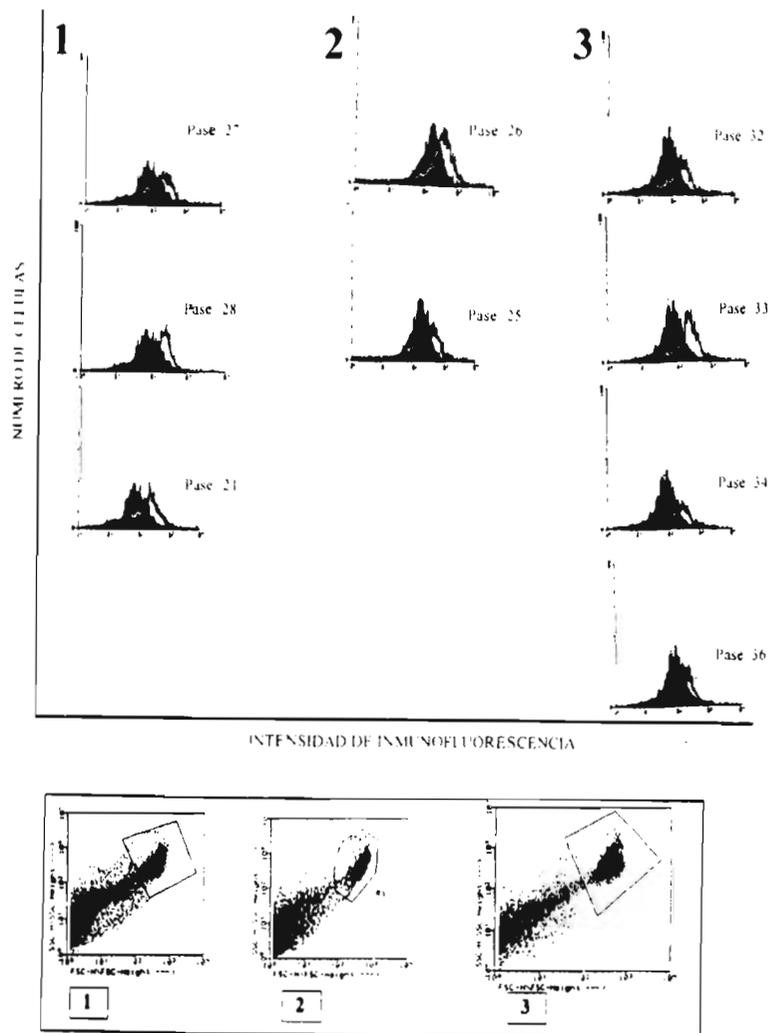


Figura 9. Expresión de receptores Fc γ RII/Fc γ RIII en la membrana de células P388D₁ infectadas persistentemente con RSV persistentes. Determinada a través de citometría de flujo por inmunofluorescencia directa utilizando un anticuerpo monoclonal de rata marcado con FITC. En la parte superior, los histogramas rellenos corresponden a células P388D₁ sin infectar (control) y los histogramas claros a los pases del cultivo RSV persistente. Los números en los recuadros corresponden al número de ensayo. En el extremo inferior se señala la población celular seleccionada para cada ensayo.

2.1.3. Determinación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en los sobrenadantes de las células persistentemente infectadas con RSV

La actividad citolítica del TNF- α en los sobrenadantes de los M ϕ P fue determinada a través de ensayos de citotoxicidad en células L929 en presencia de actinomicina D. Estas células presentan el receptor para TNF- α y TNF- β . Se realizaron 6 ensayos con un total de 10 pases del cultivo M ϕ P. Los datos de la **Tabla 4** registran las densidades ópticas (D.O.) obtenidas en cada ensayo, correspondiendo a un promedio de 8 determinaciones por muestra y representan un valor inversamente proporcional a la actividad del TNF- α , por lo que a menor lectura en D.O. mayor actividad en el sobrenadante. En la **figura 10** se muestra la gráfica correspondiente a la actividad del TNF- α en los sobrenadantes de cada una de las muestras analizadas. Los resultados reflejan una disminución en la actividad del TNF- α en las células persistentemente infectadas con el RSV con respecto a los M ϕ N utilizados como células control. Para verificar la sensibilidad de la técnica, se utilizó como control negativo medio RPMIc (mismo medio en el que fueron cultivadas las células P388D₁) y como control positivo TNF- α recombinante murino (10 ng/ml). La disminución de la actividad del TNF- α en los M ϕ P con respecto a los M ϕ N resultó estadísticamente significativa (P=0.02).

Tabla 4. Actividad del TNF- α producido por las células P388D₁ persistentemente infectadas con RSV. Se determinó la capacidad citotóxica del TNF- α en los sobrenadantes de los cultivos M ϕ N y M ϕ P sobre células L929 en presencia de actinomicina D

Macrófagos	Pase	♦ D.O. (+/D.S.) células L929	D.O. Control (+) por ensayo	D.O. Control (-) por ensayo
No infectados		0.630 (0.073)	0.266	1.046
RSV persistentes	22	0.893 (0.143)		
No infectados		0.832 (0.065)	0.334	1.166
RSV persistentes	25	0.904 (0.169)		
No infectados		0.596 (0.047)	0.269	1.072
RSV persistentes	20	0.669 (0.085)		
No infectados		0.602 (0.132)	0.491	1.179
RSV persistentes	23	0.887 (0.091)		
RSV persistentes	24	0.912 (0.169)		
No infectados		0.609 (0.069)	0.339	1.086
RSV persistentes	21	1.076 (0.071)		
RSV persistentes	19	0.789 (0.064)		
No infectados		0.661 (0.069)	0.271	1.052
RSV persistentes	28	0.801 (0.051)		
RSV persistentes	35	0.76 (0.073)		
RSV persistentes	30	0.816 (0.104)		

♦ Valores correspondientes al promedio de 8 determinaciones. Las lecturas son inversamente proporcionales a la actividad de TNF- α .
Valores correspondientes a la gráfica de la **figura 10**

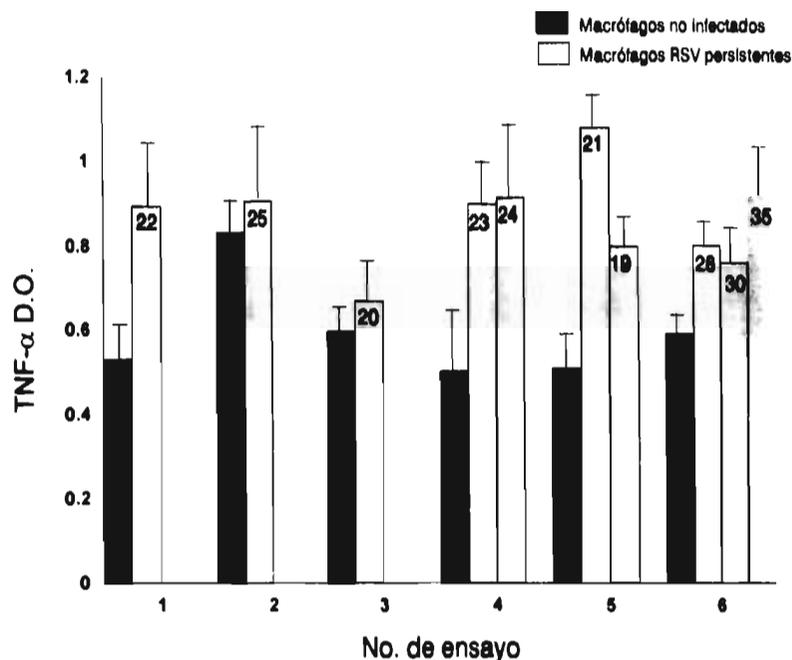


Figura 10. Actividad citotóxica del TNF- α presente en los sobrenadantes de células P388D₁ RSV persistentes sobre células L929 en presencia de actinomicina D. Las D.O. corresponden a un promedio de 8 determinaciones para cada muestra y su valor es inversamente proporcional a la actividad del TNF- α . Las barras oscuras corresponden a los sobrenadantes de los M ϕ N. Las barras claras representan los pase de los M ϕ P, indicados con el número dentro de cada barra. ($P=0.02$).

2.1.4. Determinación de IL-6 en los sobrenadantes del cultivo RSV persistente

La determinación de esta interleucina en los sobrenadantes de las células infectadas se hizo por medio de ensayos de ELISA de captura utilizando dos anticuerpos monoclonales. Se realizaron tres ensayos con un total de 7 pases del cultivo RSV persistente. Los datos mostrados en la **Tabla 5** muestran los valores en D.O. obtenidos en cada ensayo, cuyo valor corresponde al promedio de 8 determinaciones para cada muestra. Las células P388D₁ sin infectar fueron utilizadas como control en todos los ensayos realizados. Las concentraciones (ng/ml) fueron calculadas de acuerdo a una curva patrón utilizando concentraciones conocidas de IL-6 recombinante murina. Los resultados de

estos ensayos revelan un incremento en la concentración (ng/ml) de la IL-6 que es liberada al medio por las muestras correspondientes a las células del cultivo RSV persistente con respecto a las células control (**Tabla 5**). Las concentraciones de IL-6 obtenidas de cada pase fueron graficadas en la **Figura 11**. El incremento en la producción de IL-6 por los M ϕ P con respecto a los M ϕ N, resultó estadísticamente significativo (P=0.017).

Tabla 5. Concentración de IL-6 en los sobrenadantes de células P388D₁ persistentemente infectadas con RSV. Determinada a través de un ELISA de captura con 2 anticuerpos monoclonales. Los controles corresponden a las células no infectadas.

Macrófagos	Pase	♦ H-6 D.O. (D.S.♦)	* IL-6 ng/ml
No infectados		0.015 (0.001)	2.13
RSV persistentes	17	0.047 (0.001)	4.82
RSV persistentes	14	0.028 (0.002)	3.34
No infectados		0.034 (0.002)	1.861
RSV persistentes	23	0.078 (0.003)	4.444
RSV persistentes	22	0.091 (0.004)	5.388
RSV persistente	26	0.068 (0.002)	4.111
No infectados		0.032 (0.005)	0.441
RSV persistentes	21	0.053 (0.003)	0.782
RSV persistentes	25	0.116 (0.007)	4.276

♦ valores correspondientes al promedio de 8 determinaciones
 * Valores correspondientes a la grafica de la **figura 11**

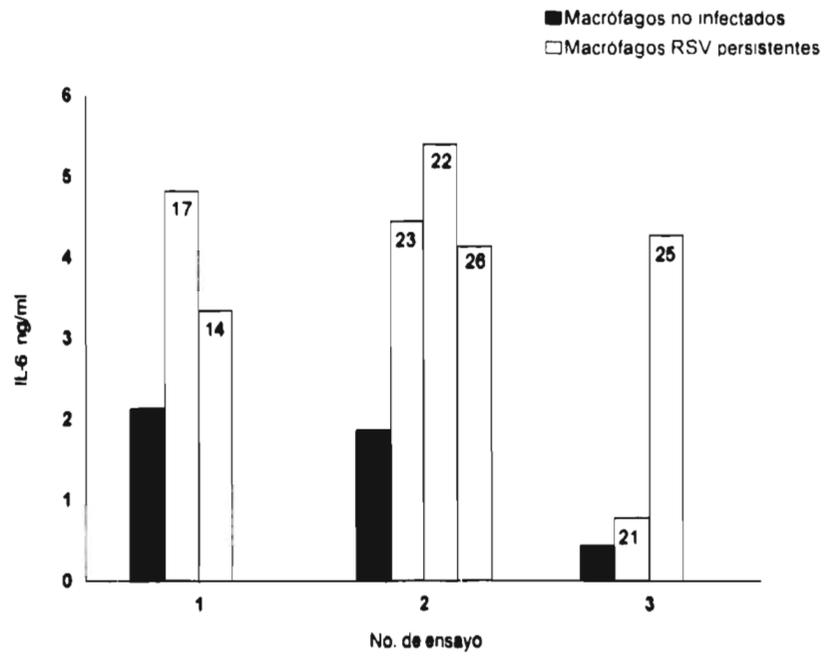


Figura 11. Concentración de IL-6 (ng/ml) en los sobrenadantes de células P388D₁ persistentemente infectadas con RSV. Determinada por ensayos de ELISA de captura. Las barras oscuras representan células sin infectar. Las barras claras representan los diferentes pases analizados, indicados por el número dentro de cada barra. ($P=0.017$).

DISCUSIÓN

El punto central de este estudio fue determinar el efecto de la infección persistente del virus sincitial respiratorio (RSV) sobre las actividades del macrófago. Los resultados aquí descritos apoyan la hipótesis de que la persistencia y expresión del genoma del RSV en el macrófago altera sus propiedades inmunes.

Reportes de otros autores demuestran que la infección aguda con RSV origina alteraciones inmunes en el macrófago tanto *in vivo* como *in vitro*. Los datos del presente estudio sugieren que una infección persistente también altera las propiedades inmunes del macrófago, aunque de manera diferente. Por lo tanto, es importante señalar que la relevancia de este trabajo radica en el hecho de que es el primero en demostrar alteraciones en el macrófago ocasionadas por la infección persistente por RSV.

La persistencia del RSV en el cultivo se confirmó y monitoreó por inmunofluorescencia, el cultivo en nuestras manos se recibió a partir del pase número 12, la persistencia del RSV así como la morfología de los macrófagos y su adherencia a la superficie de la caja fueron comprobadas antes de realizar cada una de las determinaciones inmunes. Al confirmar la presencia de antígenos del RSV en las células infectadas, se detectó un porcentaje de células positivas que fluctuó entre un 75 a 80% de la población celular total. Con el mismo propósito de confirmar la persistencia pero desde el punto de vista genómico, se amplificó una región del gen que codifica para la proteína N el cual es un gen altamente conservado no sólo en este virus sino en los pneumovirus en general (Johnson P. et al. 1989, Barr J. et al. 1991). En todos los pases analizados se encontró la banda correspondiente (278 pb). Estos datos confirman que a través de un largo período de tiempo (27 meses) el RSV ha logrado permanecer en la célula. En general, el mecanismo a través del cual el virus logra persistir en la célula se desconoce. No obstante, estudios en otros sistemas han descartado la integración del genoma viral en el genoma de los macrófagos infectados con RSV (Hegele R. et al. 1994).

Una vez confirmada la persistencia del RSV en los macrófagos, las actividades inmunes fueron determinadas. Dentro de tales actividades consideramos importante conocer en primera instancia la capacidad fagocítica de los macrófagos infectados, tomando en cuenta que la fagocitosis es una de las actividades fundamentales de estas

células la cual es fundamental dentro del sistema inmune del organismo y en este contexto dentro del tracto respiratorio inferior. Además los macrófagos son considerados junto con los neutrófilos y eosinófilos como células fagocíticas profesionales. Aunada a esta actividad se incluyó la cuantificación de receptores Fc γ (Fc γ R) y la producción de los reactivos intermediarios del oxígeno, pretendiendo así tener una idea general del efecto de la persistencia del RSV sobre la capacidad microbicida del macrófago. Por otro lado se consideró también la determinación de algunos factores producidos por el macrófago como la IL-6 y el TNF- α involucrados tanto en el aspecto inflamatorio como en la capacidad antiviral de la célula, así como también en la activación de otras células del sistema inmune.

Todos los ensayos de este trabajo fueron llevados a cabo en condiciones basales, es decir sin la estimulación por otro agente diferente al RSV. Sin embargo; para determinar la actividad de TNF- α , pretendimos activar a los macrófagos con lipopolisacárido (LPS) a distintas concentraciones, esperando una respuesta más potente de las células y observar una mayor diferencia en la alteración dada entre el cultivo persistente y el cultivo sin infectar; pero tuvimos dificultades técnicas para activar a los macrófagos aún sin infectar y los resultados fueron muy variables. Con base a esto decidimos reportar la diferencia de esta actividad en condiciones basales, y afortunadamente la diferencia fue lo suficientemente significativa en la actividad del TNF- α entre las células persistentes y las células sin infectar.

Dentro del aspecto fagocítico los primeros resultados corresponden a la fagocitosis inespecífica o no mediada por Fc γ R, donde no encontramos alteración significativa, lo que sugiere que el virus bajo condiciones de persistencia no logra alterar esta propiedad del macrófago. Cabe mencionar que en modelos experimentales de infección aguda, infectando macrófagos alveolares de ratones BALB/c con RSV humano *in vitro* y utilizando levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) como blanco de la fagocitosis, se ha encontrado una disminución de esta actividad. Este porcentaje de disminución alcanzó un porcentaje máximo del 18% después de tres días post infección. Los resultados son atribuidos a algún efecto del virus sobre el citoesqueleto, que pudiera discapacitar a la célula para una fagocitosis adecuada (Franke G. *et al.* 1995). Dentro de este mismo contexto pero utilizando RSV bovino (BRSV) el cual es un virus estrechamente relacionado con el humano, existen datos que indican que también hay disminución de esta actividad cuando se infectan terneras con RSV via intranasal y se hacen los ensayos de fagocitosis utilizando otras levaduras (*Candida albicans*). La disminución es atribuida a alteraciones en la membrana plasmática de los macrófagos (Olchowy T *et al.* 1994), ya que se ha observado que la infección viral aumenta el metabolismo del ácido araquidónico en los macrófagos alveolares bovinos. El mecanismo postulado incluye una alteración en los eventos de señales transmembranales, aumento en la actividad de la fosfolipasa y desorganización en la bicapa de fosfolípidos inducida por el virus (Laegreid W *et al.* 1989).

En la actividad fagocítica mediada por receptores Fcγ o específica, observamos datos que revelan un incremento significativo de tal actividad en las células del cultivo persistente con respecto a las células sin infectar. Hasta el momento no existen reportes con RSV humano que analicen esta propiedad, solo trabajos de BRSV con infección aguda, donde después de una infección vía intranasal en terneras se determina la actividad fagocítica en macrófagos alveolares bovinos utilizando eritrocitos de carnero opsonizados con una IgG específica. Los resultados que obtienen demuestran también un aumento en la fagocitosis mediada por receptores (Olchowy *T et al* 1994).

Analizando nuestros resultados anteriores consideramos que el incremento en la fagocitosis específica o mediada por IgG's podía estar dado por una sobreexpresión de los FcγR en la superficie de las células infectadas, de tal manera que decidimos determinar la expresión de los FcγRII. Nuestros resultados mostraron que efectivamente, la sobreexpresión de receptores Fcγ influye en el aumento de la fagocitosis específica, ya que en los diferentes pases del cultivo persistente que se analizaron se encontró un aumento significativo con respecto a las células testigo. En relación a la determinación de esta propiedad no existen reportes con RSV humano. No obstante, en infección aguda hay trabajos hechos con BRSV donde se obtienen resultados con la misma tendencia que los obtenidos en nuestro trabajo, aunque con datos muy variables entre sí, lo que ellos atribuyen al diseño de su modelo experimental (Olchowy *T et al* 1994). El mecanismo por el cual el virus logra estimular la expresión de los receptores se desconoce.

Con la finalidad de determinar si el incremento en la fagocitosis específica y los receptores correlacionaba con la actividad destructiva del macrófago, decidimos determinar producción de los intermediarios metabólicos del estallido respiratorio de la célula infectada, en este caso los macrófagos persistentes pudieran no tener capacidad para combatir a la gran cantidad de células internalizadas, que en circunstancias *in vivo* podrían ser microorganismos infecciosos, dando lugar así a las infecciones bacterianas secundarias, las cuales son muy frecuentes en individuos que son infectados con el RSV. En relación a esto, dentro de este trabajo se hicieron esfuerzos para determinar primero la cantidad de anión superóxido por un método colorimétrico, donde fue difícil establecer las condiciones idóneas para hacer la medición. También se intentó determinarlo por métodos fotoquímicos, a través de quimioluminiscencia, estimulando con forbol miristato acetato (PMA) y con zymosan opsonizado. Actualmente trabajamos para establecer las condiciones adecuadas para medir la producción de los intermediarios reactivos del oxígeno (principalmente el anión hidroxilo); no obstante, los resultados preliminares indican que la producción de estos reactivos tiende a disminuir o permanecer igual ante la persistencia del virus, pero definitivamente no aumentan. Cabe señalar al respecto los resultados obtenidos con infección aguda de RSV humano en macrófagos alveolares de ratones BALB/c, indican que la producción de los reactivos intermediarios del oxígeno

decrece de acuerdo al tiempo postinfección de las células con el virus (Franke G *et al* 1995).

Como ya se mencionó anteriormente, se determinaron algunos factores liberados por el macrófago como el TNF- α y la IL-6. En los resultados obtenidos en la determinación de la actividad del TNF- α observamos una disminución significativa de dicha actividad. La actividad del TNF- α se midió por el efecto lítico en células L929, por lo que previamente a la determinación descartamos la posibilidad de que el RSV lisara a los fibroblastos. Esto se hizo probando altas concentraciones de virus (10^6 TCID₅₀/ml) inactivado y no inactivado con luz U.V. sobre monocapas de células HEp-2 que son susceptibles al virus. Los resultados que obtuvimos indican que el RSV no tiene efecto citotóxico sobre la línea celular L929, por lo tanto consideramos que el efecto citotóxico observado se debió al efecto del TNF- α . La disminución de la actividad de esta proteína podría sugerir al TNF- α como uno de los factores involucrados en la capacidad del RSV para persistir en el macrófago alterando la biología de la célula. Considerando la capacidad antiviral de esta proteína es lógico pensar que el virus busque desarrollar alguna estrategia que le permita persistir en la célula, además de no proteger de la infección viral a las células no infectadas. Observaciones en la infección aguda utilizando macrófagos alveolares y RSV humano utilizando el mismo ensayo en la determinación, se reporta un incremento en la producción del TNF- α en los sobrenadantes de las células infectadas (Becker S *et al* 1991, Franke G *et al* 1994, Franke G *et al* 1995). Lo que es razonable ya que la infección aguda por RSV se ve disminuida por la presencia de TNF- α (Midulla F. *et al* 1989, Neuzil K. *et al* 1996). Uno de los mecanismos que explica como el TNF protege a los macrófagos de la infección viral puede ser su habilidad para estimular la síntesis del INF tipo I en macrófagos, el cual tiene actividad antiviral.

El estudio de la producción de la IL-6 fue otro factor importante que fue considerado en este trabajo dentro del aspecto pro-inflamatorio, ya que una de las características de la bronquitis crónica o recurrente durante el proceso de infección es la inflamación. Nuestros resultados indican un aumento en la producción de IL-6 en las células infectadas con respecto a las células testigo, lo que da la pauta para imaginar que la persistencia del RSV en los macrófagos junto con otras citocinas como la IL-1 son las responsables del proceso inflamatorio durante la infección por este virus aún en infecciones recurrentes o persistentes. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos en infección aguda en macrófagos alveolares (Becker S *et al* 1991, Franke G *et al* 1995) donde se indica que el efecto puede ser causado directamente por el virus ya que la IL-6 es inducida desde etapas tempranas de la infección por el RSV. Además la inducción de esta interleucina en el inicio de la infección es independiente de la replicación viral, ya que se ha visto que utilizando virus inactivados con luz U.V. también hay un incremento en la producción de la IL-6 (Stadnyk A *et al* 1997).

Algo sumamente interesante en las interleucinas comprendidas en este estudio es la relación que tienen entre sí. Si consideramos que IL-1 y TNF- α inducen la aparición de IL-6, mientras que la producción de IL-1 es estimulada por TNF- α y por sí misma. Con base a lo anterior podríamos sugerir que quizás el aumento de la IL-6 podría deberse a un aumento de IL-1, ya que según observamos el TNF- α disminuye en nuestros resultados. A su vez la disminución del TNF- α puede ser parte de la estrategia de persistencia del virus en la célula, ya que esta citocina induce la producción de INF tipo I el cual tiene actividad antiviral.

Debido a los resultados obtenidos en este estudio de la persistencia del RSV nos resulta interesante continuar estudiando otras alteraciones inmunes importantes dentro del contexto de los macrófagos alveolares, debido a la vital importancia que representan estas células en la protección o patología del paciente que es infectado por el RSV. Además después de haber observado que el comportamiento de las principales células involucradas en esta infección es diferente en una infección persistente a lo reportado con una infección aguda, se ha contemplado investigar la producción de los intermediarios del oxígeno, la producción de otras citocinas como la IL-1, INF-1 e IL-8, así como la expresión de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y II las cuales juegan un papel fundamental en la activación de linfocitos T, y por lo tanto en la respuesta inmune específica. Se pretende analizar no solo el efecto del RSV en la expresión de estas moléculas en las células infectadas, sino también su actividad durante el proceso de presentación de antígeno a otras células involucradas. Se ha reportado que en la infección aguda con RSV en células epiteliales hay una sobreexpresión del MHC I (Garofalo *et al.* 1996).

Por lo tanto, con los resultados obtenidos hasta el momento nos resulta difícil determinar en forma absoluta la participación del macrófago en la respuesta inmunológica en una infección persistente por el RSV, ya que habría que integrar más datos tal como se ha planeado hacerlo. Sin embargo hay que recalcar que los resultados descritos aquí resultan sumamente interesantes, no solo por ser los primeros al respecto, sino porque dan la pauta a considerar que existe un comportamiento diferente en lo que respecta a una infección persistente y una infección aguda por este virus dentro del aspecto inmunológico lo que contribuye al entendimiento de la inmunología para esta infección y es determinante conocer para la elaboración de una vacuna eficaz.

CONCLUSIONES

1. La presencia y expresión del RSV en la línea celular parecida a macrófagos fue confirmada en las células del cultivo persistente.
2. La persistencia del RSV en macrófagos incrementó la actividad fagocítica mediada por receptores FcγR.
3. La actividad fagocítica no mediada por receptores FcγR no se alteró significativamente.
4. El número de receptores FcγRII-FcγRIII en la superficie de los macrófagos persistentemente infectados con el RSV fue más alto con respecto a los macrófagos sin infectar.
5. En los sobrenadantes de las células del cultivo persistentemente infectados con RSV en relación a las células sin infectar la actividad del TNF- α se redujo.
6. La producción de la IL-6 se incrementó en los sobrenadantes de las células del cultivo persistentemente con RSV versus células sin infectar.

APÉNDICES

1. Material y reactivos

Líneas celulares

- Células HEp-2 (ATCC # CCL 23)
- Células P388D₁ (ATCC # TIB 63)
- Células L929 (ATCC # CCL 1)

Virus

- Virus Sincitial Respiratorio (RSV). Cepa Long (ATCC # VR-26)

Anticuerpos

- Anticuerpo policlonal de burro anti conejo conjugado con FITC (Amersham # N1034)
- Anticuerpo monoclonal de rata anti-IL-6 de ratón (PharMingen # 18071D)
- Anticuerpo monoclonal de rata anti-IL-6 de ratón. Conjugado con biotina (PharMingen # 18082D)
- Anticuerpo monoclonal de rata 2.4G2 anti-FcγRII/RIII (ATCC # HB179) marcado con FITC
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-DNP (IgG) denominado 4F8
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-RSV humano (DAKO # B344)

Medios de cultivo

- Medio mínimo esencial (MEM) (Gibco BRL # 121000-046)
- Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco BRL # 31800-022)

Suplementos para medios de cultivo

- Suero fetal bovino (Bioexport # 20)
- Suero fetal bovino (Gibco BRL # 16000-044)
- 2-mercaptoetanol (Sigma # M-7522)
- Hepes (Sigma # H-0763)
- Bicarbonato de sodio (Na₂HCO₃) (Pctos. químicos de Monterrey # 1290).
- Penicilina G sódica (Sigma # P-3032)
- Sulfato de estreptomicina (Sigma # S-5601)

- Nistatina (*Squibb* # 550).
- L- Glutamina 20mM (*Sigma* # G-1517)

Reactivos y sales

- Acetona (CH₃)₂CO (*J.T Baker* # 9006-03)
- Acido citrico (H₃C₆H₅O₇·H₂O) (*J.T.Baker* # 0110)
- Acido etilendiaminotetracético (EDTA) (*J. T. Baker* # 8993)
- Acido 2,4,6'-trinitrobencensulfónico (TNBS) (*Sigma* # P2297)
- Actinomicina D (*Sigma* # A1410)
- Albúmina sérica bovina (BSA) (*Sigma* #A-7906)
- Azida de sodio (NaN₃) (*Sigma* # S-2002)
- Cloruro de sodio (NaCl) (*Merk* #6404)
- 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) (*Sigma* # D-5637)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (CH₃)₂SO (*J.T. Baker* # 9224)
- Gelatina (*Sigma* # G- 1890)
- Etanol (CH₃CH₂OH) (*J. T. Baker* 39000-62)
- Factor de necrosis tumoral alfa recombinante murino (*R & D* # 410-MT)
- Fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄) (*J. T. Baker* # 3828)
- Fosfato monobásico de sodio (NaH₂PO₄) (*J. T. Baker* # 3818)
- Hidróxido de sodio (NaOH) (*Merk* # 6498)
- Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (*Sigma* # F-1628)
- IL-6 recombinante murina (*R & D* # 406-ML)
- Metanol (CH₃OH) (*Merk* #3705B21583)
- Paraformaldehído (*Sigma* # P-6148)
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (*Pctos. quimicos de Monterrey* # 5600)
- Polilisina (*Sigma* # P-1399)
- Sulfato de magnesio (MgSO₄ 7H₂O) (*J. T. Baker* # 2500)
- Tripsina (*Sigma* # T8253)

Reactivos utilizados en RT-PCR

- Aceite mineral (*Sigma* # M-5904)
- Acetato de sodio (CH₃COONa·3H₂O) (*Merk* # 6267)
- Acido bórico (H₃BO₃) (*Merk* # 100165)
- Acido etilendiaminotetraacético (EDTA) (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂·H₂O) (*Sigma* # E-5134)
- Agarosa (*Bio-rad* # 162-0134)
- Alcohol isoamilico (C₄H₁₂O) (*Sigma* # I-9392)
- Amortiguador de reacción 5X (*Gibco BRL* # Y00146)
- Amortiguador de PCR 10X (*Perkin Elmer*)
- Azul de bromofenol (*Bio-rad* # 161-0404)
- Bromuro de etidio (*Bio-rad* # 161-0430)
- Citrato de sodio (C₆H₄Na₃O₇) (*J.T. Baker* # 3646)

- Cloroformo (*Merk # 500461585*)
- Deoxinucleósidos trifosfato (dNTP)
 - dATP Trifosfato de deoxiadenosina (*Gibco-BRL # 8252SA*)
 - dCTP Trifosfato de deoxicitidina (*Gibco-BRL # 18253-013*)
 - dGTP Trifosfato de deoxiguanosina (*Gibco-BRL # 18254-011*)
 - dTTP Trifosfato de deoxitimidina (*Gibco-BRL # 28025-013*)
- Dietil piro-carbonato (DEPC) (*Sigma # D-5758*)
- Dithiothreitol (DTT) (*Sigma # D-9779*)
- Fenol (C₆H₅OH) (*Gibco # L-1-5509011*)
- Ficoll tipo 400 (*Sigma # F-4375*)
- Inhibidor de RNAsas (*Boehringer Mannheim # 799 017*)
- Iniciadores (*Gibco-BRL*)
- Isopropanol (C₃H₈O) (*Merk # 215882*)
- Isotiocianato de guanidina (*Gibco BRL # 15535-016*)
- Marcador de pesos moleculares (AmpliSize DNA standar) (*Bio-rad # 170-8200*)
- N-lauril sarcosilato de sodio (*Sigma # L-5125*)
- 2-mercapto etanol (*Bio-rad # 161-0710*)
- Taq polimerasa (*Amplificasa. Biotecsa-México*). Donada por el Dr. Rogelio Alonso Jefe del laboratorio de Genética Molecular. Depto. de Microbiología y Parasitología de la Fac. Medicina.U.N.A.M.
- Transcriptasa reversa (Moloney murine leukemia virus) (*Gibco BRL # 18064-014*)
- Trizma-base (*Sigma # T-7149*)

- Detergentes

- Dodecil sulfato de sodio (SDS) (*Bio-Rad # 161-0302*)
- Tritón X-100 (t-Octilfenoxipolietoxietanol) (*Sigma # X-100*)
- Tween-20 (*Sigma # P-1379*)

Colorantes

- Azul tripano (*Sigma # T-5526*)
- Cristal violeta (*Sigma # C0775*)
- Reactivo de color Bradford (*Bio-rad # 500-0006*)

Material desechable

- Botellas para cultivo de tejidos de 162 cm² (*Costar # 3151*) (*Corning # 25120*)
- Botellas para cultivo de tejidos de 25 cm² (*Costar # 3050*)
- Caja de Petri para cultivo de tejidos 100 mm (*Costar # 3100*)
- Caja de Petri para cultivo de tejidos 60 mm (*Falcon # 3002*)
- Cámaras para inmunofluorescencia de 8 pozos (*Nunc # 177445*)
- Placas para cultivo de tejidos de 96 pozos (*Falcon # 3072*) (*Costar # 3596*)
- Placas EIA/RIA de 96 pozos (*Costar # 3590*)

- Puntas para micropipeta con filtro y probadas contra RNAsas y DNAsas
 - 200-1000 μ l (*Gibco-BRL* # 14868-012)
 - 20-200 μ l (*Gibco-BRL* # 14867-014)
- Raspadores (*Costar* # 3008)
- Tubos 12X75 mm para lectura FACS (*Falcon* # 2054)

2. Preparación de soluciones

Agua-DEPC

DEPC 0.1 ml
 Agua destilada c.b.p. 100 ml

Mezclar vigorosamente. Dejar incubando toda la noche a 37°C. Esterilizar por autoclave.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Cloruro de sodio 8.0 gr
 Cloruro de potasio 0.2 gr
 Fosfato dibásico de sodio 0.96 gr
 Fosfato monobásico de potasio 0.2 gr
 Agua destilada c.b.p. 1000 ml

Se ajusta el pH a 7.4. Esterilizar por autoclave.

PBS (IL-6)

Cloruro de sodio 8.0 gr
 Fosfato de sodio 1.16 gr
 Fosfato de potasio 0.2 gr
 Cloruro de potasio 0.2 gr
 Agua destilada c.b.p. 1000 ml

Se ajusta el pH a 7.0 y se esteriliza por autoclave.

Solución amortiguadora para ELISA de captura (IL-6)

Bicarbonato de sodio 0.1M.

Ajustar el pH 8.2.

Verseno

Cloruro de sodio 8.0 gr
 Cloruro de calcio 0.4 gr
 EDTA 0.2 gr
 Tris-base 3.04 gr
 Agua destilada c.b.p. 1000 ml

Esterilizar por autoclave. Agregar 0.1% de tripsina y esterilizar por filtración (0.22 μ). Guardar en alícuotas a -20°C.

Solución de Alsevers

Dextrosa	20.5 gr
Cloruro de sodio	4.2 gr
Citrato de sodio	8.0 gr
Acido cítrico	0.55 gr
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Ajustar el pH a 6.2. Esterilizar por filtración (0.22 μ). Guardar a 4°C.

Solución amortiguadora dextrosa-gelatina-veronal (DGV^{B2+})

Gelatina	0.25 gr
Barbital	0.23 gr
Dextrosa	12.5 gr
Cloruro de sodio	2.1 gr
Cloruro de calcio 1M	75 μ l
Cloruro de magnesio 1M	250 μ l
Agua desionizada c.b.p.	500 ml

El barbital (veronal) y la gelatina son disueltos en 250 ml de agua calentando, y después son mezclados con los otros reactivos. Ajustar el pH 7.3. Esterilizar en autoclave. Guardar a 4°C.

Solución amortiguadora de boratos (BBS)

Acido bórico (0.2M)	6.18 gr
Cloruro de sodio (0.15M)	4.38 gr
Agua desionizada c.b.p.	500 ml

Ajustar el pH a 8.5. Esterilizar por autoclave.

Medio RPMI

Medio RPMI 1640

Hepes	2.2 gr
Bicarbonato de sodio	2.2 gr
2-Mercaptoetanol	1x10 ⁻⁶ M
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Ajustar el pH a 7.4. Esterilizar por filtración (0.22 μ). Guardar a 4°C.

Medio RPMIc

RPMIi, suplementado con 10% de suero fetal bovino (*Gibco*) inactivado (56°C/30 min.) y antibióticos (Sulfato de estreptomina 100 μ g/ml. Penicilina G 100 UI/ml).

Medio MEMi

Medio MEM

Hepes 2.2 gr

Bicarbonato de sodio 2.2 gr

Agua destilada c.b.p. 1000 ml

Ajustar el pH a 7.4. Esterilizar por filtración (0.22 μ). Guardar a 4°C.

Medio MEMc

MEMi, suplementado con 10% de suero fetal bovino (*Bioexport*) inactivado (56°C/30 min.), antimicóticos (Nistatina 0.1mg/ml) y antibióticos (Sulfato de estreptomycinina 100 μ g/ml, Penicilina G 100 UI/ml).

TBE 5X

Tris-base 54.0 gr

Acido bórico 27.5 gr

EDTA 0.5M pH 8.0 20 ml

Agua destilada c.b.p. 1000 ml

Mezclar. Esterilizar por autoclave.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A.; Litchman A. y Pober J. (1995). Citocinas. En: *Inmunología Celular y Molecular*. Cap. 12. Sección III. 2^{da} edición, editado por McGraw-Hill. pp. 271-292.
- Abramson J. (1988). The pathogenesis of bacterial infections in infants and children: role of viruses. *Perspec Biol. Med.* Vol. 32. pp. 63-68.
- Ahmed R. and Stevens J. (1990). Viral persistence. In: *Virology*. 2nd edition, edited by Fields B.N. New York. pp. 209-229.
- Ahmed R.; Morrison L. and Knipe D. (1996). Persistence of viruses. In: *Fundamental Virology*. 3rd Edition, edited by Fields B.N., Knipe D.M. and Howley P.M., et al. Raven publishers. Philadelphia. pp. 207-237.
- Alwan W.; Record F. and Openshaw P. (1992). CD4⁺T cells clear virus but augment disease in mice infected with Respiratory Syncytial virus. Comparison with the effects of CD8⁺T cells. *Clin. Exp. Immunol.* Vol. 88. pp. 527-536.
- Alwan W.; Kozłowska and Openshaw P. (1994). Distinct types of lung disease caused by functional subsets of antiviral T cells. *J. Exp. Med.* Vol. 179. pp. 81-89.
- Ananaba G. and Anderson. (1991). Antibody enhancement of Respiratory Syncytial virus stimulation of leukotriene production by a macrophagelike cell line. *J. Virol.* Vol. 65. pp. 5052-5060.
- Anderson J.; Harrop M.; Amin S.; Toms G. et al. (1989). Natural killer cell response to Respiratory Syncytial virus in the BALB/c mouse model. *Adv. Exp. Med. Biol.* Vol. 257. pp. 211-220.
- Anderson L.; Tsou C; Potter C.; Keyserling H.; et al. (1994). Cytokine response to Respiratory Syncytial virus stimulation of human peripheral blood mononuclear cells. *J. Infect. Dis.* Vol. 170. pp. 1201-1208.
- Arnold R. et al. (1995). Cytokine (IL-8, IL-6, TNF- α) and soluble TNF receptor I release from human peripheral blood mononuclear cells after Respiratory Syncytial virus infection. *Immunology*. Vol. 85. pp. 364-372.
- Auger M. and Ross J. (1992). The biology of the macrophage. In: *The Natural Immune System. The macrophage*. Chapter 1. Edited by Lewis C. et al. Oxford. IRL Press. pp. 1-74.
- Baldrige P. and Senterfit L. (1976). Persistent infection of cells in culture by Respiratory Syncytial virus (39286). *Proc. Sci. Exp. Biol. Med.* Vol. 151. pp. 684-688.
- Bangham Ch. and McMichael A. (1986). Specific human cytotoxic T cells recognize B-cell lines persistently infected with Respiratory Syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 83. pp. 9183-9187.
- Bangham Ch.; Openshaw P.; Ball A.; King A.; et al. (1986). Human and murine cytotoxic T cells specific to Respiratory Syncytial virus recognize the viral nucleoprotein (N), but not the

- major glycoprotein (G), expressed by vaccinia virus recombinants. *J Immunol*. Vol. 137 pp. 3973-3977
- Barik S. (1992). Transcription of human Respiratory Syncytial virus genome RNA in vitro: requirement of cellular factors). *J Virol*. Vol. 66. pp. 6813-6818.
- Barr J.; Chambers P.; Pringle C. and Easton A. (1991). Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumotoc virus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses, paramixoviruses, rhabdoviruses and filoviruses. *J. Gen Virol*. (in press)
- Becker S. Quay J. and Soukup J. (1991). Cytokine (Tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8), production by Respiratory Syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *J Immunol*. Vol. 147. pp. 4307-4312.
- Berstein J. and Hruska J. (1981). Respiratory syncytial virus proteins: Identification by immunoprecipitation. *J Virol*. Vol. 38. pp. 278-285.
- Boeck K. (1996). Respiratory syncytial virus bronchiolitis: clinical aspects and epidemiology. *Monaldi Arch. Chest Dis*. Vol. 51. pp. 210-213.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. Vol. 72. pp. 248-254.
- Cane P. and Pringle C. (1991). Respiratory syncytial virus heterogeneity during an epidemic: analysis by limited nucleoside sequencing (SH gene) and restriction mapping (N gene). *J Gen Virol*. Vol. 72. pp. 349-357
- Cannon M.; Openshaw P. and Askonas B. (1988). Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with Respiratory Syncytial virus. *J. Exp. Med*. Vol. 163. pp. 1163-1168.
- Cirino N.; Panuska J.; Villani A.; Taraf H.; et al. (1993). Restricted replication of Respiratory Syncytial virus in human alveolar macrophages. *J. Gen Virol*. Vol. 74. pp. 1527-1537.
- Collins P., Huang T. and Wertz G. (1984). Identification of a tenth mRNA of Respiratory Syncytial virus and assignments of polypeptides to the 10 viral genes. *J. Virol*. Vol. 49. pp. 572-578.
- Collins P.; McIntosh K. and Chanock R. (1996). Respiratory Syncytial virus. In: *Fields Virology*. 3rd Edition, edited by Fields B; Knipe D.; Howley, et al. Raven, Publishers, Philadelphia. pp. 1313-1351.
- Connors M.; Giese N.; Kulkarni A.; Firestone C.; et al. (1994). Enhanced pulmonary histopathology induced by Respiratory Syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice abrogated by depletion of interleukin-4 (IL-4) and IL-10. *J. Virol*. Vol. 68. pp. 5321-5325.
- Currents Protocols in Immunology (1991). Measurement of tumor necrosis factor α and β . Vol. 1. Unit 6.10. pp. 6.10.1-6.10.5.
- Chomezynski P. and Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. Vol. 162. pp. 156-159.
- Dakhama A.; Vitalis T. and Hegele R. (1997). Persistence of Respiratory Syncytial virus (RSV) infection and development of RSV-specific IgG1 response in a guinea-pig model of acute bronchiolitis. *Eur. Respir. J*. Vol. 10. pp. 20-26.
- Dawson K. and Nogridge N. (1989). Acute bronchiolitis: three year study. *N. Z. Med. J*. Vol. 102. pp. 528-529.

- Dickens L., Collins P. and Wertz G. (1984). Transcriptional mapping of human Respiratory Syncytial virus. *J Virol*. Vol. 52. pp. 364-369.
- Dowell S.; et al. (1996). Respiratory syncytial virus is an important cause of community acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. *J Infect Dis*. Vol. 174. pp. 456-62.
- Englund J. (1994). Passive protection against Respiratory Syncytial virus disease in infants: the role of maternal antibody. *Pediatr Infect Dis J*. Vol. 13. pp. 449-453.
- Falsey A. and Walsh E. (1992). Humoral immunity to Respiratory Syncytial virus infection in the elderly. *J Med Virol*. Vol. 36. pp. 39-43.
- Fearon D. (1994). The humoral immune response. In: *Immunobiology: The immune system in health and disease*. Chapter 8. Edited by Janeway Ch. and Travers P. Garland Publishing. New York and London. pp. 8.16-8.21.
- Feldman M. (1997). En: *Inmunología. Colaboración celular en la respuesta de anticuerpos*. Capítulo 8. Editado por Roitt I., Brostoff J. y Male D. 4a edición. Editorial Harcourt Brace. Madrid. pp. 8.1-8.13.
- Fernie B.; Ford E. and Gerin J. (1981). The development of BALB/c cells persistently infected with Respiratory Syncytial virus: presence of ribonucleoprotein on cell surface (41129). *Proc. Soc. Exp. Biol Med*. Vol. 167. pp. 83-86.
- Fernie B. and Gerin J. (1982). The stabilization and purification of Respiratory Syncytial virus using MgSO₄. *Virology*. Vol. 106. pp. 141-144.
- Franke G.; Freihorst J.; Steinmüller C.; Verhagen W. et al. (1994). Interaction of alveolar macrophages and Respiratory Syncytial virus. *J Immunol Methods*. Vol. 174. pp. 173-184.
- Franke G.; Pförtner C.; Walter P.; Steinmüller C. et al. (1995). Alteration of pulmonary macrophage function by Respiratory Syncytial virus infection in vitro. *J Immunol*. Vol. 154. pp. 268-280.
- Gaddum R.; Cook R.; Thomas L. and Taylor G. (1996). Primary cytotoxic T-cell responses to bovine respiratory syncytial virus in calves. *Immunol*. Vol. 88. pp. 421-427.
- Gaham B. (1995). Pathogenesis of Respiratory Syncytial virus vaccine-augmented pathology. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. Vol. 152 (4 pt 2). pp. 563-566.
- García Barreno. B. et al. (1988). Participation of cytoskeletal intermediate filaments in the infectious cycle of human Respiratory Syncytial virus (RSV). *Virus Res*. Vol. 9. pp. 307-321.
- Garofalo R.; Mei F.; Espejo R.; Gang Y.; et al. (1996). Respiratory Syncytial virus infection of human respiratory epithelial cells up-regulates class I MHC expression through the induction of INF- β and IL-1 α . *J Immunol*. Vol. 157. pp. 2506-2513.
- Goldman D. (1989). Nosocomial viral infections: recent developments and new strategies. *Eur. J. Clin Microbiol. Infect. Dis*. Vol. 8. pp. 75-81.
- Gómez B. (1994). Virus sincitial respiratorio. En: *Infecciones respiratorias agudas y crónicas*. Editado por García García, et al. Instituto de diagnóstico y referencia epidemiológicos. Secretaría de Salud. pp. 359-373.
- Graham B.; Bunton L.; Wright P. and Karzon D. (1991). Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with Respiratory Syncytial virus in mice. *J. Clin. Invest*. Vol. 88. pp. 1026-1033.
- Gray D. (1994). Host defense against infection. In: *Immunobiology: The immune system in health and disease*. Chapter 9. Edited by Janeway Ch. and Travers P. Garland Publishing. New York and London. pp. 9.12-9.26.

- Greenberg S. and Silverstein S. (1993). Phagocytosis. In *Fundamental Immunology*, 3rd edition Edited by Paul W. Raven Press, New York, pp. 941-964
- Hayes E.; Hurwitz E.; Schonberger L. and Anderson L. (1989). Respiratory Syncytial virus outbreak on American Samoa. Evaluation of risk factors. *Am. J. Dis. Child.* Vol. 143. pp. 316-321.
- Haywood A. (1986). Patterns of persistent viral infections. *N. Eng. J. of Med.* Vol. 315. pp. 939-948.
- Hegele R.; Hayashi S.; Bramley A. and Hogg J. (1994). Persistence of Respiratory Syncytial virus genome and protein after acute bronchiolitis in guinea pigs. *Chest.* Vol. 105. pp. 1848-1854.
- Heminway B.; et al. (1993). Role of the human Respiratory Syncytial virus small hydrophobic protein in membrane fusion. In: *Abstracts of the IX International Congress of virology*. P17-2. pp.67.
- Huang Y. and Wertz G. (1982). The genome of Respiratory Syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species. *J. Virol.* Vol. 43. pp 150-157.
- Huang Y. and Wertz G. (1983). Respiratory Syncytial virus mRNA coding assignments. *J. Virol.* Vol. 46. pp.667-672.
- Huang Y.; Collins P. and Wertz G. (1985). Characterization of the 10 proteins of human Respiratory Syncytial virus: identification of a fourth envelope-associated protein. *Virus. Res.* Vol. 2. pp. 157-173.
- Hunninghake G. Fick R. and Nugent K. (1985). Pulmonary host defenses: cellular factors. In: *Advances in host defense mechanism*. Vol. 4. Edited by Gallin J. et al. Raven press. New York. pp. 89-113
- Hussell T.; Spencer L.; Georgiou A.; O'Garra A.; et al. (1996). Th1 and Th2 cytokine induction in pulmonary T cells during infection with Respiratory Syncytial virus. *J. Gen. Virol.* Vol. 77. pp. 2447-2455.
- Indik Z.; Park J.; Hunter S. and Schreiber A. (1995). The molecular dissection of Fc γ receptor mediated phagocytosis. *Blood.* Vol. 86. pp. 4398-4399.
- Jeffcoate T. (1969). Vaccine against Respiratory Syncytial virus. *The Lancet.* Vol 2. p.311.
- Johnson P. and Collins P. (1989). The 1B (NS2), 1C (NS1) and N proteins of human Respiratory Syncytial virus (RSV) of antigenic subgroups A and B: sequence conservation and divergence within RSV genomic RNA. *J. Gen. Virol.* Vol. 70. pp. 1539-1547.
- Kägi D., et al. (1994). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature.* Vol. 369. pp. 31-37.
- Kapikian A.; Mitchell R.; Chanock R.; Shvedoff R.; et al. (1969). An epidemiologic study of altered clinical reactivity to Respiratory Syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am. J. Epidemiol.* Vol. 89. pp. 405-421.
- Kim H.; Canchola J.; Brandt C.; Pyles G.; et al. (1969). Respiratory Syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am. J. Epidemiol.* Vol. 89. pp. 422-434.
- Kimpen J.; Rich G.; Mohar C. and Ogra P. (1992). Mucosal T cell distribution during infection with Respiratory Syncytial virus. *J. Med. Virol.* Vol. 36. pp. 172-179.
- Kingsbury D. (1991). Paramixoviridae and their replication. In: *Fundamental Virology*, 2nd Edition, edited by Fields B.N., Knipe D.M. et al. Raven Press. New York. pp. 507-524.

- Krivitskaia V. and Iakovleva N. (1992). Specificity of humoral response to Respiratory Syncytial virus infection in adults with different forms of bronchitis. *Copr. Virol.* Vol. 37, pp. 146-149.
- Krivitskaia V., Iakovleva N. and Aleksandrova. (1996). Characteristics of anti-Respiratory Syncytial humoral immunity during persistence of respiratory syncytial virus antigens in adult patients with chronic obstructive bronchitis. *Copr. Virol.* Vol. 41, pp. 234-237.
- Laegreid W., Taylor S., Leid R., Sillow R. et al. (1989). Virus induced enhancement of arachidonate metabolism by bovine alveolar macrophages in vitro. *J. Leukoc. Biol.* Vol. 45, pp. 283-292.
- Lamb R. and Kolakofsky D. (1996). Paramixoviridae: The virus and their replication. In: *Fundamental Virology*, 3rd Edition, edited by Fields B.N., Knipe D.M. et al. Raven Publishers, Philadelphia, pp. 577-604.
- Lambert D., Pons M., Mbuy G. and Dorscer K. (1980). Nucleic Acids of Respiratory Syncytial virus. *J. Virol.* Vol. 36, pp. 837-846.
- Lemen R. (1995). Respiratory syncytial virus and bronchiolitis. *Acta Paediatr. Scand.* Vol. 32, pp. 78-85.
- Levenson R. and Kanter O. (1987). Fatal pneumonia in an adult due to Respiratory Syncytial virus. *Arch. Intern. Med.* Vol. 147, pp. 791-792.
- Lindsay J. and Oldstone M. (1996). Immune Response to viruses. In: *Fundamental Virology*, 3rd Edition, edited by Fields B.N., Knipe D.M. and Howley P.M., et al. Raven publishers, Philadelphia, pp. 311-340.
- Martin A., Carrillo E., Sevilla N. and Domingo E. (1994). Rapid cell variation can determine the establishment of a persistent viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 91, pp. 3705-3709.
- Matsuda K., Tsutsumi H., Okamoto Y. and Chiba C. (1995). Development of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha activity in nasopharyngeal secretions of infants and children during infection with Respiratory Syncytial virus. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* Vol. 2, pp. 322-324.
- McIntosh K. and Chanock R. (1990). Respiratory Syncytial virus. In: *Virology*, 2nd edn. Fields B., Knipe D. et al., eds. New York, Raven Press, Ltd. pp. 1045-1072.
- Midulla F., Huang Y., Gilbert I., Cirino N., et al. (1989). Respiratory Syncytial virus infection of human cord and adult blood monocytes and alveolar macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* Vol. 140, pp. 771-777.
- Midulla F., Villani A., Panuska J., Dab I., et al. (1993). Respiratory Syncytial virus lung infection in infants: Immunoregulatory role of infected alveolar macrophages. *J. Infect. Dis.* Vol. 168, pp. 1515-1519.
- Mills B., Singer F., Weiner L. and Holst P. (1981). Immunohistological demonstration of Respiratory Syncytial virus antigen in Paget disease of bone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 78, pp. 1209-1213.
- Mills B. et al. (1984). Evidence for both Respiratory Syncytial virus and measles virus antigens in the osteoclasts of patients with Paget's disease of bone. *Clin. Orthop.* Vol. 183, pp. 303-311.
- Mills B. and Singer F. (1987). Critical evaluation of viral antigen data in Paget's disease of bone. *Clin. Orthop.* Vol. 217, pp. 16-25.
- MMWR (1995). Update: respiratory syncytial virus activity United States 1995-1996 season. *Morb. Mortal Wkly. Rep.* Vol. 44 (48), pp. 900-902.

- MMWR (1996). Update: respiratory syncytialvirus activity United States 1996-1997 season. *Morb. Mortal Wily. Rep.* Vol. 45 (48) pp. 1053-1055.
- Nadal D. and Ogra P. (1990). Development of local immunity: role in mechanisms of protection against or pathogenesis of Respiratory Syncytial viral infections. *Lung.* Vol. 168.(suppl). pp. 379-387.
- Nagata S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell.* Vol. 88. pp. 355-365
- Neuzil K.; Tang Y. and Graham B. (1996). Protective role of TNF- α in Respiratory Syncytial virus infection in vitro and in vivo. *Am. J. Med. Sci.* Vol. 311. pp. 201-204.
- Nicholson K. (1996). Impact of influenza and Respiratory Syncytial virus on mortality in England and Wales from January to December 1990. *Epidemiol. Infect.* Vol. 116. pp. 51-63.
- Nwankwo M. et al. (1988). Seasonal variation in Respiratory Syncytial virus infections in children in Benin-city, Nigeria. *Trop. Geogr. Med.* Vol. 40. pp. 309-313.
- Olchowy T.; Ames T. and Molitor T. (1994). Interaction of bovine Respiratory Syncytial virus with bovine alveolar macrophages in vivo: effects of virus infections upon selected cell functions. *Can. J. Vet. Res.* Vol. 58. pp. 42-48.
- Oldstone M. (1989). Viral persistence. *Cell.* Vol. 56. pp. 517-520.
- Oldstone M. (1990). Viral persistence and immune dysfunction. *Hospital Practice.* May. pp. 81-98.
- Oldstone M. (1991). Molecular anatomy of viral persistence. *J. Virol.* Vol. 65. pp. 6381-6386.
- Oldstone M. and Rall G. (1993). Mechanism and consequence of viral persistence in cells of the immune system and neurons. *Viral Immunopathol.* Vol. 35. pp. 116-121.
- Openshaw P. (1995). Immunity and immunopathology to Respiratory Syncytial virus. The mouse model. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* Vol. 152 (4 pt 2). pp. S59-S62.
- Openshaw P. (1995). Immunopathological mechanisms in Respiratory Syncytial virus disease. *Springer Seminars in immunopathology.* Vol. 17. pp. 187-201.
- Panuska J. et al. (1990). Productive infection of isolated human alveolar macrophages by Respiratory Syncytial virus. *J. Clin. Invest.* Vol. 86. pp. 113-119.
- Panuska J.; Hertz M.; Taraf H.; Villani A.; et al. (1992). Respiratory Syncytial virus infection of alveolar macrophages in adult transplant patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* Vol. 145. pp. 934-939.
- Panuska J.; Merolla R.; Rebert N.; Hoffmann S.; et al. (1995). Respiratory Syncytial virus induces interleukin-10 by human alveolar macrophages. *J. Clin. Invest.* Vol. 96. pp. 2445-2453.
- Payment P. and Trudel M. (1993) (a). Kärber method. In: *Methods and Techniques in Virology.* Edited by Dekker M. publishers, New York. p. 33.
- Payment P. and Trudel M. (1993) (b). Enumeration of cells. In: *Methods and Techniques in Virology.* Edited by Dekker M. publishers, New York. pp. 14-15.
- Payment P. and Trudel M. (1993) (c). Freezing of cells. In: *Methods and Techniques in Virology.* Edited by Dekker M. publishers, New York. pp. 17.
- Pringle C.; Shirodaria P.; Cash P.; Chiswel D.; et al. (1978). Initiation and maintenance of persistent infection by Respiratory Syncytial virus. *J. Virol.* Vol. 28. pp. 199-211.
- Pringle C.; Wilkie M. and Elliott R. (1985). A survey of Respiratory Syncytial virus and parainfluenza virus type 3 neutralizing and immunoprecipitating antibodies in relation to Paget disease. *J. Med. Virol.* Vol. 17. pp. 377-386.

- Roberts N., Prill A. and Mann E. (1986). Interleukin 1 and interleukin 1 inhibitor production by human macrophages exposed to influenza virus or Respiratory Syncytial virus. Respiratory Syncytial virus is a potent inducer of inhibitor activity. *J. Exp. Med.* Vol. 163. pp. 511-519.
- Rook G. (1997). En: *Inmunología. Reacciones inmunitarias mediadas por células*. Capítulo 9. Editado por Roitt I., Brostoff J. y Male D. 4a edición. Editorial Harcourt Brace. Madrid. pp. 9.1-9.11.
- Saijo M.; et al. (1993). Respiratory Syncytial virus infection in lower respiratory tract and asthma attack in hospitalized children in north Hokkaido, Japan. *Acta Paediatr. Jpn.* Vol. 35. pp. 233-237.
- Saijo M.; et al. (1994). The role of Respiratory Syncytial virus in acute bronchiolitis in small children in northern Japan. *Acta Paediatr. Jpn.* Vol. 36. pp. 371-374.
- Siegel S. (1990). Prueba U de Mann-Whitney. En: *Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta*. Cap. 6. 3a edición. Editorial Trillas. pp. 123-155.
- Soh N.; Nadal D.; Berstein J.; Schläpfer E.; et al. (1992). Immunologic response of adenoidal lymphocytes to Respiratory Syncytial virus. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* Vol. 101. pp. 848-853.
- Southern P. and Oldstone M. (1986). Medical consequences of persistent viral infection. *Seminars in Medicine of the Beth Israel hospital. Boston.* Vol. 314. pp. 359-367.
- Speert D. (1992). Macrophage in bacterial infection. In: *The Natural Immune System. The macrophage*. Chapter 5. Edited by Lewis C. et al. IRL Press. Oxford. pp. 215-247.
- S.S.A. (1979-1996). *Boletín semanal de la Dirección General de epidemiología*. S.S.A. 1979-1996.
- Stadnyk A.; Gillan T. and Anderson R. (1997). Respiratory Syncytial virus triggers synthesis of IL-6 in BALB/c mouse alveolar macrophages in the absence of virus replication. *Cellular Immunology*. Vol. 176. pp. 122-126.
- Streeckert H.; Philippou S. and Riedel F. (1996). Detection of Respiratory Syncytial virus (RSV) antigen in the lungs of guinea pigs 6 weeks after experimental infection and despite of the production of neutralizing antibodies. *Arch. Virol.* Vol. 141. pp. 401-410.
- Tercier J. (1983). Bronchiolitis: a clinical review. *J. Emerg. Med.* Vol. 1. pp. 119-123.
- Turner M. (1997). En: *Inmunología. Anticuerpos y sus receptores*. Capítulo 4. Editado por Roitt I., Brostoff J. y Male D. 4a edición. Editorial Harcourt Brace. Madrid. pp. 4.1-4.10.
- Vilkerfors T.; Grandien M. and Olcen P. (1987). Respiratory syncytial virus infections in adults. *Am. Rev. Respir. Dis.* Vol. 136. pp. 561-564.
- Walgreen H.; Erickson M.; Mortesson W.; Forsgren M. et al. (1984). Isolation of pathogenic bacteria from nasopharynx of children with Respiratory Syncytial virus infection. *Scand. J. Infect. Dis.* Vol. 16. pp. 139-143.
- Washbourne J.; Bocchini J. and Jamison R. (1992). Summertime Respiratory Syncytial virus infection: epidemiology and clinical manifestations. *South Med. J.* Vol. 85. pp. 579-583.
- Welliver R. and Ogra P. (1988). Immunology of respiratory viral infections. *Annu. Rev. Med.* Vol. 39. pp. 147-162.
- Wendt C. and Hertz M. (1995). Respiratory Syncytial virus and Parainfluenza virus infections in the immunocompromised host. *Sem. Resp. Infect.* Vol. 10. pp. 224-231.
- White D. and Fenner F. (1986). Paramyxoviruses. In: *Medical Virology* 3rd Edition, edited by Academic Press. Orlando, Florida. pp. 521-539.

- Winter G. and Inglis J. (1987). Respiratory viruses in children admitted to hospital in Edinburgh 1972-1985. *J. Infect. Dis.* 15, pp. 103-107.
- Wright S. (1986). Methods for the study of receptor-mediated phagocytosis. *Meth Enzym.* Vol. 132, p. 204.
- Yankevich O. and Dreizin R. (1977). Chronic infection of HeLa cells with Respiratory Syncytial virus. *Vopr. Virusol.* Vol. 2, pp. 142-147.
- Zinkernagel R. (1993). Immunity to viruses. In: *Fundamental Immunology*, 3rd Edition, edited by Paul W. Raven Press, New York, pp. 1211-1250.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**