

11281
38

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
FACULTAD DE MEDICINA



"CARACTERIZACION DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO OBTENIDO DE MACROFAGOS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
P R E S E N T A
M. en C. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA
DIRECTORA DE TESIS: DRA. BEATRIZ GOMEZ GARCIA

MEXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2003



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.

NOMBRE: Rosa Elena Sarmiento Silva

FECHA: 3-Marzo-03

LUGAR: [Signature]

DEDICATORIAS.

A mi familia.....

A mis padres Pancho y Marga, con todo mi amor y agradecimiento por su apoyo incondicional y por haberme enseñado el amor al trabajo y al estudio.

A mis hermanos Verónica, José, Rubén e Hilda con mucho cariño.

A Carolina con mucho cariño, respeto y admiración por ser mi compañera, amiga, confidente, cómplice, vecina y por si fuera poco hermana.

A la familia Sarmiento Hernández, con cariño, especialmente al nuevo miembro de la familia. Y por supuesto a la preciosa Jimena.

A mis sobrinos Sally, José y Alex, con mucho cariño.

A la familia Ortega Mendoza, por ser excelentes amigos y sobrinos, especialmente a la pequeña Andrea, con todo mi amor, porque ha venido a alimentar con nuevos sueños y esperanzas a la toda la familia.

Ya mi propia familia, por quienes doy gracias a la vida de tenerlos.

.....A Carlos con todo mi amor porque en todo este tiempo me ha brindado su amor, apoyo y comprensión.

.....Especialmente a nuestro pequeño(a), por llenar de luz y alegría mi corazón y a quien amo infinitamente (¡Esperarte es maravilloso!).

A mis amigos.....

A la familia Tirado Mendoza con cariño y agradecimiento por su amistad, apapachos y apoyo incondicional.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B

A la familia Valencia Tirado, a Rocio con mucho cariño, porque la palabra amistad con ella no tiene límites. A Armando por su amistad y por haberme permitido compartir momentos inolvidables con su familia. Especialmente al pequeño Erick, con todo mi amor.

A mi amiga de toda la vida.....Mónica, porque simplemente no me puedo imaginar sin su amistad.

A Mirza, Enrique, Pablo, Laura G., Laura A., Guille, Mayra y Olivia con cariño.

A María Elena, Miguel Ángel y Ana Cecilia con cariño, por ser tan buenos amigos.

A Martha y Gustavo, a quienes quiero agradecer infinitamente el apoyo que me brindaron aún sin conocerme y por quienes siento un cariño muy especial.

A Beatriz con cariño, quien en un momento muy importante de mi vida me tendió la mano.

A la familia Díaz Morales por la amistad y cariño que día con día me obsequian.

Al Dr. Jorge Mariné quien siempre me acompaña.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS.

A los miembros del comité tutorial:

Dra. Beatriz Gomez Garcia, por su apoyo y guía en el desarrollo del presente trabajo.

Dra. Carmen Soler Claudín, por su amplia disponibilidad para discutir el trabajo experimental y por impulsarme cada día a mejorar.

Dr. Carlos F. Arias Ortiz por su valiosa colaboración en el desarrollo del trabajo experimental y por el gran apoyo recibido durante mi estancia en su laboratorio.

A los miembros del Jurado Dra. Beatriz Gomez Garcia, Dra. Rosa María Del Angel, Dra. Lorena Gutiérrez, Dr. Luis Manuel Terán, Dr. Luis Padilla, Dra. Carmen Soler Claudin y al Dr. Carlos F. Arias Ortiz, por sus valiosos comentarios y críticas, los cuales enriquecieron el trabajo final.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, por la oportunidad que me ha brindado de formar parte de su comunidad y enriquecer mi vida académica y profesional.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado, dentro del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (Tesis), por el apoyo otorgado al proyecto (Clave 201380).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante el Doctorado.

Al Sistema Nacional de Investigadores por el apoyo recibido como CANDIDATO.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Rocio, Laura, Rafael y Gerardo por su amistad.

A la M. en C. Rocio G. Tirado Mendoza por su valiosa colaboración durante el desarrollo del trabajo experimental.

0

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Un agradecimiento especial a Jesús Núñez e Ignacio Palacios por su invaluable ayuda, pero sobre todo por su amistad.

A los compañeros de la hemerobiblioteca (Paty, Dan, Sr. Rafa †, Javier, Egbert J. Sánchez Vanderkast, Martín y Daniel) porque siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en la búsqueda de bibliografía y por su ayuda en computo.

Al Dr. Gustavo Pedraza Alva (Instituto de Biotecnología, UNAM) por su ayuda en la captura y análisis de resultados de citometría de flujo. A la Química Xochitl Arévalo (Instituto de Biotecnología, UNAM) por su colaboración en el la observación por microscopía confocal, de los ensayos de inmunofluorescencia. A la Dra. Yvonne Rosenstein (Instituto de Biotecnología, UNAM), por sus valiosos comentarios y sugerencias hechas a este trabajo. A las unidades de síntesis y de secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

A todos los compañeros del laboratorio de los Drs. Arias-López (Ma. Elena, Jimena, Vicky, Selene, Paz, Angélica, Tere, Marisol, Dector, Miguel Angel, Carlos Arturo, Pedro (Papá), Pedro (hijo), Pedrito, Rafa, Diana, Rosalba Tomás, Pavel y Martha, por su amistad y ayuda durante mi estancia en Cuernavaca. Especialmente a la Dra. Susana López por su colaboración en el desarrollo y discusión de este trabajo y al Dr. Ernesto Méndez, por su valiosa ayuda y el tiempo que siempre estuvo dispuesto a dedicarme.

Al Dr. Luis Manuel Terán por haberme recibido en su laboratorio y por su disponibilidad para colaborar con mi formación.

A los compañeros del laboratorio del Dr. Terán (Anita, Gris, Diana, Elba, Rosalba, Gabriel y Carmelita), por el apoyo recibido durante mi estancia en el INER.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

E

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dra. Lorena Gutiérrez
Secretario:	Dra. Beatriz Gomez Garcia
Vocal:	Dra. Rosa María Del Angel
Vocal:	Dr. Luis Terán Juárez
Vocal	Dr. Luis Padilla Noriega
Suplente:	Dra. Carmen Soler Claudin
Suplente:	Dr. Carlos F. Arias Ortiz

Este trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Beatriz Gomez Garcia del Departamento de Microbiología y Parasitología Facultad de Medicina, UNAM y en el laboratorio del Dr. Carlos F. Arias Ortiz del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) proyecto 31112-M, del Programa de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) proyecto IN-217998 y del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado,

Parte de los resultados obtenidos se publicaron en *Virus Research* (2002) 84:45-58 (se anexa copia del artículo).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**“CARACTERIZACIÓN DEL VIRUS
SINCITAL RESPIRATORIO OBTENIDO DE
MACRÓFAGOS PERSISTENTEMENTE
INFECTADOS”**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

RESUMEN

I.	INTRODUCCIÓN.	1
	Aspectos epidemiológicos y clínicos de la infección por el RSV.	1
	Respuesta inmune a la infección por RSV.	3
	Infección de macrófagos con RSV.	4
	Modelo murino de infección por el RSV	4
	Persistencia Viral.	5
	Virus Sincitial Respiratorio	7
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	12
III.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	13
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS.	14
	Líneas celulares .	14
	Virus.	14
	a. Propagación	14
	b. Purificación	15
	Obtención de anticuerpos.	15
	a. Inmunización	15
	b. Titulación de anticuerpos neutralizantes en el suero	15
	c. Purificación de las IgG's por cromatografía de afinidad (proteína A-sepharosa)	16
	Obtención del cultivo infectado persistentemente.	16
	Caracterización del cultivo infectado persistentemente.	17
	a. Morfología de las células del cultivo infectado persistentemente.	17
	b. Producción de virus extracelular e intracelular.	17
	• Titulación por TCID ₅₀ /ml.	17
	• Titulación por focos de infección.	18
	• Porcentaje de células infectadas.	18
	• Inmunofluorescencia indirecta.	18
	• Ensayo de citometría de flujo.	19
	d. Expresión del gen N del RSV.	19
	• Extracción de RNA	20
	• RT-PCR para la amplificación del gen N del RSV.	20
	e. Obtención de un cultivo homogéneo a partir del cultivo Møpert)	21
	• Por dilución límite	21
	• Resistencia a la superinfección.	21

f.	Presencia de Partículas Defectuosas (DI's)	21
•	Ensayo de interferencia viral	21
•	Inhibición de la interferencia viral.	22
•	Neutralización de la interferencia.	22
	Caracterización de las partículas virales obtenidas del cultivo infectado persistentemente.	22
a.	Formación de sincitia	22
•	Co-cultivo de las células del cultivo Møpper2 con diferentes líneas celulares.	22
•	Efecto sobre la formación de sincitia del tratamiento con tripsina del sobrenadante del cultivo de Møpper2.	23
•	Infectividad por focos de infección.	23
•	Efecto de la concentración de tripsina en la expresión de la proteína en la membrana de las células VERO infectadas con el sobrenadante del cultivo Møpper2.	23
b.	Análisis genómico de la proteína F	24
•	RT-PCR para la amplificación del gen F	24
•	Purificación de los productos de PCR.	25
•	Obtención de la secuencia de nucleótidos de la proteína F.	26
V.	RESULTADOS.	27
1.	Establecimiento, confirmación y caracterización del cultivo persistentemente infectado.	27
2.	Caracterización de las partículas virales obtenidas del cultivo Møpper2.	36
VI.	DISCUSIÓN.	45
VII.	CONCLUSIONES.	55
VIII.	PERSPECTIVAS.	56
IX.	APÉNDICE.	58
X.	BIBLIOGRAFÍA.	63
XI.	ARTÍCULO.	72

RESUMEN.

En este trabajo reportamos el establecimiento y caracterización de un cultivo de macrófagos (línea celular P388D1, de origen murino) infectado persistentemente con el virus sincitial respiratorio, el cual se ha mantenido por más de 4 años. La persistencia viral se ha demostrado por la presencia y expresión del genoma viral, por diferentes técnicas: presencia de antígeno viral por inmunofluorescencia y por FACS; producción de virus infectivo y de partículas defectuosas y expresión del gene N.

Durante la persistencia se generaron partículas defectuosas, sugierendo la participación de éstas en el mantenimiento de la infección persistente, puesto que aparecieron y se mantuvieron presentes y en cantidad constante durante todos los pases.

En el cultivo obtenido después de la superinfección, se generó una variante viral que mostró menor eficiencia en la producción de sincitio (*RSV_{per}*), con respecto al *RSV Long* de referencia (*RSVLab*), en células VERO (línea celular de riñón de mono verde); mientras que en H358 (línea celular de carcinoma bronquioalveolar, de origen humano) la eficiencia en la formación de sincitio fue similar a la del *RSVLab*. También se obtuvo una revertante espontánea (*RSV_{rev}*), cuya eficiencia en la formación de sincitio en células VERO y H358 fue similar a la del *RSVLab*. El tratamiento con tripsina del *RSV_{per}* incrementa la infectividad, el número y tamaño de sincitia, por el contrario cuando el *RSV_{per}* y el *RSVLab* se trataron con tripsina no se observó ningún efecto. Las bases genéticas del fenotipo observado en *RSV_{per}* se investigaron comparando las secuencias de la proteína F de la mutante, la revertante y el *RSV Long*.

Se encontraron cinco cambios en la secuencia de *RSV_{per}* (Lis123Asn, Lis209Glu, Ile292Cis, Lis293Tre, Glu294Val, Fen351Tyr, Ile381Leu y Ser560Cys) que no se encontraron en *RSVLab* y *RSV_{rev}*, lo que sugiere que algunos de estos cambios pudieran estar relacionados con el fenotipo observado en *RSV_{per}*. También reportamos otros cambios en *RSV_{per}* que se encuentran en *RSV_{rev}* o *RSVLab*, que probablemente no estén involucrados con el fenotipo de la mutante. La participación de estas mutaciones en el fenotipo observado está por determinarse.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I INTRODUCCIÓN.

Aspectos epidemiológicos y clínicos de la infección por el RSV.

El RSV se considera mundialmente como uno de los principales patógenos causantes de infecciones severas del tracto respiratorio inferior que requieren hospitalización y son la principal causa de morbilidad y mortalidad en niños menores de 2 años (1, 2, 3). En México datos epidemiológicos (4) reportan a las infecciones respiratorias entre las tres primeras causas de muerte infantil a nivel nacional. En Estados Unidos de Norte América, el RSV causa anualmente 9000 hospitalizaciones y alrededor de 4500 muertes, el riesgo se incrementa en los casos en que se presentan padecimientos tales como hipertensión pulmonar, cirugía e inmunosupresión (5, 6, 7, 8, 9).

La infección por este virus se presenta principalmente en niños entre las 6 semanas y los nueve meses de edad, origina síntomas respiratorios del tracto respiratorio superior (flujo nasal, estornudo, faringitis y malestar en general). Sin embargo, entre el 25 y 40% de estas infecciones tienen una evolución hacia el tracto respiratorio inferior, cuyas principales manifestaciones son bronquiolitis y neumonía (10, 11).

La infección primaria no induce inmunidad protectora por lo que a lo largo de la vida se presentan infecciones recurrentes (12). La infección por el RSV en adultos es común, en personas mayores de 60 años y en pacientes inmunocomprometidos llega a presentarse en forma severa, la mortalidad asociada a neumonía en estos casos puede ser muy alta (80-100%) (13).

Las infecciones del tracto respiratorio inferior durante la infancia son un factor de riesgo para el desarrollo posterior de padecimientos crónicos de las vías respiratorias en adultos. Estudios epidemiológicos indican que la frecuencia y severidad de síntomas pulmonares en adultos están asociados con antecedentes de enfermedad respiratoria durante la infancia (13). Neumonías en adultos con padecimientos crónicos han demostrado en diversos estudios que el RSV se encontró en el 50% de los casos (14).

La persistencia por el RSV en humanos es un área de interés importante debido a que se sospecha de la participación de este virus en procesos de hiperreactividad crónica. Padecimientos como enfermedad obstructiva crónica y dificultad para respirar, se han asociado con bronquiolitis debida a la infección por RSV (15).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Aunque la persistencia del RSV en humanos no está claramente demostrada, existen observaciones que lo sugieren como son: 1) el virus se ha aislado de la nasofaringe de niños aparentemente sanos (16); 2) se ha detectado al antígeno viral en osteoclastos y células de pacientes con la enfermedad de Paget (17, 18, 19); 3) en análisis post-mortem de tejidos de niños se ha encontrado RNAm viral, durante los meses en los cuales no es posible aislar al virus y puesto que el humano es el único hospedero natural se sugiere la persistencia (20); 4) las constantes reinfecciones en niños y los casos reportados de bronquitis obstructiva crónica y bronquitis recurrente (21, 22, 23); 5) persistencia del virus en pacientes con inmunodeficiencia enfermos de SIDA y en niños con inmunodeficiencias congénitas (9, 10, 24) y 6) evidencia *in vivo* de infección persistente por el RSV en linfocitos de pacientes infantiles que adquirieron al RSV en forma natural (25).

La persistencia del RSV bovino se ha reportado en su hospedero natural, el RSV humano y el bovino están altamente relacionados, ya que anticuerpos contra el RSV humano reaccionan con el RSV bovino (26) y también existe alta homología en la secuencia de las proteínas NS1 y NS2 (69 y 84% respectivamente) (27).

Actualmente se cuenta con estudios de persistencia a nivel experimental por el RSV.

In vivo: 1) en el modelo animal de cobayo se ha documentado que durante la infección por el RSV, es posible detectar la presencia del genoma y proteínas del virus en pulmón aún después de que el cuadro agudo desaparece (28). 2) Otros reportes señalan que es posible detectar la presencia del genoma del RSV hasta 6 meses después de la infección y recuperación del virus infeccioso en presencia de altos títulos de anticuerpos (29, 30).

In vitro: 1) En infecciones en células HEP-2, BSC1 y Linfocitos B (humano) se reportó disminución en la producción de virus extracelular con respecto a una infección aguda, no se observó muerte celular en estos cultivos y por inmunocitoquímica se detectó la presencia de antígenos virales en las células infectadas (31, 32, 33, 34, 35). 2) En la línea celular de fibroblastos de ratón (Balb/C) infectada persistentemente se reportó un alto porcentaje de células que expresaron antígeno viral y producción de virus infeccioso extracelular en bajos niveles (36). 3) Bangham *et al.* 1986 (37), reportaron la persistencia

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

del RSV en una línea celular de origen linfóide (células B de linfoma de ratón), con resultados similares a los reportados por Fernie *et al* 1981 (36).

Respuesta inmune a la infección por RSV.

La respuesta inmune originada por RSV es permanente pero limitada, ya que las re-infecciones son frecuentes aún en presencia de altos títulos de anticuerpos neutralizantes (9, 10, 24). El papel de la respuesta inmune en la protección contra la infección por el RSV aún no es claro (39, 40, 41, 42). Si bien la respuesta inmune celular parece jugar un papel importante en la recuperación de la infección por el RSV, ésta se ha asociado con la exacerbación de la enfermedad.

El RSV se considera como un potente estimulador de la expresión y/o secreción de mediadores proinflamatorios e inmunomoduladores, lo cual se ha demostrado ampliamente en células epiteliales del tracto respiratorio, que son el sitio primario de replicación del virus y en otros tipos de células (monocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos). *In vitro*, en células epiteliales y macrófagos, se ha demostrado que el RSV induce la expresión de IL-1, TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, MIP-1 α , MCP-1, TARC e IFN- β , entre otros. El TNF α se ha asociado a procesos inmunopatológicos ya que tiene un papel importante en el reclutamiento de neutrófilos y eosinófilos, quizá por la producción incrementada de quimiocinas, induciendo la extravasación de las células en el pulmón. La inducción de IL13 también se ha asociado a la inmunopatología viral, ya que parece estar incrementada en respuestas alérgicas y en procesos inflamatorios. Finalmente la producción de MIP1- α e IL-8 se han visto asociadas con cuadros severos de inflamación y daño pulmonar, por su contribución en el reclutamiento celular (10, 12, 39, 43, 44, 45, 46).

La infección por el RSV se inicia en la nasofaringe, por lo general se controla a ese nivel, no obstante en gran parte de los infantes el virus pasa al tracto respiratorio inferior e infecta los bronquiolos y alvéolos donde se presenta una respuesta inflamatoria la cual se le asocia con la patología y la sintomatología de la enfermedad (9, 10, 24).

El mecanismo por el cual se induce la reacción inflamatoria no está claro, sin embargo, es probable que citocinas producidas por las células infectadas (epiteliales, macrófagos y linfocitos) en respuesta a la infección viral participan en la patología. En

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

apoyo a esta interpretación se tienen observaciones *in vitro* y *ex vivo* que demuestran que dichas estirpes celulares son permisivas al RSV y su infección induce la producción de citocinas proinflamatorias (5, 47, 48, 49, 50).

Infección de macrófagos con RSV.

En la infección por RSV los macrófagos son las primeras células con las que el virus tiene contacto después de pasar la membrana basal del epitelio, además en los alvéolos durante el proceso infeccioso estas células se encuentran en mayor proporción que otras (51).

Los macrófagos alveolares son la primera línea de defensa contra patógenos inhalados y están expuestos al RSV en el transcurso de la infección. Las partículas virales modifican las funciones de los macrófagos alveolares, lo cual puede contribuir al riesgo de adquisición de infecciones secundarias de tipo bacteriano durante o después de la infección por el virus (47, 51, 52, 53). Se ha reportado que los macrófagos alveolares y periféricos son susceptibles a la infección por el RSV *in vitro* (48), y producen virus infeccioso por más de 25 días. En estudios *in vivo*, en cobayos inoculados con el RSV por vía intra-nasal se demostró que proteínas virales y RNA genómico pueden persistir en el pulmón hasta más de 60 días post-infección, la presencia del virus en los macrófagos alveolares se asoció con la patogénesis de una inflamación crónica bronquial (54, 55, 56).

La capacidad de los virus para infectar linfocitos y macrófagos tiene implicaciones considerables en la patogenia de la enfermedad de las vías respiratorias y probablemente juega un papel importante en la diseminación de la infección (57).

Modelo murino de infección por el RSV.

En 1988, Graham reportó un modelo de neumonía con el RSV en ratones BALB/c adultos. En ese modelo se necesitó una dosis de 10^7 unidades formadoras de placas/ml, el inóculo se administró por vía intranasal, dando como resultado obtención de altos títulos de virus en el pulmón, desarrollo de la sintomatología clínica y patología del pulmón. A partir de ese momento se han realizado modificaciones al modelo con la finalidad de reproducir la histopatología y estudiar la respuesta inmune que se desarrolla durante la infección (42).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El modelo murino se ha utilizado ampliamente para el estudio de la inmunidad e inmunopatología por el RSV. Además en el desarrollo de nuevas vacunas, también es importante contar con un modelo animal que permita establecer la patogenicidad de las cepas de RSV y producir material genéticamente estable para su uso. Por lo anterior, en este trabajo decidimos utilizar una línea celular similar a macrófagos de origen murino (P388D1)

Persistencia Viral.

Para que un virus permanezca en el organismo es necesario que éste sea capaz de infectar a la célula sin producir muerte celular y que pueda evadir su detección y eliminación por el sistema inmune del hospedero (57, 58).

Los virus han desarrollado diferentes estrategias para el establecimiento de la persistencia tales como:

- Restricción del efecto viral citolítico.

Un requerimiento básico para la persistencia viral es la sobrevida de un número crítico de células infectadas. Un virus puede persistir en una célula si no la mata y altera sus funciones vitales. Por ejemplo muchos arnavirus pueden replicarse en una célula sin matarla y sin afectar su tasa de crecimiento, este fenotipo no lítico permite a muchos arnavirus sobrevivir en la naturaleza originando infecciones crónicas en sus hospederos (59, 60).

- Coevolución virus-célula.

El mecanismo por el cual los virus de RNA citolíticos establecen y mantienen una infección persistente en células en cultivo no está claro, pero se tienen evidencias con los virus FMDV (foot and mouth disease), poliovirus, reovirus y parvovirus que co-evolucionan con la célula para el establecimiento y mantenimiento de la persistencia. En estos casos las células resisten el efecto citopático y bloquean la infección viral, favoreciendo la selección de variantes virales las cuales son capaces de replicarse eficientemente en estas células, lo que sugiere la evolución del virus y la célula hospedera.

Aunque los mecanismos de resistencia de la célula hospedera, la subsecuente adaptación del virus y la coevolución en cultivo y su papel en la persistencia viral aún no

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

están bien entendidos, se propone que la regulación en la expresión de los genes virales, es una estrategia probable utilizada por los virus para permanecer en la célula (61).

- Generación de variantes virales.

La evolución de los virus de RNA está determinada por su alta variabilidad. La alta tasa de mutación y la recombinación tanto entre homólogos como no homólogos permiten la generación elevada de secuencias nuevas. Muchas mutaciones pueden ser deletéreas y eliminadas por selección natural, pero otras se seleccionan con base en el ambiente particular en el que el virus se esté replicando (respuesta inmune del hospedero y el efecto de agentes antivirales), de esta forma las mutaciones pueden llegar a ser dominantes en la población (62, 63).

Otro factor que puede influir en la evolución de los virus y en la selección de las variantes virales es la influencia de los tejidos y tipos celulares del hospedero durante una infección crónica (64, 65, 66). Sin embargo, el factor más importante que puede afectar la generación de mutantes virales, es la naturaleza misma del virus. De esta manera, existen regiones invariables en el genoma de diferentes virus que no pueden tolerar sustituciones y que son indispensables para la replicación viral. (62, 63).

Existe un número considerable de evidencias *in vitro* de que las mutantes generadas a partir de un virus silvestre con características citolíticas, poseen un potencial lítico modificado. Diferentes tipos de variantes virales se han implicado en el establecimiento de infecciones persistentes *in vitro*, tales como: 1) mutantes temperatura sensibles, 2) mutantes que producen placa pequeña y 3) partículas defectuosas-interferentes (DI's) (67, 68, 69, 70).

En algunos sistemas las bases genéticas de la atenuación son conocidas, así como el papel que desempeñan algunos genes virales en la persistencia. Por ejemplo, durante la persistencia por reovirus se ha demostrado que mutaciones en genes virales específicos son cruciales para el establecimiento y mantenimiento de la infección persistente en células L-929 (57). También se ha demostrado que algunas alteraciones en las glicoproteínas de virus sindbis modifican el potencial lítico de este virus en las neuronas. Estos estudios ilustran el concepto de que pocos cambios en los aminoácidos de los genes virales, convierten una infección lítica en persistente (71, 72, 73).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Virus Sincitial Respiratorio (RSV).

El RSV es un virus envuelto, su material genético está constituido de RNA de una sola cadena no segmentado de 15385 nt y posee regiones no codificantes (leader y trailer). El RNA viral codifica para 10 proteínas, 8 estructurales y 2 no estructurales (Fig. 1). Pertenecce a la familia: *Paramixoviridae* Subfamilia *pneumovirinae*.

El RNA viral codifica para 10 mRNA subgenómicos, cada uno tiene un marco de lectura, excepto M2 el cual contiene dos marcos de lectura, uno codifica para la proteína M2-1 y otro para M2-2.

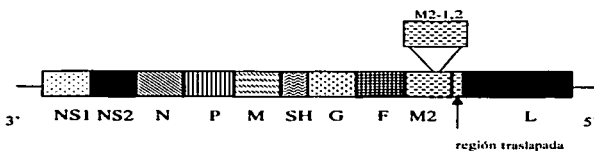


Figura. 1 Diagrama esquemático del genoma viral.

Al inicio de cada gen, se encuentra una secuencia de 10 nts (gene start, GS), altamente conservada 3'- CCCCGUUUA, excepto para el gen L cuya señal es 3' CCCUGUUUUA, cada gen termina con una secuencia semiconservada 12-13 nts (gene end, GE) que dirige la señal de poliadenilación y la liberación del mRNA. Los primeros 9 genes están separados por regiones intergénicas. Los dos últimos genes se traslapan por 68 nts., la secuencia GS de L se encuentra dentro del gen M2 (74).

El RSV contiene una doble capa lipídica, la cual se deriva de la membrana plasmática de la célula hospedera, esta envoltura contiene 3 glicoproteínas virales, la de unión a la célula (G), la de fusión (F) y una pequeña proteína hidrofóbica (SH) cuya función aún no está clara. Cubriendo a la nucleocápside se encuentra la proteína de matriz (M) y formando la nucleocápside están las proteínas N, P (fosfoproteína), L (polimerasa) y M2-1 (factor de anti-terminación) (Fig. 2). Las proteínas NS1 y NS2 son no estructurales y aunque no se ha identificado su función, se sugiere que pueden estar involucradas en la modulación de la transcripción puesto que sus transcritos se sintetizan

al inicio de la infección y se acumulan en las células infectadas, además se ha reportado que interfieren con la actividad del interferón (27).

El virión tiene un diámetro entre 150 y 300 nm, similar a los otros paramixovirus. La diversidad antigénica de los diferentes aislados está determinada por la variación en las glicoproteínas F y G. Con base en la diversidad genética de la glicoproteína G, el RSV se divide en dos grupos A y B. La secuencia completa del genoma de los subgrupos A y B tiene el 81% de homología, la divergencia más grande se encuentra en el ectodominio de la proteína G, la cual tiene el 44% de identidad entre los dos subgrupos; dentro de un mismo subgrupo la secuencia de aminoácidos de la proteína G puede variar hasta en un 20%. Estos dos grupos circulan en la población, en una misma epidemia, siendo el de mayor prevalencia el grupo A. Sin embargo, la severidad de la enfermedad no se asocia preferentemente con alguno de los tipos virales en particular (10).



Figura 2. Diagrama esquemático de la estructura del RSV, en color amarillo se muestra la envoltura viral (proteínas G, F), en azul la matriz (proteína M) y en gris se representa la estructura del complejo ribonucleoproteico (<http://www.bio.warwick.ac.uk/easton/diagrams.htm>)

- Proteína G.

La glicoproteína G se considera involucrada con la unión del virus a la célula, debido a que esta unión se bloquea con anticuerpos monoclonales específicos (75, 76). Es una glicoproteína integral de membrana tipo II con una región hidrofóbica cercana al extremo N-terminal, que permite el anclaje a la membrana celular dejando el extremo C-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

terminal expuesto hacia el espacio extracelular. Durante la infección por el RSV también se sintetiza una fracción soluble de la glicoproteína G, la proteína soluble carece de los 65 aminoácidos del extremo amino terminal (señal de anclaje a la membrana de las células) (77). La proteína G es altamente glicosilada (80-90 kd) (78, 79), sin embargo, es posible encontrar formas parcialmente glicosiladas (45-80 kd). Esta proteína presenta una gran variación antigénica, que se relaciona principalmente con cambios en el ectodominio, el cual presenta un 44% de homología entre los dos subgrupos, mientras que el dominio transmembranal y el dominio citoplásmico tienen homología del 83% (80, 81, 82, 83).

La proteína G del RSV, tiene dos regiones altamente conservadas en el ectodominio, que es posible que estén relacionados con el sitio de unión al receptor, la región 182-186 (CWAIK) que reconoce al receptor CXCR3 y 184 a 198 es posible que sea el sitio de unión con el receptor celular (glicosaminoglicanos) (84, 85, 86, 87).

- Proteína SH.

Es una proteína integral de membrana, con el extremo C-terminal orientado extracelularmente. Se acumula abundantemente dentro de la célula en diferentes formas: SH0 (Mr 7500); SHg (Mr 13000 a 15000); SHp ((Mr 21,000 a 60,000). La función de la proteína SH aún no se conoce. Un virus recombinante que carece del gen SH, es capaz de replicarse eficientemente en cultivos celulares y formar sincitio, sin embargo transfectando con los genes G, F y SH la formación de sincitio es más eficiente sugiriendo que la proteína SH facilita la fusión (88, 89, 90).

- Proteína F.

La proteína de fusión (F) se sintetiza como un precursor inactivo (F0, 574 aminoácidos), participa en la penetración del virus a la célula y en la formación de sincitio (91). F0 se ensambla como homo-oligómero en el retículo endoplásmico y se corta por la acción de una proteasa celular (furina, RXR/RR) en el trans-Golgi, dando como resultado dos polipéptidos unidos por puentes disulfuro, F1 y F2. En estudios recientes se ha reportado que probablemente otra proteasa celular participe en el procesamiento de F0 (92, 93, 94, 95, 96). Recientemente se ha reportado que la proteína F (F1) se une a heparina (97) y a TLR4 y CD14 (98), por lo que se sugiere que también tenga un papel importante en la unión del virus a la célula blanco.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

F es una proteína integral de membrana tipo I, contiene en el extremo amino terminal una secuencia señal que dirige al péptido naciente a la membrana del retículo endoplásmico, en donde se le añaden carbohidratos y se ensambla en un homo-oligómero (probablemente un tetramero). En su extremo carboxilo tiene un dominio hidrofóbico que permite el anclaje en la membrana, dejando un tallo citoplásmico corto (20-40 residuos) (99, 100).

El estudio de la secuencia de la proteína F indica que en el extremo amino terminal de la subunidad F1 se encuentran 20 residuos que son altamente hidrofóbicos (péptido de fusión), esta región está altamente conservada entre los paramixovirus (más del 90% de identidad). Existen evidencias experimentales que sugieren que este extremo está involucrado en el fenómeno de fusión, la hidrofobicidad de esta región sugiere que la interacción puede ocurrir entre esta región y la membrana celular.

F tiene dos dominios repetidos, uno (dominio A) adyacente al dominio de fusión y el otro (dominio B) adyacente al dominio transmembranal (Fig. 3). Estos dominios pueden formar una estructura en espiral de tres α hélices. Se sugiere que el péptido de fusión cambia su conformación cuando la proteína entra en contacto con la membrana celular, generándose una estructura más fusogénica.

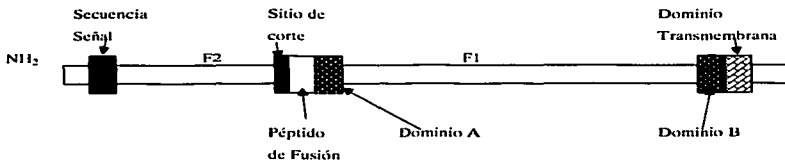


Figura 3. Diagrama esquemático de la proteína de fusión en el que se muestran los dominios importantes estructural y funcionalmente.

Los estudios realizados con el virus del sarampión (paramixovirus), han demostrado que las mutaciones en el dominio B alteran la actividad de fusión, aún cuando no se presentan cambios en la formación de los oligómeros ni en la expresión de F en la

membrana, por lo que se sugiere que este dominio puede estar directamente involucrado en promover la fusión (101-109).

- **Proteína M.**

La proteína M (matriz), se encuentra dentro de la partícula viral, se proponen dos funciones generales: a) participa en el ensamble del virion, mediando la asociación entre la nucleocápside con la envoltura y b) permite que la nucleocápside permanezca transcripcionalmente inactiva antes del empaquetamiento (10).

- **Proteínas N, P y L.**

N: Se une al RNA genómico y al antigenómico para formar la nucleocápside y protegerla de la acción de RNAsas (110).

P (fosfoproteína): Se ha sugerido que puede funcionar como una chaperona de N, que colabora con N para la encapsidación del genoma y que actúa como cofactor de la polimerasa (110, 111, 112).

L: contiene seis segmentos discretos que contienen residuos altamente conservados en los Paramixovirus, tiene actividad de polimerasa (110).

- **Proteínas NS1 y NS2.**

NS1 y NS2 son proteínas no estructurales, cuando se expresa NS1 se ha observado que inhibe la replicación y la transcripción de RNA. NS2 al expresarse en altos niveles también tiene un efecto inhibitorio (27).

- **Proteína M2.**

M2-1: es un factor de anti-terminación esencial para la replicación viral, se une a la proteína N y se puede encontrar como parte del complejo N-P (113, 114, 115, 116).

M2-2: se sugiere que está involucrada en la replicación y la transcripción del RNA. Se ha reportado que al infectar células HEp-2 con virus recombinantes que carecen del gene M2-2, se observa incremento en la transcripción y reducción en la replicación del RNA, por lo que el virus mutante crece más lentamente que el virus silvestre (117, 118).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Con base en estos antecedentes, se propone el desarrollo de un modelo de persistencia del virus sincitial respiratorio *in vitro* utilizando la línea celular P388D1 de origen murino similar a macrófagos. Consideramos importante el estudio de la persistencia en esta línea celular debido a que como ya se mencionó anteriormente, los macrófagos son la primera línea de defensa contra patógenos inhalados y están expuestos al RSV en el transcurso de la infección. También se tienen reportes de que estas células son susceptibles a la infección por este virus y probablemente participan en la diseminación de la infección.

El disponer de un modelo *in vitro* de persistencia viral, provee una herramienta para el estudio de la interacción virus-macrófago y nos permite estudiar los factores que influyen en el establecimiento y mantenimiento de la infección persistente por el RSV. Además permite el estudio de aspectos celulares e inmunológicos en una estirpe celular que probablemente esté relacionada con la diseminación de la infección.

Los virus han desarrollado diferentes estrategias para el establecimiento y mantenimiento de la persistencia. Una estrategia posible es la presencia de cambios en el genoma viral responsables de que un virus citopático permanezca en la célula hospedera. Diferentes tipos de variantes virales se han implicado en el establecimiento de infecciones persistentes *in vitro*, tales como, mutantes temperatura sensibles, mutantes que producen placa pequeña y partículas defectuosas interferentes.

El conocimiento de las funciones independientes de los dominios específicos de la proteína F, podrían permitir crear vectores virales o la optimización de vacunas. En este sentido la obtención de una mutante viral menos fusogénica en el presente trabajo, nos plantea la posibilidad de estudiar a la proteína F y su posible papel en el mantenimiento de una infección persistente así como el análisis del genoma para localización de dominios específicos importantes en la persistencia viral.

Por lo anterior se decidió caracterizar al virus obtenido en nuestro modelo de persistencia *in vitro*, con la finalidad de identificar las posibles mutaciones en el genoma responsables de este fenotipo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

HIPÓTESIS.

El virus sincitial respiratorio obtenido de cultivos persistentemente infectados presenta cambios fenotípicos y genotípicos respecto al virus original.

OBJETIVO GENERAL.

Investigar alteraciones fenotípicas y genotípicas del virus sincitial respiratorio obtenido de la línea celular similar a macrófagos infectada persistentemente.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Establecer el cultivo infectado persistentemente con el RSV cepa Long (RSVLab) en células P388D1 (similares a macrófagos).
- Caracterizar el cultivo persistente por:
 1. Análisis comparativo de la morfología de las células del cultivo infectado persistentemente versus células no infectadas.
 2. Producción de virus intracelular (por sonicación de las células) y extracelular (en los sobrenadantes).
 3. Detección del antígeno viral en las células infectadas por inmunofluorescencia y por ensayo de citometría de flujo.
 4. Expresión del gene N por RT-PCR.
 5. Resistencia a la superinfección con el virus original.
- Analizar los virus producidos durante la persistencia viral por:
 1. Producción de partículas interferentes (DI's) a la infectividad viral.
 2. Inhibición de la interferencia viral.
 3. Neutralización de la interferencia.
 4. Confirmación del fenotipo del virus obtenido del cultivo persistente.
 5. Determinar comparativamente cambios en el genoma del virus versus el virus RSVLab.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV. MATERIAL Y METODOS.

Líneas celulares.

Células P388D1 (American Type Culture Collection (ATCC) TIB 63), donadas por Dr. A. Tingle [Research Center, University of Vancouver, adquiridas originalmente del ATCC]. Esta línea se aisló de un neoplasma linfoide (P388) inducido en ratón DBA/2 (H-2^d) con metilclorantreno y presenta características similares a macrófagos (en lo sucesivo se denominarán macrófagos, M ϕ). Las células se crecieron en monocapa en medio RPMI 1640-ME.

Células HEp-2 (ATCC CCL23), células de carcinoma epidermoide de laringe de origen humano.

Células H358 (ATCC 5807-CRL), línea celular de carcinoma bronquioalveolar, de origen humano.

Células VERO (ATCC CCL 81), línea celular de fibroblastos de riñón de mono verde.

Células A549 (ATCC CCL 185), células de carcinoma de pulmón humano.

Las células HEp-2, VERO y A549 se propagaron en D-MEM, en cambio las células H358 en medio RPMI y los macrófagos P388D1 en RPMI-ME.

La composición de los medios de cultivo, amortiguadores y soluciones se describe en el apéndice.

Virus.

a. Propagación.

El RSV cepa Long (RSVLab), fue donado por el Dr. Trudel del Instituto Armand Frappic, Canadá y fue propagado como se describe a continuación: Las monocapas de células VERO semiconfluentes crecidas en botellas de 160 cm², se infectaron con RSVLab a una multiplicidad de infección (moi) de 0.5 durante 1 hr a 37°C para permitir la adsorción del virus. Después de este tiempo se retiró el sobrenadante y se agregó medio D-MEM suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB) (medio para infectar). Cuando el efecto citopático fue claramente visible (48-72 hrs post-infección, pi), las células se desprendieron mecánicamente y se sonicaron por 10 min (sonicador Cole-Parmer Ultrasonic Cleaner mod. 8846-50). Se centrifugaron por 10 min a 1500 rpm., los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

sobrenadantes se colectaron y se añadió MgSO_4 a una concentración de 0.1 M para mantener la infectividad del virus. Se conservó a -70°C hasta su uso.

b. Purificación.

La suspensión viral se concentró con polietilenglicol (PEG) a una concentración final de 8% durante 24 hrs a 4°C , y se centrifugó a 9500 rpm. durante 1 hr a 4°C en un rotor Beckman 45Ti. La pastilla obtenida se resuspendió en amortiguador TNE. La suspensión se tituló por $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ en células VERO.

El virus concentrado se purificó por gradiente lineal de sacarosa 20-60%, con centrifugación a 25,000 rpm durante 6 hrs a 4°C en un rotor SW40 Ti. La fracción que contenía una banda visible se colectó. La presencia del virus se determinó mediante la titulación de la infectividad por $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ en células VERO y la densidad (g/cm^3) por refractometría (refractómetro Carl Zeiss 120371) y se calculó mediante la siguiente fórmula: $\rho_{20^\circ\text{C}} = 2.7329\eta - 2.6425$, $\eta =$ unidades de refracción.

Obtención de anticuerpos.

a. Inmunización.

Se inmunizaron conejos Nueva Zelanda de 2.5-3.0 Kg con 150 a 200 μl de virus purificado con un título de 4.3×10^4 $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ y un contenido de 200 a 300 μg de proteína. Se aplicaron tres inyecciones subcutáneas a intervalos de 21 días utilizando adyuvante completo de Freund en la primera aplicación e incompleto en las dos siguientes. Los conejos con anticuerpos anti-RSV séricos neutralizantes de la infectividad viral se sangraron a blanco.

b. Titulación de anticuerpos neutralizantes en el suero.

La concentración de anticuerpos neutralizantes se determinó de acuerdo al método descrito por Trudel M. 1993, brevemente: La suspensión viral con un título de 2.8×10^4 $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ se diluyó en seric 1:3 en medio para infectar en una proporción de 35 $\mu\text{l}/70$ μl ; 50 μl de cada una de las diluciones se mezclaron con un volumen igual de suero inmune sin diluir y se incubaron 60 min a 37°C . Se añadieron 50 μl de la mezcla virus-anticuerpo a monocapas de células HEP-2 propagadas en placas de 96 pozos, se dejaron adsorber durante 2 hrs a 37°C , después de éste tiempo el inóculo se retiró y se reemplazó por 150 μl de medio para infectar, incubándose a 37°C hasta observar efecto citopático y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

el título se calculó de acuerdo a la última dilución donde el efecto citopático se inhibió y se expresó TCID₅₀/ml, neutralizados. Para confirmar el título y en aquellos casos en los que por el procedimiento anterior la determinación del título no fue clara se realizó la siguiente modificación: Se realizaron diluciones seriadas del suero inmune 1:3 en el medio anteriormente descrito, a 50 µl de cada dilución se le agregaron 50 µl de la suspensión viral sin diluir, con un título de 2.8×10^8 TCID₅₀/ml y se continuó de acuerdo al procedimiento anteriormente descrito. Cada ensayo se realizó por duplicado (119).

c. Purificación de IgG's por cromatografía de afinidad (Proteína A-Sepharosa).

La proteína A se hidrató en una proporción de 1 g en 4 ml de agua desionizada para una columna de 7 ml (montada en una jeringa de 20 ml). La columna se lavó con 40 ml de amortiguador de fosfatos 0.5 M pH 8.0, seguido por un lavado con 20 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 8. Se aplicó la muestra y se incubó 2 hrs a temperatura ambiente (TA). Se eluyó con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 8, en las fracciones recogidas (1ml) se determinó la densidad óptica (DO) a 280 nm en un espectrofotómetro y se eluyó hasta obtener una densidad óptica de cero. Las IgG's se eluyeron tratando con ácido acético 0.1 M/NaCl 0.15 M y se determinó la DO en las fracciones colectadas. Las fracciones recuperadas fueron aquellas con valores de DO entre 1.241-2.172. Se juntaron las fracciones y se ajustó el pH a 7 con PBS 10X, se lavó la columna con amortiguador de fosfatos 0.5 M pH 8 y se dejó con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 8. Las IgG's se dializaron contra PBS pH 7.4 y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (120, 121). La composición proteica de la mezcla se analizó en geles de acrilamida al 10% en condiciones reductoras y se determinó el título de anticuerpos neutralizantes de acuerdo al método descrito.

Obtención del cultivo infectado persistentemente.

El cultivo de macrófagos infectados persistentemente (M ϕ per) se obtuvo por infección de M ϕ a una moi=1 con RSVLab, se incubó 1 hr a 37 °C, después de este tiempo se retiró el medio y se añadió medio fresco (RPMI con 2% de SFB). A las 24 hrs pi, se lavó dos veces con medio fresco y se cambió el medio por RPMI con 10% de SFB y se determinó el número de células viables por exclusión de azul tripano a las 24, 48, 72 y 96 hrs pi y se determinó el título del virus extracelular por TCID₅₀/ml. El cultivo se

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

mantuvo durante 6 días con cambio de medio diariamente, las células que sobrevivieron a la infección se propagaron, 2 veces a la semana. En adelante me referiré a este cultivo como Møper0. Paralelamente se realizó un control de macrófagos no infectados el cual se trató en las mismas condiciones. La viabilidad se determinó en ambos cultivos a las 24, 48, 72 y 96 hrs. La persistencia viral en el cultivo se confirmó por: 1) producción de virus intracelular (por sonicación de las células) y extracelular (en los sobrenadantes), 2) detección del antígeno viral en las células infectadas por inmunofluorescencia y por ensayo de citometría de flujo, 3) expresión del gene N por RT-PCR, 4) producción de partículas interferentes a la infectividad viral y 5) resistencia a la superinfección con el virus original.

Caracterización del cultivo infectado persistentemente.

a. Morfología de las células del cultivo infectado persistentemente.

Determinación del área y perímetro en Mø y Møper0: Se comparó el área y el perímetro entre el cultivo de Mø y el de Møper0, mediante el uso de un microscopio (Zeiss, FOM1) con una video cámara acoplada (Hitachi VKM 98E) y un programa para análisis digital de imágenes (Image Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Para este efecto las células (1×10^5) se crecieron en portaobjetos de poliestireno de 8 pozos (Nunc) y se fijaron por 30 min a TA con glutaraldehído en amortiguador de fosfatos 0.1M pH=7.4. Se lavaron 3 veces con PBS y para cada pozo se analizaron 5 diferentes campos (4 esquinas y uno en el centro).

b. Producción de virus extracelular e intracelular.

- Titulación del virus por TCID₅₀/ml.

La infectividad de los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos infectados persistentemente se determinó en monocapas de células VERO semiconfluentes, crecidas en placas de 96 pozos en medio D-MEM con 5% de suero fetal de ternera. Los pozos se infectaron con diluciones seriadas de la suspensión viral 1:3 en medio D-MEM con 2% de SFB, hasta una dilución final de 1.2×10^6 , incubándose 1 hr para permitir la adsorción del virus, retirando posteriormente el inóculo. Cada ensayo se realizó por cuadruplicado. Las placas se incubaron hasta la observación de efecto citopático (3-6)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

días. El título viral se expresó en TCID₅₀/ml y se determinó utilizando la fórmula de Kärber (119).

El virus intracelular se determinó después de lavar los cultivos de macrófagos persistentes, 20 veces, con RPMI suplementado con 1% de suero fetal, para eliminar el virus extracelular, posteriormente se sonicaron (sonicador Cole-Parmer Ultrasonic Cleaner modelo 8846-50) por 10 min y se tituló la infectividad por TCID₅₀/ml.

- Titulación por focos de infección.

Células H358 y VERO se propagaron en cubreobjetos, previamente esterilizados y colocados en placas de 6 pozos para cultivo. Cuando alcanzaron un 80% de confluencia se infectaron con 50 µl RSVLab y con diluciones 1:2 de los sobrenadantes del cultivo persistente. Después de 24 hrs pi las células se fijaron con acetona 10 min a TA, los cubreobjetos se lavaron 2 veces con PBS, se añadieron 25 µl del anticuerpo anti-RSV conjugado con FITC (DAKO, diluido 1:5 en PBS) y se incubó 30 min a 37°C, se lavaron dos veces con PBS y se dejaron secar a TA. Para calcular el número de focos infecciosos en cada caso se contaron 45 campos en un microscopio de epifluorescencia con el objetivo de 40X.

El número de focos/ml, se calculó en la dilución en donde se contaron al menos 100 focos, con base en la siguiente ecuación:

Focos/ml = 20 x número de focos contados x factor de dilución x 5 (área del cubreobjetos, que se estandarizó para contar 45 campos usando el objetivo de 40X).

- Porcentaje de células infectadas.
- Inmunofluorescencia indirecta.

Los macrófagos no infectados, los infectados en forma aguda a una moi=1 con RSVLab y los diferentes pases del cultivo infectado persistentemente se crecieron en portaobjetos de poliestireno de 8 pozos (NUNC), tratados con 100 µl de polilisisina (10 mg/ml) por 20' a TA previamente lavados con PBS estéril. Se añadieron 1 X 10⁵ células y se incubaron por 24 hrs a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente las células se fijaron con metanol por 5 min y acetona 30 seg, la preparación se dejó secar al aire y se lavó dos veces con PBS estéril. Se bloqueó toda la noche a 4°C con PBS con 1% de suero fetal y se lavó 3 veces con PBS con 0.25% de albúmina sérica bovina (ASB) y 0.3% de Tween 20, solución de lavado. Se añadió el anticuerpo anti-RSV obtenido en conejo (con un

título de 1×10^5 TCID₅₀/ml neutralizadas) y diluido en PBS con 0.5% de ASB 1:100 y se incubó 1 hr a 37°C. Se lavó 3 veces con la solución de lavado, posteriormente se añadió anti-IgG de conejo conjugado con FITC diluido 1:500 en PBS con 0.5% de ASB y se incubó por 30 min a TA. El porcentaje de células infectadas se determinó por observación al microscopio de epifluorescencia (Nikon Diaphot) contando al menos 300 células en diferentes campos.

- Ensayo de citometría de flujo.

El ensayo se realizó en tubos eppendorff previamente sensibilizados con 1 ml de amortiguador de lavado estéril (PBS con 0.1% de ASB, filtrado por membrana de 0.22 μ) a 37°C por 30 min.

1×10^5 macrófagos infectados en forma aguda a $moi=1$, macrófagos no infectados y diferentes pases del cultivo infectado persistentemente se trataron con PBS con 1% de SFB por 30 min a 4°C en agitación continua. Después se lavaron en frío 2 veces con el amortiguador de lavado y se incubaron 2 hrs en agitación constante a 4°C con el suero de conejo anti-RSV (100 μ g en 500 μ l de medio RPMI). Posteriormente se lavó 2 veces de la misma forma descrita anteriormente y se fijaron con paraformaldehído al 0.5% en PBS pH 7.4 (preparado en el momento) por 30 min a 4°C. El anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con fluoresceína se utilizó a una dilución 1:500 en amortiguador de lavado y se incubó por 2 hrs a 4°C en agitación constante. Finalmente se lavó 2 veces y se analizó la fluorescencia en un analizador FACScan (Becton-Dickinson), en cada determinación se analizaron 1×10^4 células. Las células infectadas con suero normal de conejo se usaron como control.

d. Expresión del gen N del RSV.

- Extracción de RNA

Las células del cultivo persistente, los macrófagos no infectados y los macrófagos infectados en forma aguda a una $moi=1$ con RSVLab, se crecieron en placas de 6 pozos. Se añadió 1 ml de TRIZOL y se homogenizó pipeteando varias veces. Para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos, se incubó por 5 min a TA.

Posteriormente se añadieron 0.2 ml de cloroformo y la mezcla se agitó vigorosamente por 15 seg y se incubaron por 2-3 min a TA y se centrifugó a 12000 rpm 15 min a 4°C.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La fase acuosa se recuperó y se precipitó con isopropanol (con una fracción de volumen igual al obtenido en la fase acuosa), incubando por 10 min a TA y se centrifugaron a 12000 rpm 15 min a 4°C. El sobrenadante se removió y se lavó con etanol al 75%. Se dejó secar al aire y se disolvió en 50 µl de agua-dicitilpirocabonato (DEPC) libre de RNasas.

- RT-PCR para la amplificación del gen N del RSV.

Se amplificó un segmento de 278 pb, del gen N, el cual se reporta que está muy conservado entre las distintas cepas virales aisladas en la naturaleza.

Condiciones para la obtención del cDNA:

Se usaron 4 µl de amortiguador 5X (GIBCO-BRL), 2 µl de DTT (GIBCO-BRL), 2 µl de dNTP's (10mM) (GIBCO-BRL), 0.5 µl de inhibidor de RNasa (GIBCO-BRL), 4 µl del RNA y 7.5 µl agua DEPC. Se agregaron 50 µl de aceite mineral y se incubó a 80°C por 5 min, posteriormente se pasaron los tubos al hielo y se añadió 1 µl de oligo dT y se incubó a 60°C por 10 min y los tubos se pasaron al hielo por 5 min y se agregó 1 µl de la enzima transcriptasa reversa (GIBCO-BRL) y se incubó a 42 °C por 1 hr.

Para el ensayo de PCR se tomaron 5 µl de cDNA, se añadieron 8 µl de amortiguador de amplificación, 1 µl de DNA Taq polimerasa (GIBCO-BRL), 1 µl de oligo N1 (40 pmol), 1 µl de oligo N2 (40 pmol) y 84 µl de agua estéril. Se incubó por 2 min 30 seg a 99°C y se llevó a cabo la amplificación por 30 ciclos en las siguientes condiciones: 94°C 1 min, 65°C 1 min, 72 °C 2 min, se dejó un periodo de extensión a 72°C de 7 min y se pasaron a 4°C.

Los oligos N1 y N2, los cuales se diseñaron para amplificar la región 858-1135, dando lugar a un producto de 278 pb (122) y se sintetizaron en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM.

N1 5' GGA-ACA-AGT-TGA-GGT-TTA-TGA-ATA-TGC 3' Tm=75°C.

N2 3' CTT-CTG-CTG-TCA-AGT-CTA-GTA-CAC-TGT-AGT 5' Tm=74°C.

- Obtención de un cultivo homogéneo a partir del cultivo Møper0.

- Por dilución límite.

Con la finalidad de obtener un cultivo homogéneo se hicieron diluciones seriadas de algunos pases del cultivo Møper0 y así obtener cultivos a partir de una sola célula. Se

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

realizaron diluciones 1:10 en medio RPMI 1640-ME con 5% de SFB y se contó el número de células viables en cada dilución. Las diluciones que tenían menos de 10 células se subcultivaron, el cultivo que tenía al menos 5 células/ml fue el que se logró propagar y se determinó la presencia de virus extracelular por TCID₅₀/ml en células VERO. El cultivo obtenido de esta forma se denominó Møpper1.

- Resistencia a la superinfección.

La superinfección del cultivo Møpper1, se realizó a diferentes multiplicidades de infección. Las células se infectaron con una moi=1, 3, 5 y 10, se incubaron con medio RPMI 1640-ME suplementado con 2% de SFB durante 1 hr a 37 °C y después se retiró el inóculo. Se incubaron por 24, 48, 72 y 96 hrs en medio RPMI 1640-ME suplementado con 5% de SFB y se determinó la viabilidad celular, por exclusión de azul tripano. Las células que sobrevivieron a la infección fueron aquellas que se superinfectaron a moi=1, a este cultivo obtenido se le denominó Møpper2.

f. Presencia de Partículas Defectuosas (DI's).

- Ensayo de Interferencia a la infectividad viral.

La presencia de DI's se determinó por ensayo de inhibición de la infectividad viral de acuerdo al método descrito por Treuhft MW. et al 1982 (123). Las células VERO se crecieron en placas de 96 pozos (1 x 10⁵ células) y se infectaron con 100 µl de cada una de las diluciones de los sobrenadantes para titular, utilizando 4 pozos por dilución, se incubaron por 2 hrs a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Pasado este tiempo se retiró el medio y se lavó con PBS. Estas células se re infectaron con el virus de referencia (RSVLab) a una moi=0.3, se incubaron por 2 hrs, se retiró el inóculo, se añadió medio D-MEM para infectar y se incubaron por 72 hrs. Se retiró el sobrenadante y se adicionó solución balanceada de EARLE con rojo neutro al 0.03% y se incubaron durante 2 hrs (las células que sobreviven a la infección se tiñen con el colorante), posteriormente se lavaron 2 veces con PBS y se añadió una solución de etanol al 50% en NaH₂PO₄ 0.1M por 15 min y se determinó la densidad óptica a 540 nm.

Los sobrenadantes del cultivo persistente se purificaron por un gradiente lineal de sacarosa 20-60%, se determinó la densidad de cada fracción (0.5 ml) por refractometría, como se describió anteriormente y la concentración de proteínas y ácidos nucleicos por

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

espectrometría. Así mismo en cada banda se determinó la infectividad viral por TCID₅₀/ml y por focos de infección.

- Inhibición de la interferencia viral.

La presencia de DI's se confirmó por irradiación con luz UV y tratamiento con anticuerpo anti-RSV. La irradiación se hizo utilizando una lámpara 15 W (General Electric, G 1578) durante 10 min a 30 cm de distancia y posteriormente se realizó el ensayo de interferencia descrito anteriormente.

- Neutralización de la interferencia.

La interferencia con la infectividad se neutralizó con IgG policlonal anti-RSV (CHEMICON), diluciones seriadas (1:3) de los sobrenadantes del cultivo infectado persistentemente y de las bandas obtenidas en el gradiente, se incubaron por 2 hrs a 37°C con en anti-RSV a una dilución de 1:9 hecha en PBS +1% de ASB. 50 µl de la mezcla anterior se utilizaron para el ensayo de interferencia. Como control del anticuerpo remanente, se añadieron 50 µl de RSV moi=0.3 a 50 µl de la mezcla anterior, se incubó por 2 hrs a 37°C y la interferencia se determinó en la última dilución en la cual se observó inhibición de la interferencia.

Caracterización de las partículas virales obtenidas del cultivo infectado persistentemente.

a. Formación de sincitia.

- Co-cultivo de las células del cultivo Møper2 con diferentes líneas celulares.

Las monocapas de células VERO, H358, HEP-2 y A549 semiconfluentes crecidas en placa de 6 pozos se co-cultivaron con diluciones seriadas 1:3, de macrófagos persistentemente infectados. Para eliminar el virus extracelular, los macrófagos se lavaron previamente al menos 20 veces con el medio utilizado para las diluciones (RPMI 1640-ME con 1% de SFB). Se incubaron una hora a 37°C, se retiró el inóculo y posteriormente se añadió medio RPMI con 2% de suero fetal y de 2% de agar. Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ hasta la observación de efecto citopático (3-6 días).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Efecto sobre la formación de sincitia del tratamiento con tripsina de sobrenadantes del cultivo de Møpper2.

El sobrenadante del cultivo Møpper2, se incubó con 1.25 µg/ml de tripsina por media hora a 37°C. Monocapas semiconfluentes de células VERO se infectaron con el sobrenadante previamente tratado con tripsina y se incubaron por dos horas a 37°C y 5% de CO₂, posteriormente se retiró el sobrenadante y se añadió medio RPMI 1640-ME con tripsina (1.25 µg/ml tripsina, sin SFB) y se incubó hasta la observación de efecto citopático. Las células se fijaron con metanol por 5 min y acetona 30 seg, se lavaron con PBS y se añadió cristal violeta (0.1% en etanol al 20%), para la observación del número y tamaño de los sincitia. Paralelamente se hicieron los siguientes controles: a) células VERO infectadas con el sobrenadante del cultivo Møpper2 sin tratamiento con tripsina, b) células VERO sin infectar incubadas en medio con y sin tripsina y c) células VERO infectadas con el RSVLab en presencia y ausencia de tripsina.

También se utilizaron como control células H358 infectadas en las mismas condiciones descritas anteriormente.

- Infectividad por focos de infección.

Se determinó la infectividad de los sobrenadantes del cultivo Møpper2 de acuerdo al método descrito anteriormente, añadiendo únicamente el tratamiento con tripsina.

- Efecto de la concentración de tripsina en la expresión de la proteína F en la membrana de células VERO infectadas con el sobrenadante del cultivo Møpper2.

Monocapas de células VERO se infectaron con sobrenadante de cultivo Møpper2 tratado con tripsina a diferentes concentraciones (0.5, 1.25, 5 y 10 µg/ml) y sin tripsina. Cuando el efecto citopático fue evidente, las células se fijaron con paraformaldehído 2% ó con metanol 5 min-acetona 30 seg. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS y se bloqueó con glicina 1M 1 hr a TA, se lavó 3 veces con PBS y se incubó 1 hr a TA con el anticuerpo anti-F (CHEMICON) diluido 1:500. A continuación se lavó 3 veces con PBS y se añadió el anticuerpo conjugado anti-IgG-FITC (AMERSHAM) de ratón diluido 1:10 y se incubó 1 hr a TA.

Paralelamente se infectaron células VERO con el RSVLab a moi=1 (como control positivo) y como control negativo se usaron células VERO no infectas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

b. Análisis genómico de la proteína F.

• RT-PCR para la amplificación del gen F.

A 3 µl de RNA total (obtenido de acuerdo al método descrito anteriormente) se añadió 1 µl del Oligo 2 (1 ng/µl) y 1 µl de agua-DEPC y 0.5 µl de inhibidor de RNasa (GIBCO-BRL), se hirvieron 3 min y se colocaron en hielo.

Se añadieron 15 µl de la siguiente mezcla: 4 µl de amortiguador 5X (GIBCO-BRL), 2 µl dNTP's 5mM (GIBCO-BRL), 2 µl DTT 0.1 M (GIBCO-BRL), 0.3 µl de transcriptasa inversa superscript II (GIBCO-BRL), 6.7 µl H₂O y se incubaron por 1 hr a 42°C.

Se tomaron 0.2 ó 1 µl de cDNA y se añadió 1 µl del Oligo 1 (25 ng/µl) y 1 µl del Oligo 2 (25 ng/µl) y 1 ó 1.8 µl de H₂O.

Se añadieron 21 µl de la siguiente mezcla: 1 µl de dNTP's 5mM, 2.5 µl amortiguador 10X, 0.3 µl de DNA polimerasa platinum (GIBCO BRL) y 18.2 µl de H₂O estéril.

Se mezcló por agitación y se centrifugó en eppendorff a 13,000 rpm por 30 seg y se pasaron los tubos al termociclador (Perkin Elmer DNA Thermal Cycler).

Para la amplificación completa del gen F se utilizaron los siguientes oligos (sintetizados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM):

Oligo	Posición del Oligo	Secuencia	T _m °C
F1	22	5'GCC-AAT-CCT-CAA-AGC3'	46
F2	883	5'GGA-CAT-GAT-AGA-GTA3'	42
F3	862	5'GCA-AAG-TTA-CTC-TAT-C3'	44
F4	1853	5'GTG-TAA-GTG-AGA-TGG3'	44
FC1	305	5'CAA-AGC-ACA-CCA-GCA-GC3'	54
FI	1	5'CGG-GAT-CCC-GGG-GGC-AAA-TAA-CAA-TGG3' sitio BamHI	86
FI1	1861	5'GGG-GTA-CCC-CCT-ACT-TAA-ATA-GTG-TAA-G3' sitio HpnI	82

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Condiciones de PCR

94°C 3 min un ciclo

94°C 30 seg; T°C **especifica para cada par de oligos; 72°C 2 min 30 seg; 32 ciclos

72°C 7 min un ciclo

Oligos utilizados	T°C **
F1, F4	42°C 30 seg
F1, F2	42°C 30 seg
F3, F4	44°C 30 seg
F1, F11	44°C 30 seg
FC1, F4	42°C 30 seg
FC1, F2	42°C 30 seg

- Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR se purificaron en un gel de agarosa al 1% (agarosa de bajo punto de fusión, preparado con TAE y con bromuro de etidio, ver apéndice). El corrimiento (60-80 volts) se detuvo una vez que el colorante (Orange G, SIGMA) se salió del gel. Sobre el transiluminador se cortó la banda de interés eliminando posibles contaminantes, se recuperó la banda en un tubo eppendorff y se añadieron 150 µl de TE y 3 µl de MgCl₂ (1M) y se incubó por 10-15 min a 75°C (con agitación hasta la fusión completa de la agarosa). Posteriormente se añadió 1 ml de la resina (tierra de diatomeas) y se agitó en el vortex 1 min, se transfirió este volumen a una jeringa de 3 ml estéril conectada a una columna wizard a través de la cual se pasó el líquido lentamente. Después se procedió a lavar la columna con 3 ml de isopropanol (80%) y se centrifugó en un tubo eppendorff 1 min a 13,000 rpm. Se incubaron las columnas de 5-10 min a TA, para permitir que se secan y se agregaron 50 µl de agua estéril. Se incubaron 2 min a TA, pasado este tiempo las columnas se transfirieron a un tubo eppendorff limpio y se centrifugaron por 1 min a 13,000 rpm. Se recuperaron entre 35 y 40 µl de DNA, la pureza de los productos se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se cuantificó utilizando los marcadores de PM como referencia (λ /Hind III y ϕ X174/Hae III GIBCO-BRL).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Obtención de la secuencia de nucleótidos de la proteína F.

Una vez que los productos de PCR se purificaron y cuantificaron, se tomaron 250 ng de c/u de ellos 5 pmol/ del oligo de interés, en un volumen de 16 µl de agua estéril y se enviaron a la unidad de secuencia del Instituto de Biotecnología UNAM.

Para la obtención de la secuencia completa del gen F se usaron los siguientes oligos: F1, F2, F3, F4, FC1, FI y FII (descritos anteriormente) y RSVA, RSVB, RSV C, RSV D, RSV E, RSV F, RSV1179 y RSV574 (que se describen a continuación).

Oligo	Posición del Oligo	Secuencia	Tm°C
RSV(A)	645	5'CGT-GCA-GAA-TAT-CAA-ATA-TAG3'	56
RSV(B)	905	5'GGT-AAT-TGT-ACT-ACA-TAT-GC3'	54
RSV(C)	113	5'GCA-CTG-CAT-GTT-GAT-TG3'	50
RSV(D)	1568	5'GGT-AAA-TCA-ACC-ACA-AAT-ATC3'	56
RSV(E)	1069	5'CCC-ACA-AGC-TGA-AAC-ATG3'	54
RSV(F)	1544	5'GCA-TTT-ACA-TGA-TGT-AAAT-AAAT-TC3'	58
RSV1179	1179	5'CCA-AAAT-ATG-ATT-GTA-AAA-TTA-TG3'	56
RSV574	574	5'CTT-AAC-CAG-CAA-AGT-G3'	46

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. RESULTADOS.

1. Establecimiento, confirmación y caracterización del cultivo persistentemente infectado.

- Establecimiento de la infección persistente.

Se estableció un cultivo persistentemente infectado a partir de células P388D1 (M ϕ) que sobrevivieron a la infección por el RSVLab a una moi=1. Las células que sobrevivieron se propagaron y a este cultivo se le denominó cultivo M ϕ per0. Durante los pases del cultivo no se observó un cambio significativo en la tasa de crecimiento entre las células infectadas persistentemente y los macrófagos no infectados (se subcultivaron aproximadamente cada 48 hrs), tampoco se observó lisis celular, sin embargo, fue posible en algunos casos y en forma transitoria observar la formación del sincitio característico del RSV (Fig. 1). El cultivo infectado persistentemente se ha propagado durante más de 4 años.

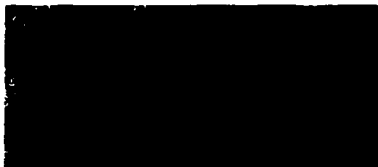


Figura 1. Sincitio característico de la infección por el RSV en el pase 10 del cultivo persistente (M ϕ per0).

- Morfología.

Un parámetro utilizado para determinar cambios en la célula por la persistencia del virus fue el análisis de la morfología. Las mediciones de las células del cultivo M ϕ per0 (se contaron 317 células), área (\bar{x} =232.31 μ^2) y perímetro (\bar{x} =74.24 μ), se compararon con los macrófagos no infectados (M ϕ) (se contaron 205 células área), área (\bar{x} =200.22 μ^2) y perímetro (\bar{x} =70.59 μ). El análisis mostró una diferencia significativa en el área ($P < 0.05$) y no así en el perímetro ($P < 0.1401$) (Fig.2).

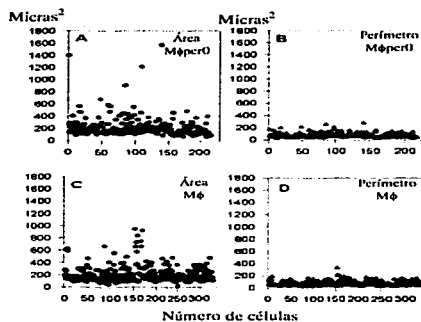


Figura. 2. Análisis morfológico del área y perímetro de las células del cultivo Møper0 y de los macrófagos no infectados. Panel A y B pase 10 del cultivo Møper0. A) área y B) perímetro. Panel C y D Mø, área y perímetro respectivamente.

- Producción de virus extracelular e intracelular.

La presencia del virus en cada pase del cultivo persistentemente infectado se confirmó por: titulación del virus infeccioso en los sobrenadantes del Møper0 por $TCID_{50}/ml$ en células VERO.

Los títulos de virus extracelular (producido en 72 hrs) en los primeros pases del cultivo estuvieron en el rango de 1.1×10^3 - 2×10^5 $TCID_{50}/ml$. El título del pase 8 fue similar a los títulos obtenidos en una infección aguda en macrófagos (1×10^5 - 1×10^6 $TCID_{50}/ml$), lo que sugiere que puede ser el resultado de virus que se produjo en infecciones agudas y/o a la suma del producido más el remanente del virus original. La figura 3 muestra la producción de virus extracelular en cada pase del cultivo. A partir del pase 9 y hasta el pase 26 se encontraron títulos entre 1×10^2 y 6×10^3 $TCID_{50}/ml$, posteriormente no se pudo detectar virus en los sobrenadantes del cultivo persistente por esta técnica (Fig. 3A).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

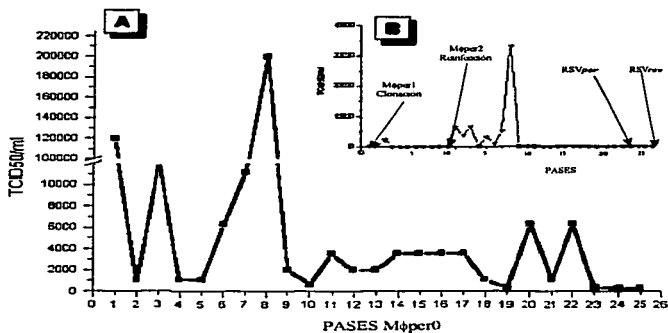


Figura 3. Virus extracelular infeccioso obtenido de los sobrenadantes del cultivo persistentemente infectado. El virus extracelular se determinó por TCID₅₀/ml. A) Cultivo obtenido a partir de las células que sobrevivieron a la infección con el RSV a moi=1 (Møper0), B) Cultivo obtenido por dilución límite del pase 26 del cultivo Møper0 (Møper1) y una sublínea obtenida después de la superinfección del Møper1 con el RSVLab a moi=1 (Møper2).

- Porcentaje de células infectadas en el cultivo infectado persistentemente.

La presencia del antígeno viral en las células del cultivo infectado persistentemente se determinó y cuantificó por inmunofluorescencia indirecta y por citometría de flujo.

Inmunofluorescencia indirecta.

Los resultados obtenidos por inmunofluorescencia mostraron que el porcentaje de células positivas fluctuó entre 40-60% en los pases P1 al P26 del cultivo Møper0 (Fig. 4).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

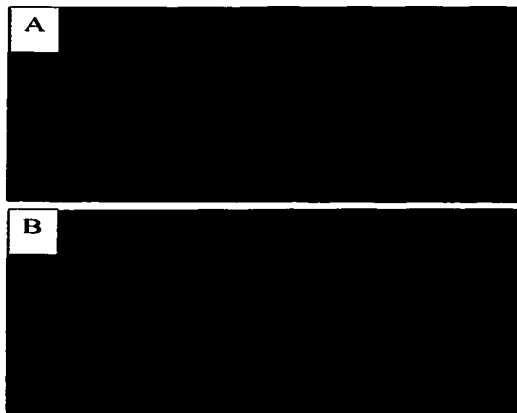


Figura 4. Inmunofluorescencia indirecta. A) Mφper0 y B) Mφ sin infectar.

Ensayo de citometría de flujo.

Con la finalidad de obtener un valor más preciso del porcentaje de células infectadas, se decidió utilizar ensayo un método más sensible y confiable para la detección de antígenos virales (ensayo de FACS), así como para la cuantificación del porcentaje de células positivas.

Los ensayos de FACS se hicieron en diferentes pases del cultivo infectado persistentemente. La figura 5 muestra los resultados obtenidos por ensayo de FACS en el pase 24 Mφper0 (Fig. 5B), en donde los porcentajes de positividad fluctuaron entre el 40-50%. La infección aguda de macrófagos mostró un pico de células positivas bien definido, en el rango de intensidad de 10^2 a 10^3 (Fig. 5A). Por el contrario en los perfiles obtenidos en los diferentes pases del cultivo de Mφper0, se observa superposición de las curvas positivas con las negativas, lo que probablemente representa poblaciones con diferente grado de expresión de antígeno. El porcentaje de células que expresan antígeno

por este método es similar al valor obtenido por inmunofluorescencia indirecta (Fig. 4), lo que valida nuestros resultados.

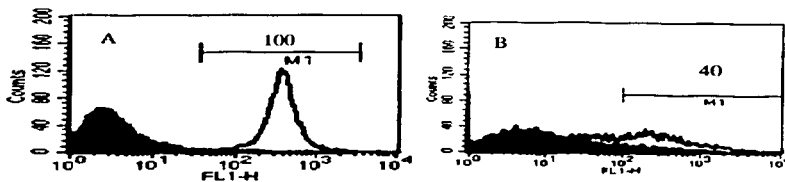


Figura 5. Perfiles de fluorescencia de macrófagos infectados en forma aguda y en forma persistente con el RSV. El porcentaje de células que presentan antígeno está señalado en números sobre las barras. A) M ϕ infectados en forma aguda; B) M ϕ per ϕ , pase 24.

- Expresión del gen N del RSV.

Con la finalidad de confirmar la expresión del genoma viral se hizo RT-PCR para determinar la expresión del gene N (nucleocápside) en el cultivo M ϕ per ϕ .

Los resultados obtenidos por RT-PCR mostraron una banda de 278 bp, correspondiente al segmento amplificado del gen N. La banda se observó en todos los pases analizados, los resultados se muestran en la figura 8. (Líneas 3 y 4).

- Obtención de un cultivo homogéneo.

Por dilución límite.

Con la finalidad de tener un cultivo con un mayor porcentaje de células infectadas, se realizó una clonación por dilución a partir del pase 26 del cultivo M ϕ per ϕ , sin embargo, no fue posible obtener un cultivo a partir de una sola célula, solo a partir de 5 células se pudieron recuperar algunos subcultivos. Se obtuvieron 12 subcultivos en los que se determinó el virus extracelular, porcentaje de células que expresaron antígeno y la expresión del gen N por RT-PCR. En los 12 subcultivos se detectó la presencia de virus

extracelular y la expresión del gen N, sin embargo, el séptimo presentó una mayor cantidad de células que expresaron antígeno determinado por FAC'S, alrededor del 60% (Fig. 6B) y en los perfiles obtenidos no se observó un solo pico, lo que sugiere heterogeneidad en la concentración del antígeno presentado por la población celular. Con base en los resultados anteriores se continuó trabajando el subcultivo 7, el cual dio lugar al cultivo Møper1.

La persistencia viral se confirmó en el cultivo Møper1 por: virus extracelular por TCID₅₀/ml en células VERO encontrándose títulos que fluctuaron entre 1×10^2 y 2×10^3 (Fig. 3B). Sin embargo, después de los primeros pases no se detectó virus extracelular por TCID₅₀/ml, al sonicar las células se obtuvieron virus con títulos de 1×10^2 TCID₅₀/ml. Probablemente por sonicación se liberó virus intracelular o virus que permanecía adherido a la membrana, ya que se ha reportado que durante la propagación del RSV en líneas celulares una parte de la progenie viral permanece asociada a la célula (124, 125).

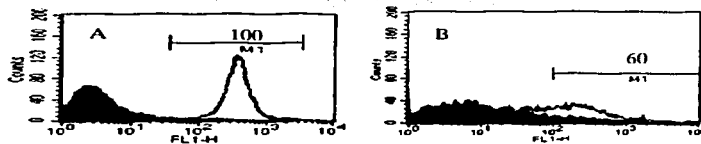


Figura 6. Perfiles de fluorescencia de macrófagos infectados en forma aguda y en forma persistente con el RSV. El porcentaje de células que presentan antígeno está señalado en números sobre las barras. A) Mø infectados en forma aguda; B) Células del cultivo Møper1, pase 4.

La presencia del genoma viral en las células del cultivo Møper1, se confirmó por la expresión del gen N por RT-PCR, en todos los pases analizados se encontró N, la figura 8 (líneas 5 y 6) muestra dos pases representativos.

Por superinfección.

Una característica frecuente de algunos cultivos infectados persistentemente es que son resistentes a la superinfección con el virus utilizado inicialmente para el establecimiento de la infección persistente (virus homólogo) y que la superinfección

incrementa el porcentaje de células infectadas en un cultivo persistente (126); por esta razón se decidió reinfectar el pase 10 del cultivo Møper1 con RSVLab a diferentes moi 1, 5 y 10.

Los cultivos infectados a $moi=5$ y 10 no resistieron la reinfección. Sin embargo, los reinfectados a $moi=1$ sobrevivieron y se subcultivaron dando lugar al cultivo Møper2. En los primeros pases de la superinfección se detectaron títulos de virus extracelular por TCID₅₀/ml, que fluctuaron entre 1×10^2 y 6×10^3 (Fig. 3B), probablemente estos títulos se deban al remanente del virus utilizado durante la superinfección y/o infecciones agudas de las células que no estaban infectadas. Sin embargo, a partir del pase 11, no se detectó virus extracelular ni intracelular, determinado por TCID₅₀/ml en células VERO.

La persistencia del RSV en este cultivo se confirmó con base en las técnicas utilizadas anteriormente: titulación de virus extracelular por TCID₅₀/ml (Fig. 3B), por ensayo de FACS se encontró un porcentaje de células que expresan antígeno que fluctuó entre un 92 y 96% (Fig. 7, B, C y D).

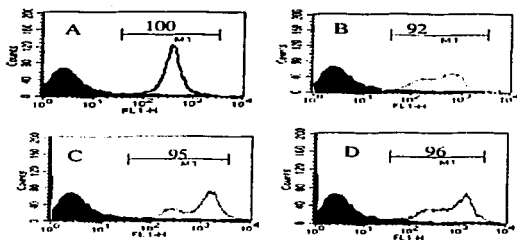


Figura 7. Perfiles de fluorescencia de Mø infectados en forma aguda y células del cultivo Møper2. El porcentaje de células que presentan antígeno está señalado en números sobre las barras. A) Mø infectados en forma aguda; B) Møper2, pase 18, C) Møper2, pase 12 y D) Møper2, pase 24.

Los resultados obtenidos por RT-PCR mostraron una banda de 278 bp (Fig. 8, Líneas 7 y 8), correspondiente al segmento amplificado del gen N. La banda se observó en todos los pases analizados del cultivo Møper2.



Figura 8. Productos de la amplificación del gen N del RSV. 1) DNA marcadores, 2) Mø infectados en forma aguda con el RSV, 3 y 4) Møper0, 5 y 6) Møper1, 7 y 8) Møper2 y 9) Mø sin infectar.

- Presencia de partículas defectuosas.

Una primera aproximación para caracterizar las partículas virales en el cultivo persistente fue definir si en los sobrenadantes obtenidos de dichos cultivos se encontraban mutantes o variantes virales (partículas defectuosas).

El stock de RSVLab utilizado para obtener el cultivo mostró una sola banda en el gradiente de sacarosa con una densidad de 1.18 g/ml (Fig. 10B) que es el valor reportado para el virión del RSV (119). En esa banda se observaron los valores más altos, respecto al resto de las fracciones recoletadas en el gradiente, de proteína y ácido nucleico (medidos espectrofotométricamente) y no presentó interferencia a la infectividad viral (Fig. 9, línea 11), lo que sugiere la ausencia de partículas defectuosas o bien su presencia en bajas concentraciones.

En el cultivo Møper0 la presencia de partículas interferentes se observó, a partir del pase 11 y en todos los pases siguientes tanto de Møper0, así como Møper1 y Møper2 (Fig. 9, líneas 1, 4 y 7 respectivamente). En los pases 11 al 15 del cultivo Møper0 se observó un alto porcentaje de interferencia (80-90), posteriormente los valores de interferencia fluctuaron entre 40-60% en los pases siguientes del cultivo Møper0 (16-26), 1 al 6 del cultivo Møper1 y 1 al 27 del cultivo Møper2 (Fig. 9, muestra un pase representativo de cada cultivo, líneas 1, 4 y 7). Como ya se mencionó anteriormente durante la propagación del virus en cultivo, una parte permanece asociado a la célula, por

lo que se decidió confirmar sonicando células del cultivo Møpper2 (Fig. 9, línea 10) y células infectadas en forma aguda (Fig. 9 línea 12), la presencia de partículas interferentes intracelulares.

La confirmación de la presencia de partículas defectuosas en los sobrenadantes de varios pases de Møpper (Møpper0, Møpper1 y Møpper2), se realizó por inactivación de la infectividad del virus por irradiación con UV (Fig. 9, líneas 2, 5 y 8) y por tratamiento con anticuerpos anti-RSV (Fig. 9, líneas 3, 6 y 9). Con ambos tratamientos se inhibió la interferencia a la infectividad viral

% Interferencia

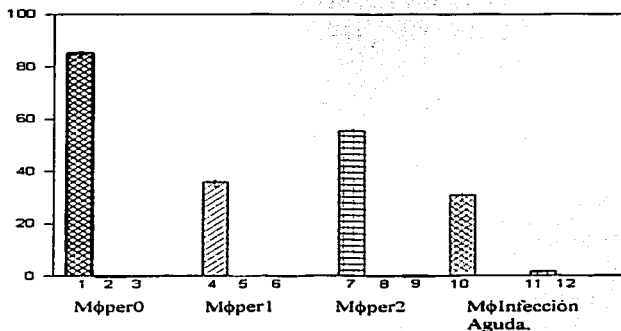


Figura 9. Porcentaje de interferencia con la infectividad viral. 1, 4 y 7 sobrenadantes de los cultivos infectados persistentemente (Møpper0, Møpper1 y Møpper2 respectivamente); 2, 5 y 8 sobrenadantes tratados con luz U.V.; 3, 6 y 9 sobrenadantes tratados con anti-RSV; 11 sobrenadante de infección aguda; 10 y 12 células sonicadas de los cultivos Møpper2 y de infección aguda.

Los sobrenadantes del cultivo Møpper2 se analizaron por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. En la figura 10 A se observan 5 picos con densidades de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

flotación de 1.019, 1.09, 1.13, 1.18 y 1.268 g/ml, mientras que el pico observado en el panel B, corresponde al RSVLab. En las bandas obtenidas en ambos gradientes se analizó la infectividad por TCID₅₀/ml y por focos de infección y la presencia de partículas interferentes.

Por focos de infección se detectó antígeno viral en las células VERO infectadas con las bandas 1.13, 1.18 y 1.268 g/ml sugiriendo la presencia de virus infectivo. En el ensayo de interferencia con la infectividad viral solo las bandas 1.019 y 1.13 mostraron interferencia del 41.47% y 40% respectivamente.

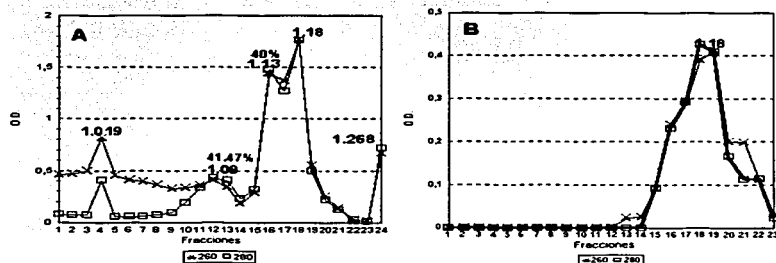


Figura 10. Gradiente de sacarosa. Las densidades ópticas y de flotación se determinaron en cada fracción del gradiente, los números se refieren a las densidades de flotación de las bandas obtenidas en el gradiente. A) sobrenadantes del cultivo Møpper2 y B) del stock del RSVLab.

2. Caracterización de las partículas virales obtenidas del cultivo Møpper2.

- Formación de Sincitia.

Las células VERO se utilizan preferentemente para la propagación y titulación del RSVLab, en estas células el virus obtenido del pase 12 del cultivo Møpper2 (en adelante me referiré a este como virus RSV_{per}) mostró una reducción considerable en la eficiencia de formación de sincitio. Sin embargo, en células H358 se observó sincitio con una eficiencia comparable con la del RSVLab. Una posible explicación a estos resultados

podría ser que la infectividad del virus *RSV_{per}* fuera menor que la del *RSV_{Lab}*, o bien que la concentración de partículas infectivas en este sobrenadante fuera muy baja.

Con base en los resultados anteriores se decidió evaluar la infectividad del *RSV_{per}* mediante: 1) cuantificación del virus extracelular infeccioso por unidades formadoras de focos y 2) por co-cultivo de células *M_{per}2* con diferentes líneas celulares; buscando la presencia dentro de la célula de virus con capacidad de formar sincitia.

Infectividad del *RSV_{per}*.

Se evaluó la infectividad del virus *RSV_{per}*, por focos de infección en las líneas celulares VERO y H358 y comparándola con la infectividad el *RSV_{Lab}*. La determinación de los focos de infección se realizó por inmunofluorescencia directa, paralelamente se realizaron los controles negativos, células VERO y H358 sin infectar, en estos controles no se observó fluorescencia. Los resultados de la infectividad del *RSV_{per}* expresada en # de focos/ml, obtenidos en las células VERO y H358 se muestran en la tabla 1.

	VERO #focos/ml	H358 #focos/ml
<i>RSV_{Lab}</i> .	1.6×10^4	1.9×10^4
<i>RSV_{per}</i>	1.1×10^3	1.4×10^3

Tabla 1. Focos de infección en células VERO y en H358.

Los resultados demuestran que el *RSV_{per}* es infeccioso aún cuando no se observaron sincitia ni se detectó virus extracelular por titulación con la técnica de $TCID_{50}/ml$ en células VERO.

Formación de sincitio (co-cultivo).

Los datos anteriores demuestran la presencia en el cultivo persistente de una variante viral (*RSV_{per}*) que infecta células VERO, sin embargo su eficiencia para formar sincitia está disminuida respecto a la del *RSV_{Lab}*. Para investigar los cambios en la variante, en primer termino se realizó un ensayo de co-cultivo (Tabla 2).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los resultados del co-cultivo se muestran en las figuras 11 y 12, células del cultivo Møper2 co-cultivadas con células VERO no formaron sincitia (Fig.11), pero si lo formaron co-cultivadas con células H358 (Fig.12). Mø no infectados se usaron como control negativo. Células VERO y H358 infectadas con el RSVLab se usaron como control positivo, en ambos casos se observaron sincitia.

Los resultados anteriores confirman que el virus obtenido de Møper2 presenta un cambio fenotípico, una variante cuya eficiencia para formar sincitia en células VERO, está disminuída.

	Sincitia
Células del cultivo Møper2 con:	
Células VERO	-
Células H358	+
Mø	-
Mø con:	
Células VERO	-
Células H358	-
Células VERO infectadas con RSVLab	+
Células H358 infectadas con RSVLab	+

Tabla 2. Co-cultivos de células del cultivo Møper2 con células VERO, H358y Mø.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

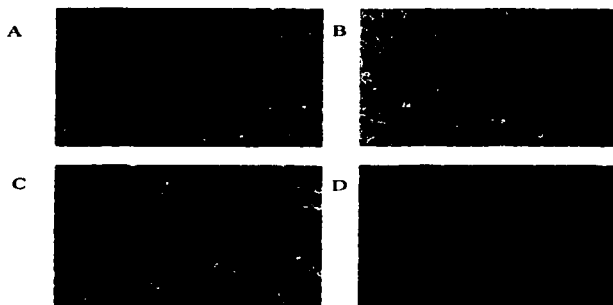


Figura 11. Co-cultivo de Møper2 (pase 12) con células VERO. A) Células VERO, B) Células VERO infectadas con RSVLab. C) Células VERO con células del cultivo Møper2 y D) células VERO con Mø.

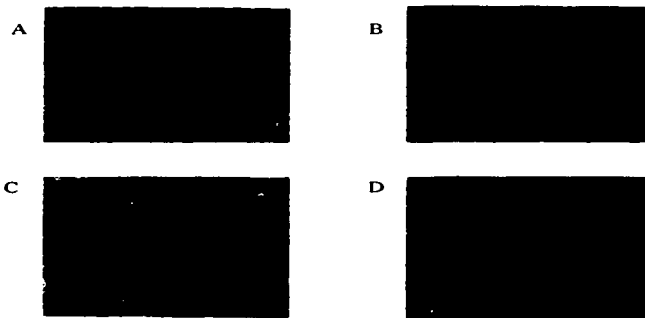


Figura 12. Co-cultivo de Møper2 (pase 12) con células H358. A) Células H358, B) Células H358 infectadas con RSVLab, C) Células H358 con células del cultivo Møper2 y D) células H358 con Mø.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Efecto de la tripsina.

Ensayos preliminares mostraron que se obtenía el sincitio característico del RSV en las células VERO infectadas con RSV_{per} tratado con tripsina. Por lo anterior decidimos analizar el efecto de la tripsina en la infectividad y formación de sincitio, del virus RSV_{per} en células VERO así como en células H358.

Infectividad del RSV_{per} tratado con tripsina

La infectividad del RSV_{per} se analizó por cuantificación del número de focos/ml y se comparó con la infectividad del virus RSV_{Lab}, en ausencia y presencia de tripsina.

Cuando el RSV_{Lab} se trató con tripsina, no se observó diferencia en la infectividad, ya que el número de focos obtenidos en células VERO y H358, fue similar cuando se infectó con virus tratado con tripsina y sin tratar.

Sin embargo, cuando el RSV_{per} se trató con tripsina, en células VERO se observó un incremento en 136% en el número de focos/ml, mientras que en las células H358 el incremento solo fue del 7% (Fig. 13).

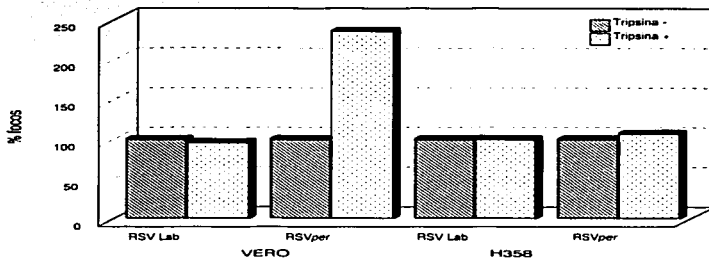


Figura 13. Efecto de la tripsina sobre la infectividad del virus RSV_{Lab} y RSV_{per} en células VERO y H358.

Formación de sincitia (tamaño y número).

Para evaluar el efecto de la tripsina sobre el virus *RSVper*, se determinó el número de sincitia y número de núcleos por sincitio, en células VERO y en H358 infectadas en ausencia y presencia de tripsina (Fig. 14), y se comparó con células infectadas con *RSVLab*.

El tratamiento con tripsina del *RSVper* incrementó el número de sincitia y tamaño del sincitio (más de 40 núcleos), en las células VERO. Resultados similares se obtuvieron en presencia y ausencia de tripsina con el virus *RSVLab* a 48 hrs pi. Sin embargo, en las células H358 durante la infección con el *RSVper* tratado con tripsina se observó un incremento en el número de sincitia, no así en el número de núcleos por sincitio, respecto al *RSVLab*. Estos resultados muestran un efecto claro de la tripsina en la formación de sincitia, lo que sugiere que puedan existir mutaciones en el genoma que reduzcan la eficiencia de corte a la acción de la furina presente en las células VERO.

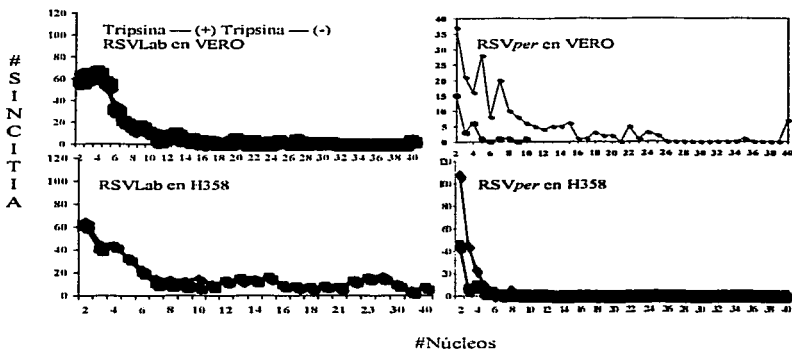


Figura 14. Efecto de la tripsina en la formación y tamaño de sincitia en células VERO y H358 infectadas con el *RSVLab* y el *RSVper*.

- Expresión de la proteína F en células infectadas con el virus *RSVper*.

En la formación del sincitio por el RSV es necesaria la presencia de la proteína F procesada (F1-F2) en la membrana de las células infectadas. Por esta razón se decidió determinar por inmunofluorescencia indirecta, la presencia de la proteína F en células VERO infectadas con *RSVper* con y sin tripsina. Nuestros resultados mostraron la presencia de la proteína F en la membrana de las células VERO y un incremento en la intensidad de la fluorescencia en función de la concentración de tripsina (Tabla 3).

Inmunofluorescencia Indirecta					
Tripsina (μ g)					
	0	0.5	1.2	5*	10**
RSVLab en VERO (intracelular)	+++	+++	+++	+++	+++
RSVLab en VERO (en la membrana)	+++	+++	+++	+++	+++
Células VERO infectadas con <i>RSVper</i> (intracelular)	+++	+++	+++	+++	+++
Células VERO infectadas con <i>RSVper</i> (en la membrana)	+	+	+++	+++	+++

Tabla 3. Células VERO se infectaron con RSVLab y con el *RSVper* tratado con tripsina a diferentes concentraciones (0.5, 1.25, 5 y 10 μ g/ml) y sin tripsina. La intensidad de la fluorescencia se expresa por cruces.

- Obtención de una revertante.

A partir del pase 27 del cultivo Møper2, se obtuvo en forma espontánea una revertante fenotípica (*RSVrev*), es decir un virus capaz de formar sincitio en células VERO. El comportamiento de este virus en la formación de sincitio e infectividad en presencia y ausencia de tripsina fue similar a lo reportado para el virus RSVLab.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Análisis genómico de la proteína F del virus RSVLab, RSV_{per} y RSV_{rev}.

Los resultados anteriores sugieren cambios genómicos probablemente responsables del fenotipo observado. Por lo tanto se propuso el análisis de la secuencia de F. Se amplificó el genoma completo del gen F (1846pb) por RT-PCR y se secuenciaron los productos obtenidos.

Las secuencias obtenidas para RSVLab, RSV_{per} y del RSV_{rev} se compararon con la reportada para la cepa Long (NCBI Sequence viewer M22643 GI 333938)

Los resultados del análisis genómico (Fig. 15) de F mostraron que el RSV_{per} presenta mutaciones respecto al virus original (RSVLab), RSV_{rev} y respecto a la secuencia reportada para la cepa Long.

Los cambios en Lis123Asn, Lis209Glu, Ile292Cis, Lis293Tre, Glu294Val, Fen351Tyr, Ile381Leu y Ser560Cys encontrados en la secuencia del RSV_{per}, no se encontraron en RSVLab y RSV_{rev}, lo que sugiere que algunos de estos cambios pudieran estar relacionados con el fenotipo observado en RSV_{per}. También reportamos otros cambios en que se encuentran en los tres virus que probablemente no estén involucrados con el fenotipo de la mutante.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VI. DISCUSIÓN.

1. Establecimiento y caracterización del cultivo persistente.

El cultivo infectado persistentemente que se obtuvo en el laboratorio presentó características similares a las reportadas en otros cultivo infectados persistentemente con el RSV. No se observó muerte celular durante los pases, es decir no se observaron periodos de crisis, y la tasa de crecimiento entre las células del cultivo persistente respecto a las células no infectadas no difirió significativamente.

La presencia y expresión del genoma viral en los diferentes cultivos (Møper0, Møper1 y Møper2) se demostró por diferentes técnicas: presencia de antígeno viral por inmunofluorescencia y por FACS; producción de virus infectivo y de partículas defectuosas y expresión del gene N.

El cultivo Møper2 que se obtuvo después de la superinfección, mostró un alto porcentaje de células que expresaron antígeno, probablemente el incremento en la cantidad de células positivas fue el resultado de la infección de los Mø no infectados presentes en el cultivo, los cuales se infectaron en forma aguda y es posible que algunas células murieran. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que algunos de estos Mø, se infectaran persistentemente.

El establecimiento y mantenimiento de una infección persistente por un virus de RNA, puede ocurrir por varios mecanismos, entre ellos generación de mutantes o variantes virales (partículas defectuosas). La participación de las partículas defectuosas en el establecimiento del cultivo persistente que reportamos en este trabajo es discutible, debido a que en el stock viral que se usó para el establecimiento de la infección persistente no se detectaron partículas defectuosas, por los métodos antes descritos (ensayo de interferencia a la infectividad viral y por gradiente de sacarosa). Sin embargo, nuestros resultados sugieren la participación de estas partículas en el mantenimiento de la infección persistente, puesto que se detectaron en los diferentes cultivos (Møper0, Møper1 y Møper2) obtenidos y se mantuvieron presentes y en cantidad constante durante todos los pases. Nuestros resultados coinciden con lo descrito por Holland J.J. et al 1976 (127), en donde reportan en la infección persistente por el VSV en células BHK21, la presencia constante de partículas defectuosas aún cuando hay una baja producción de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

virus extracelular y que todas las células del cultivo o casi todas producen grandes cantidades de antígeno viral sugiriendo las DI's son capaces de replicarse. Estos autores proponen que la presencia de las DI's es necesaria para mantener un estado no citocida y así modular la virulencia en las células BHK21 que son altamente susceptibles a la infección (127).

Infecciones persistentes con diversos virus de RNA se han obtenido en diferentes líneas celulares, en algunos de ellos se han utilizado factores externos como: infección en presencia de anticuerpo anti-viral, infección simultánea con partículas defectuosas (128), con mutantes temperatura sensibles (33, 129) o usando células resistentes a la infección (36). Sin embargo es posible establecer persistencia viral sin la presencia de factores externos (31, 35). En este trabajo reportamos el establecimiento de una infección persistente con el RSV, sin la presencia de factores externos.

Los macrófagos alveolares son la primera línea de defensa contra patógenos inhalados y están expuestos al RSV en el transcurso de la infección. Se ha reportado que los macrófagos alveolares y periféricos son susceptibles a la infección por el RSV *in vitro* (48) y producen virus infeccioso por más de 25 días. En estudios *in vivo*, en cobayos inoculados con el RSV por vía intra-nasal se demostró que las proteínas virales y el RNA genómico pueden persistir en el pulmón hasta más de 60 días post-infección, la presencia del virus en los macrófagos alveolares se asoció con la patogénesis de una inflamación crónica bronquial (54, 55, 56). La infección del RSV en los macrófagos tiene importantes efectos tales como: incremento en la producción de mediadores con actividad inmunoregulatoria (24, 39, 45, 52, 54) y una disminución en la capacidad fagocítica del macrófago. Recientemente se ha documentado el efecto de la persistencia sobre las funciones biológicas del cultivo Møpper2, expresión de genes celulares (IL 1, IL-6, TNF α) y sobre sus funciones (fagocitosis) (130).

Otra característica importante de nuestro cultivo persistente es el rápido establecimiento y reproducibilidad del mismo, que probablemente se deba a la generación durante los primeros pases de una variante viral no citolítica, que se haya seleccionado durante los diferentes cultivos Møpper0, Møpper1 y Møpper2.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Caracterización de los cambios fenotípicos y genotípicos de los virus obtenidos del cultivo Møpper2.

Durante el cultivo Møpper2, se generó una variante viral que mostró una menor eficiencia en la producción de sincitio (RSV_{per}), respecto a la cepa Long en células VERO. También se obtuvo una revertante espontánea (RSV_{rev}), cuya eficiencia en la formación de sincitios fue similar a la del RSVLab.

- **Análisis de infectividad.**

Una posible explicación al fenotipo observado en el RSV_{per}, era que las células VERO hubieran sufrido un cambio de tal manera que ya no fueran susceptibles a la infección por el RSV; por lo anterior, se decidió analizar la infectividad del RSV_{per} determinando el número de focos infecciosos/ml. Los resultados mostraron que aún cuando la eficiencia en la formación de sincitio del RSV_{per} en células VERO estaba disminuida el virus era infeccioso. Por tal motivo se pensó que la actividad fusogénica de la proteína F, estaba alterada.

- **Análisis de la actividad fusogénica.**

La actividad fusogénica de la proteína F, depende de diversos factores:

- a. **El procesamiento del precursor F0.**

La activación del precursor F0 es necesaria para la actividad fusogénica, para la diseminación de la infección, ya sea por liberación de partículas infecciosas y para la diseminación célula-célula. El corte proteolítico ocurre principalmente en la región **KKKRKR**₁₃₆, por la acción de una proteasa celular (furina presente en el trans-Golgi, esta endoproteasa es capaz de cortar precursores de una amplia variedad de proteínas) (131, 132), la cual corta al precursor F0 en las subunidades F1 y F2, que permanecen unidas por puentes disulfuro. Estudios recientes reportan a la secuencia **RARR**₁₀₉ como otro sitio de corte accesible a furina y se ha observado que cuando la secuencia **RARR**₁₀₉ se cambia por **NANR**₁₀₉ o **RANN**₁₀₉ el corte por furina no se presenta. Aún cuando, estas mutantes pueden ser procesadas en el sitio 136, la formación de sincitio se reduce. Sin embargo, al tratar las mutantes con tripsina convierten a la proteína F en su forma fusogénica. Lo que indica que las dos secuencias consenso tienen que ser cortadas para actuar correctamente a la proteína de fusión (98). Estudios hechos en otros paramixovirus (SV5), reportan que una mutante en el sitio de corte, que no puede ser

procesada en la célula por furina, se puede activar a su forma fusogénica mediante la adición de tripsina exógena (133, 134, 135, 136). En el virus de Newcastle se reporta que una cepa avirulenta, en la cual la proteína F no puede ser procesada por las enzimas intracelulares pero sí puede cortarse, *in vivo* por la acción de enzimas extracelulares; *in vitro* en cultivo de tejidos el corte depende de la adición de tripsina exógena, e *in vivo* una proteasa que liberan las células Clara del tracto respiratorio es capaz de procesar eficientemente a la proteína de fusión. En huevos embrionados el corte se lleva a cabo por el factor X presente en el líquido alantoideo (137, 138).

Por lo anterior se decidió evaluar la actividad de tripsina en la formación de sincitia. Se encontró que al tratar al virus RSV_{per} con tripsina e infectar células VERO se observaron los sincitia característicos de la infección por el RSV, mientras que el no tratado mostró una baja eficiencia en la formación de sincitia. La deficiencia en la formación de sincitia se presentó en células VERO y no en H358, sin embargo durante la infección de células H358 con el RSV_{per}, se observaron los sincitia característicos. Esto se puede explicar porque se tratan de dos líneas celulares diferentes y probablemente la diferencia más importante, es la similitud de las células H358, con las células Clara (células epiteliales de pulmón) que pudieran estar produciendo otras proteasas que activen a la proteína de fusión. El RSV_{rev}, no mostró cambio significativo respecto a la formación de sincitia en presencia o ausencia de tripsina en ambas líneas celulares.

El efecto de la tripsina sobre el RSV_{per} también se evaluó mediante la cuantificación del número y tamaño de sincitia. Los resultados mostraron que la tripsina tuvo efecto tanto en el número como en el tamaño de sincitia en el virus RSV_{per}, y se observaron valores semejantes a los obtenidos con el RSV_{Lab} en ausencia de tripsina. Estos resultados sugieren una deficiencia en el procesamiento de la proteína de fusión o bien cambios conformacionales que eviten que el péptido de fusión interactúe con la membrana celular y que al agregar la tripsina se exponga y produzca una fusión eficiente.

Debido a que la actividad fusogénica de F depende del procesamiento de F₀, una pregunta interesante en el RSV_{per}, es saber si la proteína F está siendo procesada en las células VERO en presencia de tripsina, para lo cual se sugiere la identificación de las dos subunidades (F1-F2), por ensayo de inmunoblot utilizando anticuerpos monoclonales. Los estudios en este sentido están en proceso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

b. Transporte de la proteína F hacia la membrana de las células infectadas.

La actividad fusogénica de la proteína de fusión del RSV, está determinada por la expresión de la proteína F en la membrana de las células infectadas. Existen reportes que sugieren que el precursor FO no es capaz de llegar a la membrana de la célula (96) puesto que se ha reportado que cuando el procesamiento intracelular es parcialmente inhibido, F no se detecta en la membrana celular. Mientras que otros autores reportan que el corte proteolítico no es un requisito esencial para el transporte a la membrana de las células infectadas, ya que al infectar células LoVo, carentes de furina, o células HEP-2 en presencia de un inhibidor de furina, es posible detectar a F, en la membrana celular (95).

Una posible explicación al fenotipo observado en el RSV_{per} es la posibilidad de que la deficiencia en la formación de sincitio, pudiera deberse a que la proteína F procesada, no se expresara en la membrana de las células infectadas. Por lo que se decidió analizar la expresión de F en células VERO infectadas con RSV_{per} en ausencia y presencia de tripsina. Los resultados mostraron que la proteína se identificó en la membrana de las células infectadas aún en ausencia de tripsina, sin embargo en presencia de tripsina la intensidad de fluorescencia se incrementó. Estos resultados sugieren que la proteína F del RSV_{per} esta presente en la membrana de las células VERO infectadas y que probablemente la tripsina pudiera estar favoreciendo la expresión y reconocimiento de F en la membrana. Posiblemente, mutaciones en el genoma pudieran contribuir al fenotipo observado en la mutante RSV_{per}, al provocar cambios conformacionales que, evitaran la exposición correcta del péptido de fusión y de los epitopes que reconoce el anticuerpo monoclonal y que la tripsina favoreciera la exposición de éstos.

c. Mutaciones en el genoma.

Nuestros resultados sugerían la posibilidad de mutaciones en la secuencia de F, que fueran responsables del fenotipo observado, por lo que se decidió analizar la secuencia de F de los virus, RSV_{per}, RSV_{rev} y RSV_{Lab} y compararlas con la secuencia reportada para el RSV Long.

Los cambios encontrados en las secuencias de RSV_{per} RSV_{rev} y RSV_{Lab} con respecto a la secuencia reportada, se mencionan de acuerdo al sitio en que se ubican en el genoma.

F2:

- En las secuencias obtenidas para F de los virus, RSVLab, RSV_{per} y RSV_{rev}, se encontró en los tres casos un cambio en lle79Met, que no repercute en un cambio de carga y puesto que se encuentra en los 3 virus probablemente no tenga participación en la persistencia viral. Sin embargo, es importante señalar que este cambio se encuentra cercano a un sitio inmunodominante (aa85-93) (104).
- Es importante mencionar que en las tres secuencias estudiadas, no se presentó cambio en los sitios de corte RARR₁₀₈ y KKRKRR₁₁₈, esto es consistente con lo reportado en otros paramixovirus, en los cuales un cambio en el sitio de corte abate la actividad fusogénica (96, 98, 99, 139).
- El cambio Lis123Asn que se reporta sólo se encontró en la secuencia del RSV_{per}, este cambio generó un sitio potencial de N-glicosilación. La proteína F del RSV tiene 6 sitios potenciales de glicosilación (N27, N70, N116, N120, N126 y N500), excepto el N120, los otros sitios de glicosilación están conservados entre los paramixovirus; sugiriendo que la N-glicosilación es importante para la integridad funcional, estructural (99) y propiedades inmunológicas de F (140, 141, 142, 143). La proteína F madura tiene 3 sitios de N-glicosilación N27, N70 y N500, la eliminación de estos, no evita el transporte de la proteína a la membrana celular (144). El sitio N500 forma parte del dominio repetido B y se encuentra adyacente al dominio transmembranal. La N-glicosilación del sitio N500, es importante para la actividad de fusión, ya que mutantes N500O producen una reducción drástica en la actividad de fusión. En cambio N27 y N70 se encuentran en la subunidad F2, y se ha observado que se pueden eliminar sin producir una reducción en la formación de sincitio. Esto indica que la N-glicosilación de la subunidad F2 es menos importante en la actividad de fusión (99).

La activación proteolítica de la proteína F del RSV, tiene lugar en un dominio que contiene aminoácidos (aa) básicos el cual se corta por la acción de endoproteasas celulares. En otras glicoproteínas virales se ha demostrado que la N-glicosilación puede afectar la eficiencia de este proceso, por ejemplo en el virus de Influenza se ha observado que una cadena de carbohidratos cercana al sitio de corte, en la proteína HA, interfiere con el corte proteolítico. La pérdida de la cadena de oligosacárido resultó en un

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

incremento en la capacidad para procesar eficientemente a la proteína y en la virulencia del virus de influenza (145).

Los otros 3 sitios potenciales de glicosilación (N116, N120 y N126) que tiene la proteína F madura, se encuentran cercanos al sitio de corte, sin embargo en la proteína F madura estos sitios no se encuentran glicosilados. Se ha reportado que cuando se cambia N126Q, F es más fusogénica, sugiriendo que la asparagina en esta posición controla negativamente la actividad de fusión. Interesante es mencionar que en la secuencia obtenida para el RSV_{per} se encontró un sitio potencial de glicosilación en N123 que podría alterar el patrón de glicosilación y probablemente hacer menos eficiente el procesamiento proteolítico de F. Aún cuando no sabemos si N123 se glicosila durante el procesamiento de la proteína en las células VERO, es probable que al glicosilarse altere la estructura de F y puesto que se encuentra cercano al sitio de corte II (aa130-136), podría alterar la eficiencia en el procesamiento intracelular de F. La diferencia en el comportamiento del RSV_{per} en células VERO y en H358, podría explicarse por el hecho de que se sabe que la misma proteína, producida en diferentes células puede tener diversos patrones de glicosilación. Por ejemplo, algunos residuos de asparagina en la glicoproteína HA del virus de influenza tiene un patrón de oligosacáridos complejo, cuando el virus se propaga en una línea celular y en otra línea su patrón de glicosilación es rico en manosas (146).

F1:

- En la secuencia del virus RSVLab se encontró un cambio en Tre152Ile, este cambio se ha reportado por Zimmer et al 2001 (98) en una cepa que produce sintomatología eficientemente y por Pringle et al 1995 (147), en la cepa Edinburgh.
- En el dominio repetido A del virus RSVLab se encontró Val185Ser, este cambio no modifica la carga, cabe señalar que éste no se ha reportado anteriormente. En el mismo dominio en el RSV_{per} se encontró un cambio Lis209Glu que representa un cambio de carga. El dominio repetido A está situado en el extremo terminal del sitio de corte y es capaz de formar α -hélice trimérica con una estructura "coiled coil" central. Se cree que las regiones repetidas forman trímeros con estructuras similares a horquillas (hairpin-like) como se ha reportado para proteínas de fusión de otros virus. Probablemente esa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

estructura facilite la unión de la membrana celular con la envoltura del virus favoreciendo la fusión de membranas y la entrada a la célula (107). Estos datos sugieren que el cambio en Lis209Glu podría ser importante en la estructura del dominio repetido A y estar relacionado con el fenotipo observado del RSV_{per}.

▪ Ghosh *et al.* 1997 (148) han reportado una secuencia de las proteínas de fusión de paramixovirus que contiene un motivo similar a zipper de leucina, localizado entre las regiones repetidas A y B. Se sugiere que este dominio es importante para la fusión, puesto que el péptido S269-307 esta región del virus Sendai inhiben la fusión, la actividad antiviral de ese péptido se cree que puede deberse a que interactúe con dominios funcionales de la proteína F, probablemente formando complejos con péptidos derivados de las regiones repetidas A y B o bien a que interactúe con la membrana celular evitando la unión de la proteína de fusión. En SV5, la proteína de Fusión tiene un tercer dominio repetido, en el cual una Leu está presente cada siete residuos en una longitud de 28 aa, tales secuencias repetidas se encuentran formando α -hélices y participan en las interacciones intramoleculares. Esta región está conservada en regiones comparables en otros paramixovirus (NDV, sarampión y parainfluenza) sugiriendo que pudiera ser importante en la estructura o función de estas proteínas (149). Estos datos indican que existe un tercer dominio implicado en la actividad de fusión. Este tercer dominio en el RSV, no tiene una leucina cada siete aminoácidos, sin embargo comparte la característica de que tiene un residuo hidrofóbico en esas posiciones.

Regiones homólogas en el RSV a la secuencia repetida 3 en SV5 y virus Sendai .

RSV 249	TYMLTNS ELL SLINDMPITNDQKKLMSNNVQ IV RQ
RSV 263	DMPITNDQKKLMSNNVQ IV RQSYS IMS IIKE EV LA
SV5 275	GLDLTYMQMV IK IELPTLT VQ FATQIIDLATIS
SENDAI 269	DVDLERYMVTLSVKIPI L SEVFGVL I HKASSIS

En la región 292 a 294 se encontraron varios cambios en las tres secuencias, el RSV_{Lab} mostró un cambio en Lis293Val, que genera un cambio en la carga, sin embargo este cambio no repercute en la capacidad del virus para inducir la formación de sincitias, puesto que el RSV_{Lab} induce eficientemente sincitias. En cambio el RSV_{per} cambió

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ile292Cis (no cambia carga), Lis293Tre (cambio de una aa básico por un no polar) y Glu294Val (cambio de un aa ácido por un no polar).

En la secuencia anterior se muestra con rojo los sitios en los que se encuentran ubicados los cambios de Ile292Cis, Lis293Tre y Glu294Val en el RSV_{per}, aún cuando para el RSV no se ha demostrado que alteraciones en este sitio sean importantes en la función de la proteína F, lo reportado para SV5 y NDV, sugieren que probablemente cambios en esta región pudieran estar involucrados en el fenotipo observado del RSV_{per}.

En RSV_{rev} se encontró el cambio Ile292Val, aún cuando este cambio no se ha reportado para alguna cepa del RSV Humano, se ha reportado que la Ile292 en el virus RSV Bovino puede ser Val (147). Además aunque se encuentre en la región mencionada anteriormente esta mutación no genera un cambio de carga, lo que sugiere que no está afectando la capacidad de fusión puesto que RSV_{rev}, es tan eficiente para formar sincitia, como lo es RSV_{Lab}.

- Una región estructuralmente importante en la proteína de fusión es la región rica en Cis, se ha reportado que las cisteínas están muy conservada entre las distintas cepas (147). Nosotros reportamos un cambio en Tre323Ser, este cambio no altera la carga y está presente en los tres virus estudiados, lo que sugiere que probablemente no sea relevante en la fusión. También dentro de esta región encontramos los siguientes cambios Fen351Tir e Ile386Leu, sólo en el virus RSV_{per}, sin embargo debido a que no representan un cambio en la carga probablemente no sean relevantes para la fusión. El cambio de Tir391His, lo encontramos en los virus RSV_{per} y RSV_{rev}, sin embargo puesto que el RSV_{rev} no presenta alteración en la fusión, probablemente este cambio no esté relacionado con la alteración en la fusión del RSV_{per}. Casi al final de esta región encontramos otro cambio Ala442Val, el cual está presente en los tres virus y que corresponde a lo reportado por Zimmer et al (2001) (98) y a la secuencia reportada por Pringle et al 1995 (147) para la cepa A2 de RSV.

- Como ya se mencionó anteriormente el dominio repertido HRB participa en la actividad de fusión. En este dominio encontramos en RSV_{Lab}, RSV_{per} y RSV_{rev} el cambio de Met526Leu, lo que sugiere que probablemente este cambio no participa en la actividad de fusión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REGION TRANSMBRANAL:

- En la región transmembranal de los virus analizados (RSV_{Lab}, RSV_{per} y RSV_{rev}) no encontramos cambios en la secuencia.

REGION INTRACITOPLASMICA:

- La región intracitoplásmica de la proteína de fusión del RSV_{per} presentó un cambio Ser560Cis. Alteraciones en el tallo citoplásmico de la proteína F en donde la actividad de la proteína está alterada, se han reportado en infección persistente con el virus del sarampión (150) y en SV5 se han reportado mutaciones en el dominio citoplásmico que alteran la actividad de fusión (151, 152). Además cabe señalar que en el dominio citoplásmico se encuentra cercana otra Cis550, lo que pudiera ser de importantes consecuencias ya que podría formar puentes disulfuro con Cis560.

El cultivo infectado persistentemente que reportamos (M ϕ per2), provee un modelo *in vitro* para el estudio de la interacción virus-macrófago y el mecanismo de persistencia por el RSV. Además el cultivo permite el estudio de aspectos celulares e inmunológicos en una estirpe celular que probablemente esté relacionada con la diseminación de la infección. No descartamos la posibilidad que cambios en la célula sean también parte fundamental en el mantenimiento de la infección persistente por el RSV. Hemos visto que durante la persistencia se generaron partículas defectuosas y una variante viral con una menor eficiencia en la formación de sincitio, que probablemente colaboren en el mantenimiento de la infección.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VII. CONCLUSIONES.

- Se logró establecer un cultivo infectado persistentemente con el RSV en la línea celular de macrófagos (P388D1).
- El cultivo obtenido no presentó periodos de crisis, solo en algunos pases del cultivo Møper0 se observó el sincitio característico.
- Durante la persistencia se generaron partículas defectuosas, en un porcentaje entre 40-60%.
- El cultivo Møper2 presentó casi el 100% de células infectadas.
- El virus obtenido del cultivo Møper2 (RSVper), mostró una menor eficiencia en la formación de sincitio respecto a la del virus de referencia, en células VERO. En cambio en células H358, no se observó diferencia en la eficiencia para formar sincitio.
- Se obtuvo una revertante espontánea RSVrev, con una eficiencia para formar sincitio comparable con la del RSVLab.
- El análisis de la secuencia de genoma de F, mostró varios cambios respecto a la secuencia obtenida para el virus RSVLab. La participación de éste y otros cambios en el establecimiento y mantenimiento de la infección persistente está por determinarse.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VIII. PERSPECTIVAS.

Recientemente el estudio de la proteína F, ha despertado un gran interés puesto que se ha tratado de utilizar a ésta como vacuna, por su capacidad para inducir y aumentar la respuesta inmune protectora en modelos animales de infección por el RSV (153, 154, 155). Se ha descrito que F es el principal antígeno de protección contra distintas cepas y se expresa en la membrana de las células infectadas, que pueden ser blanco de células T citotóxicas (156). Además se ha reportado que anticuerpos monoclonales anti-F, neutralizan la infectividad e inhiben la fusión y protegen contra la infección en ratones, rata de algodón y ternera, pero no son capaces de eliminar una infección ya establecida. (156).

El conocimiento de las funciones independientes de los dominios específicos de la proteína F, podrían permitir crear vectores virales o la optimización de vacunas. En este sentido la obtención de una mutante viral menos fusogénica en el presente trabajo, nos plantea la posibilidad de estudiar a la proteína F y su posible papel en el mantenimiento de una infección persistente así como el análisis del genoma para localización de dominios específicos importantes en la persistencia viral.

Con base en los antecedentes mencionados y los resultados obtenidos en este trabajo podemos sugerir que mutaciones en la proteína F, pudieran estar asociados con el fenotipo observado en el RSV_{per} y para la persistencia viral, por lo que consideramos importante para este trabajo:

- Analizar el procesamiento de F (F1-F2), en células VERO infectadas con el RSV_{per} en presencia de tripsina. Este análisis resultaría de gran importancia puesto que nos permitiría: 1) comprobar si el precursor F0 del RSV_{per} se procesa adecuadamente en células VERO infectadas, 2) correlacionar los datos del procesamiento con los datos obtenidos de presencia de la proteína F en la membrana de células infectadas, 3) sugerir que cambios en el genoma de F, pudieran estar asociados en el fenotipo observado. Se propone analizar por inmunoblot mediante el uso de un anticuerpo monoclonal (Mab19, que reconoce la subunidad F1), el procesamiento del precursor F0, comparándolo con el virus RSV_{Lab} en células VERO.
- Confirmar que el virus RSV_{per} es capaz de establecer una infección persistente con mayor facilidad que el virus de referencia para lo cual se propone establecer

<p>TESIS CON FALLA DE ORIGEN</p>

infecciones con el virus *RSV_{per}* en diferentes líneas celulares haciendo una comparación con la infección del virus de referencia.

- ◆ Así mismo se propone clonar el genoma de F en un vector adecuado, para su expresión en células de mamífero, en las que probablemente se observe una deficiencia en la fusión y posteriormente con mutagénesis dirigida cambiar la secuencia, con la del virus de referencia esperando que se restablezca el fenotipo del virus con el que se inició la persistencia viral
- ◆ No descartamos en el cultivo la presencia de las partículas defectuosas que pudieran estar participando en el establecimiento y mantenimiento de la persistencia viral por el RSV en este cultivo, sin embargo aún estamos en el proceso de caracterización de éstas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX. APENDICE.**MATERIAL Y REACTIVOS.**Células:

Células VERO, ATCC (CCL 81)

Células P3888D1, ATCC (TIB 63)

Células HEp-2, ATCC (CCL23)

Células H358, ATCC (5807-CRL)

Medios y suplementos para cultivo:

D-MEM (GIBCO 12100-046)

RPMI 1640 (GIBCO 31800-022)

- Medio de cultivo para las células P388D1 (RPMI 1640-ME).

RPMI 1640 suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), 2.2 g/lit de Hepes, 2.2 g/lit de bicarbonato de sodio, 100,000 unidades internacionales (UI)/lit de penicilina G y 100 mg/lit de sulfato de estreptomycin y 0.1% de 2-mercaptoetanol.

- Medio de cultivo para las células H358 (RPMI 1640).

Medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, 2.2 g/lit de Hepes, 2.2 g/lit de bicarbonato de sodio

- Medio de cultivo para las células VERO y HEp-2.

D-MEM suplementado con 5% de SFB, 2.2 g/lit de Hepes, 2.2 g/lit de bicarbonato de sodio, 1000 UI/lit de penicilina G, 100 mg/lit de sulfato de estreptomycin.

- Suplementos.

Suero fetal bovino (GIBCO-BRL 10437-028)

Hepes (SIGMA H-0763)

Bicarbonato de sodio (PRODUCTOS QUÍMICOS MONTERREY 1290)

Penicilina G (SIGMA P-3032)

Sulfato de estreptomycin (SIGMA S-6501)

2- Mercaptoetanol (BIO-RAD 161-0710)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agar (DIFCO 0142-01)

Reactivos:

NaCl (MERCK 6404)

CuCl_2 anhidro (QUIMICA DINÁMICA C320.0)

$\text{NaSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MERCK 6649)

NaH_2PO_4 (J.T. BAKER 790)

MgSO_4 (J.T. BAKER 2500)

MnCl_2 (J.T. BAKER 2500)

Azul Tripano (SIGMA T5526)

Rojo Neutro (SIGMA N-7005)

Albúmina Sérica Bovina (SIGMA A-3350)

Polilisina (SIGMA P-1399)

Polietilenglicol (PEG 6000 SIGMA, P-2138)

3,3'-Diamino benzidina (SIGMA D-5637)

Tween 20 (BIO-RAD 170-6531)

Sacarosa (MERCK K-3985251)

Tripsina (SIGMA 1989)

Etanol (MERCK 1/15853)

Isopropanol (MERCK 21582)

Cloroformo (MERCK 15854)

Metanol (MERCK MX04488-1)

Acetona (MERCK 15852)

Paraformaldehído (SIGMA P6148)

Glutaraldehído (MERCK 820603)

H_2O_2 (PRODUCTOS QUÍMICOS MONTERREY 5600)

Dimetilsulfóxido (J.T. BAKER 9224)

Dietilpircarbonato (SIGMA D5758)

dNTP's (INVITROGEN 18427-013)

Transcriptasa reversa superscript II (GIBCO-BRL 18064-014)

Inhibidor de RNasa (GIBCO-BRL 15518-012)

DTT 0.1M (GIBCO-BRL part Y00147)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Amortiguador 5X (GIBCO-BRL part Y00146)

Amortiguador de amplificación. 10X (GIBCO-BRL part Y02028)

Cloruro de magnesio 50mM (GIBCO-BRL part Y02016)

DNA polimerasa Platinum Taq (GIBCO-BRL 10966-026)

Marcadores de DNA λ /Hind III GIBCO-BRL 14401-012 y ϕ X174/Hae III GIBCO-BRL14402-010.

DNA polimerasa Taq (GIBCO-BRL 11615-036)

Trizol. (GIBCO-BRL 15596-026)

Anticuerpos y conjugados.

Kit Anti-RSV conjugado con FITC (DAKO K6102)

Anti-RSV (CHEMICON)

Anti-IgG conejo conjugado con peroxidasa, obtenido en cabra (AMERSHAM NA933)

Anti-IgG conejo conjugado con FITC, obtenido en burro (AMERSHAM NA857).

Anti-F (CHEMICON MAB 8581)

Anti-IgG de ratón-FITC (AMERSHAM NXA931)

AMORTIGUADORES Y SOLUCIONES

PBS

NaCl 8 gr

KCl 0.2 gr

Na₂HPO₄ 0.96 gr

KH₂PO₄ 0.2 gr

Se afora a 1 litro, se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza por autoclave

TNE

Tris-HCl 50 mM PH 7.5

NaCl 0.1M

EDTA 10 mM

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

EARLECaCl₂ anhidro 0.002 gr

KCl 0.004 gr

MgSO₄•7 H₂O 0.02 gr

NaCl 0.668 gr

NaHCO₃ 0.22 gr

D-Glucosa 0.1 gr.

Para el ensayo de interferencia utilizar rojo neutro 3.3 mg.

Aforar a 100 ml.

TAE (50X)

Tris base 242 gr

57.1 ml de ácido acético glacial

100 ml de EDTA 0.5M (pH=8)

Aforar a 1000 ml.

TE

Tris HCl 10 mM

EDTA 1mM

pH=7.5

Amortiguador de carga para geles de agarosa.

Glicerol 1% en TAE 1X

Orange G (SIGMA O-1625) trazas.

Bromuro de etidio 10 µg/ml en agua estéril.

Solución stock de la resina utilizada en la purificación de los productos de PCR.

25 g de tierra de diatomeas (SIGMA D 5384), aforar a 500 ml con agua estéril, agitar y dejar reposar 3 hrs y eliminar el sobrenadante. El sedimento se resuspende el 100 ml de agua estéril.

En un vaso de precipitados se colocan:

4 ml de isotiocianato de guanidina (11.82 g, SIGMA G-6639)

<p>TESIS CON FALLA DE ORIGEN</p>

2.5 ml de tris 1M pH=7

1 ml de EDTA 0.5M

1ml del stock de la resina

Se afora a 25 ml con agua estéril.

Amortiguador de fosfatos pH=8.

Fosfato monobásico de sodio 0.5 M.

Fosfato dibásico de sodio 0.5 M.

MATERIAL DE PLÁSTICO.

Portaobjetos de poliestireno de 8 pozos (NUNC Roskilde Denmark Cat no.177445).

Botella para cultivo celular de 25 cm² (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 163371)

Botellas para cultivo celular de 80 cm² (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 144881)

Botella para cultivo celular de 150 cm² (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 147589)

Cajas petri para cultivo celular 60 cm² (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 172931)

Cajas petri para cultivo celular 100 cm² (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 172934)

Placas de 96 pozos para cultivo celular (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 167008)

Placas de 6 pozos para cultivo celular (COSTAR, Broadway, Cambridge., Cat no. 3590)

Cubreobjetos de vidrio de 10 mm (KNITTEL GLÄSER Alemania)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

X. BIBLIOGRAFIA.

1. Han LL., Alexander JP. and Anderson LJ. (1999). Respiratory syncytial virus pneumonia among the elderly: an assessment of disease burden. *J Infect Dis*; 179:25-30.
2. Crowe JE. (1995). Current approach to the development of vaccines against disease caused by respiratory syncytial virus (RSV) and parainfluenza virus (PIV). A meeting report of the WHO Program for Vaccine Development. *Vaccine*; 13:415-21.
3. Dudas RA. and Karron RA. (1998). Respiratory syncytial virus vaccines. *Clin Microbiol Rev*; 11:430-439.
4. Sistema Único de información para la vigilancia epidemiológica. Boletín Semanal de la Dirección General de Epidemiología, SSA. Semana 18-2002.
5. Arnold R. et al. (1995). Cytokine (IL-8, IL-6, TNF- α) and soluble TNF receptor I released from human peripheral blood mononuclear cells after respiratory syncytial virus infection. *Immunology*; 85:364-372.
6. Aggarwal AN., Gupta D., Behera D. and Jindal SK. (2000). Analysis of static pulmonary mechanics helps to identify functional defects in survivors of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med Oct*; 28(10):3480-3483.
7. Hall CB. (1998). Respiratory syncytial virus. In: Feigen, RD., Cherr JD, and Fletcher, J (eds.) *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
8. Simoes EA. (1999). Respiratory syncytial virus infection. *Lancet*; 354:847-852.
9. Wayde PR. (1998). Respiratory syncytial virus (RSV) disease and prospects for its control. *Antiviral. Res*; 39:63-79.
10. Collins P. et al. (2001). Respiratory syncytial virus. In: *Fields Virology*. 4th edition. Edited by: Fields B. et al. Raven Publishers. Philadelphia. Chapter 45. pp. 1443-1485.
11. Muller-Pebody B. et al (2002). Contribution of RSV to bronchiolitis and pneumonia-associated hospitalizations in English children, April 1995-March 1998. *Epidemiol Infect*; 129: 99-106.
12. Crowe JE. (1999). Host responses to respiratory virus infection and immunization. *Curr Top Microbiol Immunol*; 236:191-214.
13. Han LL., Alexander JP. and Anderson LJ. (1999). Respiratory syncytial virus pneumonia among the elderly: an assessment of disease burden. *J. Infect. Dis*; 179:25-30.
14. Boeck K. (1996). Respiratory syncytial virus bronchiolitis: clinical aspects and epidemiology. *Monaldi Arch. Ches. Dis*; 51:210-213.
15. Piedemonte G. (2002). The association between respiratory syncytial virus infection and reactive airway disease. *Respir Med*; 96:S25-S29.
16. Işaiu G., Teodosiu O., Athanssiu P., Sternberg I. and Dumitriu Z. (1985). Persistence of viruses in the nasopharynx of apparently healthy children aged 0-5 years. Results of investigations performed in 1982-83. *Virology*; 36:175-179.
17. Mills B., Singer F., Weiner L. and Holst P. (1981). Immunopathological demonstration of respiratory syncytial virus antigens in Paget's disease of bone. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*; 78(2):1209-1213.
18. Mills B., Weiner L., Suffin S., Stabile E. and Holst P. (1984). Evidence for both respiratory syncytial virus and measles virus antigens in osteoclasts of patients with Paget's disease of bone. *Clin Orthop*; 183:303-311.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

19. Mills B. and Singer F. (1987). Critical evaluation of viral antigen data in patients Paget's disease of bone. *Clin Orthop*; 217:16-25.
20. Cubie HA., Duncan LA., Marshall LA and Smith NM. (1997). Detection of respiratory syncytial virus nucleic acid in archival postmortem tissue from infants. *Pediatr Pathol Lab Med*; 17:927-938.
21. Mickhalchenkova NN., Kaniazeva LD. and Slepishkin AN. (1987). Respiratory syncytial virus infection in chronic bronchitis patients. *Ter Arckh*; 59:50-52.
22. Kriviiskai VZ. and Iakovleva NV. (1992). The characteristics of the humoral response to respiratory syncytial viral infection in adult patients with different forms of bronchitis. *Vopr Virusol*; 37:146-149.
23. Kriviiskai VZ., Iakovleva NV. and Aleksandrova NI. (1996). Characteristics of anti-respiratory syncytial humoral immunity during persistence of respiratory syncytial virus antigens in adult patients with chronic obstructive bronchitis. *Vopr Virusol*; 41:234-237.
24. Openshaw P. (1995). Immunopathological mechanisms in respiratory syncytial virus disease. *Springer Semin. Immunopathol*; 17:187-201.
25. Domurat E, Roberts NJ., Walsh EE. and Dagan R. (1985) RSV infection of human mononuclear leukocytes in vitro and in vivo. *J. Infect. Dis*; 152:895-902.
26. Valacheer JF., Bourhy H., Lavenau A., Bourges-Abella N., Roth M., Andreletti A., Ave P. and Schelcher F. (2001). Persistent infection of B lymphocytes by bovine respiratory syncytial virus. *Virology*; 291:55-67.
27. Bossert B. and Conzelmann K. (2002). Respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural (NS) proteins as host range determinants: a chimeric bovine RSV with NS genes from human RSV is attenuated in interferon-competent bovine cells. *J. Virol*; 76(9):4287-4293.
28. Hegele RG., Hayashi S., Bramley AM. and Hogg JC. (1994). Persistence of respiratory syncytial virus genome and protein after acute bronchiolitis in guinea pigs. *Chest*; 105:1848-1854.
29. Streckert H., Philippous 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*; 141:401-410.
30. Dukhama A., Vitalis TZ. and Hegele RG. (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*; 10:20-26.
31. Baldrige P. and Senterfit L. (1976). Persistent infection of cells in culture by respiratory syncytial virus. *Proc Soc Exp Biol Med*; 151:684-688.
32. Pringle C. et al. (1978). Initiation and maintenance of persistent infection by respiratory syncytial virus. *J Virol*; 28:199-211.
33. Bangham C. and McMichael A. (1986). Specific human cytotoxic T cell recognize B-cell lines persistently infected with respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*; 83:9183-9187.
34. Baldrige P. and Senterfit L. (1976). Persistent infection of cells in culture by respiratory syncytial virus. *Proc Soc Exp Biol Med*; 15:684-688.
35. Iankevich O. and Preizin R. (1977). Chronic infection of HeLa cells with respiratory syncytial virus. *Vopr Virusol*; 2:142-147.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

36. Fernie B., Ford E. and Gerin J. (1981). The development of BALBI/c cells persistently infected with respiratory syncytial virus: presence of ribonucleoprotein on cell surface. *Proc Soc Exp Biol Med*; 167:83-86.
37. Bangham C. and McMichael A. (1986). Specific human cytotoxic T cell recognize B-cell lines persistently infected with respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*; 83:9183-9187.
38. Hall CB. (1998). Respiratory syncytial virus. In: Feigen, RD., Cherr JD, and Fletcher, J (eds.) *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
39. Openshaw P. (1995). Immunity and immunopathology to respiratory syncytial virus. The mouse model. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med*; 152:S59-S62.
40. Schlender J., Walliser G., Fricke J. and Conzelmann K. (2002). Respiratory syncytial virus fusion protein mediates inhibition of mitogen-induced T-cell proliferation by contact. *J. Virol*; 76(3):1163-1170.
41. Graham BS. (1996). Immunological determinants of disease caused by respiratory syncytial virus. *Trends. Microbiol*; 4(7):290-300.
42. Graham BS., Jhonson TR. and Stokes Peebles R. (2000). Immune-mediated disease pathogenesis in respiratory syncytial virus infection. *Immunopharmacology*; 48:237-247.
43. 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*; 88:527-536.
44. Alwan W., Kozłowska W. and Openshaw P. (1994). Distinct types of lung disease caused by functional subsets of antiviral T cells. *J. Exp. Med*; 179:81-89.
45. Becker S., Quay J. and Soukun J. (1991). Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6 and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *J. Immunol*; 147:4307-4312.
46. Nadal D. and Ogra P. (1990). Development of local immunity: role in mechanisms of protection against or pathogenesis of respiratory syncytial virus infections. *Lung*; 168:379-387.
47. Franke G. et al. (1995). Alteration of pulmonary macrophage function by respiratory syncytial virus infection in vitro. *Immunology*; 85:364-372.
48. Panuska J. et al (1995). Respiratory syncytial virus induces interleukin-10 by human alveolar macrophages. *J. Clin. Invest*; 96:2445-2453.
49. Sakai S, et al. (1997). Contribution of tumor necrosis factor α and interleukin-1 α on the production of macrophage inflammatory protein-2 in response to respiratory syncytial virus infection in murine macrophage cell line RAW264.7. *J Med Virol*; 53:145-149.
50. Merolla R., Rebert NA., Tsiviste T., Hoffmann SP. and Panuska JR. (1995). Respiratory syncytial virus replication in human lung epithelial cells: inhibition by tumor necrosis factor α and interferon β . *Am J Respir Crit Care Med* 152:1358-1366.
51. Cirino N. et al (1993). Restricted replication of respiratory syncytial virus in human alveolar macrophages. *J. Gen. Virol*; 74:1527-1537.
52. Midulla F. et al. (1993). Respiratory syncytial virus lung infection in infants: Immunoregulatory role of infected alveolar macrophages. *J. Infect. Dis*; 168:1209-1213.
53. Franke G et al. (1995). Interaction of alveolar macrophages and respiratory syncytial virus. *J Immunol Methods*; 174:173-184.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

54. Panuska JR., Cirino NM., Midulla F., Despot JE, Mc Fadden ER. and Huang YT. (1990). Productive infection of isolated human alveolar macrophages by respiratory syncytial virus. *J. Clin. Invest*; 86:113-119.
55. Hegele RG., Robinson PJ., González JC. and Hogg JC. (1993). Production of acute bronchiolitis in guinea pigs by human respiratory syncytial virus. *Eur Respir J*; 6:1324-1331.
56. Hegele RG., Hayashi S., Bramley AM. and Hogg JC. (1994). Persistence of respiratory syncytial virus genome and protein after acute bronchiolitis in guinea pigs. *Chest*; 105:1848-54.
57. Lindsay J. and Oldstone M. (2001). Immune response to viruses. In: *Fundamental virology*, 4th edition. Edited by: Fields B. et al. Raven Publishers. Philadelphia. Chapter 11. pp. 285-320.
58. Villarreal LP., Defillipis VR. and Gottlieb KA., (2000). Acute and persistent viral strategies and their relationship to emerging disease. *Virology*; 272: 1-6.
59. de la Torre J.C., Borrow P. and Oldstone M. (1991). Viral persistence and disease: Cytopathology in the absence of cytolysis. *British Medical Bulletin*; 47: 838- 851.
60. Ahmed R., Morrison LA. and Knipe DM. (1997). Viral persistence. In: *Viral pathogenesis*. Philadelphia: Lippincott-Raven, pp. 181-205.
61. Chen W. and Baric R. (1996). Molecular Anatomy of Mouse Hepatitis Virus Persistence: Co-evolution of Increased Host Cell resistance and Virus Virulence. *J. Virol*; 70(6):3947-3960.
62. Novella I., Domingo E. and Holland J. (1997). Rapid viral quasiespecies evolution: implications for vaccine and drug strategies. *Molecular Medicine Today*; 76: 248-253.
63. Domingo E. Virus en Evolución. Eudema Eds. Madrid 1994. pp. 51-66 y 83-88.
64. Oldstone M. (1991). Molecular anatomy of viral persistence. *J. Virol*; 65(12):6381-6386.
65. Ahmed R. and Oldstone M. (1988). Organ specific selection of viral variants during chronic infection. *J. Experimental Medicine*; 167:1719-1724.
66. Matloubian M., Somasundaram T., Kolherkar S., Selvakumar R. and Ahmed R. (1990). Genetic basis of viral persistence: single aminoacid change in the viral glycoprotein affects ability of lymphocytic choriomeningitis virus to persist in adult mice. *J. Experimental Medicine*; 172: 1043-1048.
67. Calliote C. and Pringle C. (1991). Defective synthesis of envelope proteins by temperature-sensitive mutants representing complementation groups B and D of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol*; 72:2501-2508.
68. Randolph VB. et al. (1994). Attenuated temperature-sensitive respiratory syncytial virus mutants generated by cold adaptation. *Virus Research*; 33:241-259.
69. Crowe JE. et al. (1994). A further attenuated derivative of cold-passaged temperature sensitive mutant of respiratory syncytial virus retains immunogenicity and protective efficacy against wild-type challenge in seronegative chimpanzees. *Vaccine* 12(9):783-790.
70. Bangham CR. and Kirkwood TBL. (1990). Defective Interfering particles: Effects in modulating Virus growth and persistence. *Virology*; 179(2):821-826.
71. Southern P and Oldstone M. (1986). Medical consequences of persistent viral infection. *The New England Journal of Medicine*; 314 (6):359-367.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

72. Oldstone M. (1990). Viral persistence and immune dysfunction. *Hospital Practice*; 15:81-98.
73. Borrow P., Tishon A. and Oldstone M. (1991). Infection of lymphocytes by a virus that aborts cytotoxic T lymphocyte activity and establish persistent infection. *J. Experimental Medicine*; 174:203-212.
74. Fearnis R., Collins P. and Peeples ME. (2000). Functional analysis of the genomic and antigenic promoters of human respiratory syncytial virus. *J. Virol*; 74(13):6006-6014.
75. Cane PA., Mathews DA. and Pringle CR. (1991). Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial virus. *J. Gen Virol*; 72:2091-2096.
76. Melero JA. et al (1997). Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. *J. Gen. Virol*; 78:2411-2418.
77. Ray R. et al (2001). Immunoregulatory role of secreted glycoprotein G from respiratory syncytial virus. *Virus Research*; 75:147-154.
78. Teng MN., Whitehead S. and Collins P. (2001). Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo. *Virology*; 289:283-296.
79. García Beato R. et al. (1996). Host cell effect upon glycosylation and antigenicity of human respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Virology*; 221:301-309.
80. García-Barreno B., Delgado T. and Melero JA. (1994). Oligo(A) sequences of human respiratory syncytial virus G protein gene: assessment of their genetic stability in frameshift mutants. *J. Virol*; 68(9):5460-5468.
81. Cane P. and Pringle CR. (1995). Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: evidence for progressive accumulation of amino acid changes in the attachment protein. *J. Virol*; 69(5):2918-2925.
82. Sullender WM. and Britt WJ. (1996). Antigenic and immunogenic analysis of group A and group B respiratory syncytial virus G proteins expressed from recombinant baculovirus. *J. Gen Virol*; 77: 641-648.
83. Martínez I., Dopazo J. and Melero JA. Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants. *J. Gen. Virol*; 78:2419-2429.
84. Feldman SA., Hendry MR. and Beeler J. (1999). Identification of a linear heparin binding domain of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *J. Virol*; 73(8):6610-6617.
85. Hallak LK. et al (2000). Glycosaminoglycan sulfation requirements for respiratory syncytial virus infection. *J. Virol*. 74(22): 10508-10513.
86. Martínez I. and Melero JA. (2000). Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. *J. Gen. Virol*; 81:2715-2722.
87. Tripp RA., Jones L. and Anderson L. (2000). Respiratory syncytial virus G and/or SH glycoproteins modify CC and CXC chemokine mRNA expression in the Balb/c mouse. *J. Virol*; 74(13):6227-6229.
88. Heminway BR. et al (1994). Analysis of respiratory syncytial virus F, G and SH proteins in cell fusion. *Virology*; 200:801-805.
89. Pастey MK. and Samal SK. (1997). Analysis of bovine respiratory syncytial virus envelope glycoproteins in cell fusion. *J. Gen. Virol*. 78:1885-1889.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

90. Feldman SA, Crim RL and Beeler JA. (2001). Human respiratory syncytial virus surface glycoproteins F,G and SH forma an oligomeric complex. *Arch. Virol*; 146:2369-2383.
91. Pastey MK., Crow JE. and Graham BS. (1999). RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus-induced syncytium formation. *J. Virol*; 73(9):7262-7270.
92. Techaarpornkul S., Collins P. and Peebles ME. (2002). Respiratory syncytial virus with the fusion protein as its only viral glycoprotein is less dependent on cellular glycosaminoglycans for attachment than complete virus. *Virology*; 294:296-304.
93. Sugrue RJ. et al (2001). Furin cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is not a requirement for its transport to the surface of virus-infected cells. *J. Gen. Virol*; 82:1375-1386.
94. Bolt G., Ostergaard L. and Birkeslund HH. (2000). Cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is required for its surface expression: role of furin. *Virus Research*; 68:25-33.
95. Ruiz-Arguello MB. et al (2002). Effect of proteolytic processing at two distinct sites on shape and aggregation of an anchorless fusion protein of human respiratory syncytial virus and fate of intervening segment. *Virology*; 298: 317-326.
96. Zimmer G., Budz L. and Herrler G. (2001). Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein: cleavage at two furin consensus sequences. *J. Biol. Chem*; 276(34):31642-31650.
97. Feldman SA., Audet S. and Beeler JA. (2000). The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with heparan sulfate. *J. Virol*; 74(14): 6442-6447.
98. Kurt-Jones E. et al. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature Immunol*; 1:398-401.
99. Zimmer G., Trotz I. and Herrler G. (2001). N-glycans of protein differentially affect fusion activity of human respiratory syncytial virus. *J. Virol*; 75(30):4744-4751.
100. Mc L Rixon H. (2002). Multiple glycosylated forms of the respiratory syncytial virus fusion protein are expressed in virus-infected cells. *J. Gen. Virol*; 83:61-66.
101. López JA. et al (1990). Location of a highly conserved neutralizing epitope in the F glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J. Virol*; 64(2):927-930.
102. Arbiza J. et al (1992). Characterization of two antigenic sites recognized by neutralizing monoclonal antibodies directed against the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol*; 73:2225-2234.
103. López JA. et al. (1993). Conformational constraints of conserved neutralizing epitopes from a major antigenic area of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J. Gen. Virol*; 74:2567-2577.
104. López JA. et al. (1998). Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J. Virol*; 72(8):6922-6928.
105. Lawless-Delmedico MK. et al. (2000). Heptad repeat regions of respiratory syncytial virus F1 protein form a six-membered coiled-coil complex. *Biochem*; 39(38):11684-11695.
106. Mathews JM. et al. (2000). The core of the respiratory syncytial virus fusion protein is a trimeric coiled coil. *J. Virol*; 74(13):5911-5920.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

107. Zhao X., Singh M., Malashkevich N. and Klim P. (2000). Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*; 97(26):14172-14177.
108. Calder L. et al. (2000). Electron microscopy of the human respiratory syncytial virus fusion protein and complex that it forms with monoclonal antibodies. *Virology*; 271:122-131.
109. Smith B., Lawrence MC. and Colman PM. (2002). Modelling the structure of the fusion protein from human respiratory syncytial virus. *Protein Engineering*; 15(5):365-371.
110. Lamb R. and Kolakofsky D (2001). Paramixoviridae: the virus and their replication In: *fundamental virology 4th Edition* Edited by: Fields B. Raven Publishers. Philadelphia. pp689-724.
111. Lu B., Ma Ch., Brazas R. and Jin H. (2002). The major phosphorylation sites of the respiratory syncytial virus phosphoprotein are dispensable for virus replication in vitro. *J. Virol.* 76(21):10776-10784.
112. Lu B., Brazas R., Ma Ch., Kristoff T., Cheng X. and Jin H. (2002). Identification of temperature -sensitive mutations in the phosphoprotein of respiratory syncytial virus that are likely involved in its interaction with the nucleoprotein. *J. Virol.* 76(6):2871-2880.
113. Tang RS., Nguyen N., Cheng X. and Jin H. (2001). Requirement of cysteines and length of the human respiratory syncytial virus M2-1 protein for protein fuction and virus viability. *J. Virol.* 75(23):11328-11335..
114. Fearn R. and Collins P. (1999). Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J. Virol.* 73:5852-5864.
115. Cuesta I., Geng X., Asenjo A. and Villanueva N. (2000). Structural phosphoprotein M2-1 of the human respiratory syncytial virus is an RNA binding protein. *J. Virol.* 74:9858-9867.
116. Sutherland K., Collins P. and Peeples M (2001). Synergistic effects of gene-end signal mutations in the M2-1 protein on transcription termination by respiratory syncytial virus. *Virology*; 288:295-307.
117. Bermingham A. and Collins P. (1999). The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*; 96:11259-11264.
118. Jin H., Cheng X., Zhou HZ., Li S. and Seddiqui A. (2000). Respiratory syncytial virus that lacks open reading frame 2 of the M2 gene (M2-2) has altered growth characteristics and is attenuated in rodents. *J Virol.* 74(1):74-82.
119. Payment P. and Trudel M. (1993). *Methods and Techniques in Virology*. Marcel Dekker, INC. N.Y. pp. 309.
120. Ey PL., Frowse SJ. and Jenkin CR. (1978). Isolation of pure IgG1 and IgG2a immunoglobulins form mouse serum using protein A-sepharose. *Biochem*; 15:429-436.
121. Goding JW. (1978). Use of staphylococcal protein A as immunological reagent. *J. Immunol. Methods*; 20:241-253.
122. Cane PA. and Pringle CR. (1991). Respiratory syncytial virus heterogeneity during an epidemic: analysis by limited nucleotide sequencing (SH gene) and restriction mapping (N gene). *J Gen Virol*;72:349-357.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

NO SE PUEDE COPIAR SIN PERMISO
DE LA BIBLIOTECA

123. Treuhaft MW. and Beem MO. (1982). Defective interfering particles of respiratory syncytial virus. *Infect Immun*;37:439-444.
124. Buchi T. and Howe C. (1973). Morphogenesis and ultrastructure of respiratory syncytial virus. *J. Virol*; 12(5):1173-1180.
125. Bahi T. (1988). Direct observation of the budding and fusion of an enveloped virus by video microscopy of a viable cell. *J Cell Biol*; 107(5):1689-1695.
126. Sarmiento RE., Tirado R. and Gomez B. (1997). Reinfection induced increase of rubella persistently infected cells in a macrophage-like cell line. *Virus. Res*; 50: 15-22.
127. Holland JJ, Villarreal LP, Breindl MM. (1976). Factors involved in the generation and replication of rhabdovirus defective interfering T particles. *J Virol*; 17:805-815.
128. Ahmed R. and Chen I. (1999). *Persistent Viral Infections*, Ed. John Wiley & Sons. England, pp. 725.
129. Parry JE., Shirodaria PV. and Pringle CR. (1979). Pneumoviruses: the cell surface of lytically and persistently infected cells. *J. Gen. Virol*; 44, 479-491.
130. Guerrero A., Ortega E. and Gómez B. (2001). Persistence of respiratory syncytial virus in macrophages alters phagocytosis and pro-inflammatory cytokine production. *Viral Immunol*; 14(1):19-30.
131. Nakayama K. (1997). Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a variety of precursor proteins. *J. Biochem*; 327:625-635.
132. Steiner D. (1998). The proprotein convertases. *Current opinion in chemical biology*; 2:31-39.
133. Klenk HD. and Garten W. (1994). Chapter 14. Activation cleavage of viral spike proteins by host proteases. In: *Cellular receptors for viruses*. Cold Spring Harbor Laboratory press. NY. pp. 241-279.
134. Brunner J. and Tsurudome M. (1993). Chapter 14. Respiratory syncytial virus interactions with host cell membranes: an enigma among the paramyxoviridae. In: *Viral Fusion Mechanisms*. CRC Pres INC NY. pp 363-380.
135. Paterson RG., Russell CJ. and Lamb RA. (2000). Fusion protein of the paramyxovirus SV5: destabilizing and stabilizing mutants of fusion activation. *Virology*; 270(1):17-30.
136. Tsurudome M., Ito M., Nishio M., Kawano M., Komada H. and Ito Y. (2001). Hemagglutinin-neuraminidase-independent fusion activity of simian virus 5 fusion (F) protein: difference in conformation between fusogenic and nonfusogenic F proteins on the cell surface. *J Virol*; 75(19):8999-9009.
137. Li Z., Sergel T., Razvi E. and Morrison T. (1998). Effect of cleavage mutants on syncytium formation direct by the wild-type fusion protein of Newcastle disease virus. *J. Virol*; 72(5):3789-3795.
138. Cobaleda C., Munoz-Barroso I., Sagrera A. and Villar E. (2002). Fusogenic activity of reconstituted Newcastle disease virus envelopes: a role for the hemagglutinin-neuraminidase protein in the fusion process. *Int J Biochem Cell Biol*; 34(4):403-13.
139. Dutch RE. et al (2001). Paramyxovirus fusion (F) protein a conformational change on cleavage activation. *Virology*; 281:138-150.
140. Doms RW., Lamb RA., Rose JK. and Helenius A. (1993). Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology*; 193:545-562.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

141. McGinnes L., Sergel T., Reitter J. and Morrison T. (2001). Carbohydrate modifications of the NDV fusion protein heptad repeat domains influence maturation and fusion activity. *Virology*;283(2):332-42.
142. Hu A., Cathomen T., Cattaneo R. and Norrby E. (1995). Influence of N-linked oligosaccharide chains on the processing, cell surface expression and function of the measles virus fusion protein. *J Gen Virol*;76(3):705-10.
143. McL. Rixon H., Brown C. and Sugrue R. (2002). Multiple glycosylated forms of the respiratory syncytial virus fusion protein are expressed in virus-infected cells. *J. Gen. Virol*; 83:61-66.
144. Collins P. and Mottet G., (1991). Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol*; 72(12):3095-30101.
145. Kawaoka Y. Naeve CW., and Webster RG. (1984). Is virulence of H5N2 influenza virus in chickens associated with loss of carbohydrate from hemagglutinin. *Virology*; 139(2): 303-316.
146. Lamb RA., Joshi SB. and Dutch RE. (1999). The paramyxovirus fusion protein forms an extremely stable core trimer: structural parallels to influenza virus haemagglutinin and HIV-1 gp41. *Mol Membr Biol*; 16(1):11-9.
147. Pringle CR. and Plows DJ. (1995). Variation in the fusion glycoprotein gene of human respiratory syncytial virus subgroup A. *Virus genes*; 11(1): 37-45.
148. Ghosh JK., Ovadia M. and Shai Y. (1997). A leucine zipper motif in the ectodomain of sendai virus fusion protein assembles in solution and in membranes and specific binds biologically-active peptides and the virus. *Biochemistry*; 36:15451-15462.
149. Sergel TA., McGinnes LW. and Morrison TG. (2000). A single amino acid change in the Newcastle disease virus fusion protein alters the requirement for HN protein in fusion. *J Virol*; 74(11):5101-5107.
150. Ning X. et al (2002). Alterations and diversity in the cytoplasmic tail of the fusion protein of subacute sclerosing panencephalitis virus strains isolated in Osaka, Japan. *Virus Res*; 86(1-2):123-131.
151. Dutch RE. and Lamb RA. (2001). Deletion of the cytoplasmic tail of the fusion protein of the paramyxovirus simian virus 5 affects fusion pore enlargement. *J Virol*;75(11):5363-9.
152. Waning DL., Schmitt AP., Leser GP. and Lamb RA. (2002). Roles for the cytoplasmic tails of the fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins in budding of the paramyxovirus simian virus 5. *J Virol*;76(18):9284-97.
153. Dudas R. and Karron R. (1998). Respiratory syncytial virus vaccines. *Clin Microbiol Rev*; 11(3):430-439.
154. Tebbey PW. et al (2000). Effective mucosal immunization against respiratory syncytial virus using purified and a genetically detoxified cholera holotoxin CT-E29H. *Vaccine*; 18(24):2723-2734.
155. Hancock GE. et al (2001). CpG containing oligodeoxynucleotides are potent adjuvants for parental vaccination with the fusion (F) protein of respiratory syncytial virus (RSV). *Vaccine*; 19: 4874-4882.
156. Collins P. and Murphy BR. (2002). Respiratory syncytial virus genetics and vaccines strategies. *Virology*; 296: 204-211.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Characteristics of a respiratory syncytial virus persistently infected macrophage-like culture

Rosa Elena Sarmiento, Rocio Tirado, Beatriz Gómez *

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

Received 30 May 2001; received in revised form 13 September 2001; accepted 13 September 2001

Abstract

A persistently infected culture obtained from immortalized murine macrophage-like cells, which survived respiratory syncytial virus (RSV) infection at multiplicity of one, was established and characterized. The presence of RSV through the passages was confirmed and monitored by (a) detection of infectious virus by TCID₅₀/ml, (b) defective particles by viral infectivity interference and buoyant density determinations, (c) cell surface antigen by indirect immunofluorescence and FACS, and (d) expression of a viral gene by RT-PCR. Moreover, cell morphology changes by comparison of macrophage area and perimeter were determined. A second culture was obtained by cell cloning out of this culture, and a third culture was established by superinfection with the original virus, in which 92–95% of the macrophages expressed viral antigen without cell destruction and released defective particles but low levels of infectious virus. Although the three cultures maintained the characteristics of persistently infected cells, concentrations of released infectious virus, defective particles, and percentages of cells bearing viral antigen varied. RSV persistently infected murine macrophage cultures provide an in vitro model to study viral–macrophage interaction and to allow the experimental use of a cell important in disseminating the infection. In addition, due to the wide array of cellular and humoral reagents in the mouse, studies on immunologic aspects of viral immunity are facilitated. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: RSV; P388D₁; Persistence; Defective particles

1. Introduction

Respiratory syncytial virus (RSV), a pneumovirus of the Paramyxoviridae family, has long been recognized as the single most important virus causing acute severe respiratory-tract infec-

tions in children who require hospitalization (Hall, 1998; Simoes, 1999; Wayde, 1998). RSV has been also implicated in severe lung diseases in adults, especially in the elderly (Han et al., 1999). Infections with RSV frequently occur in the early years of life and repeated infections are common in all age groups. The role of the immune response in protection against RSV infection is not well understood (Hall, 1998; Openshaw, 1995a,b; Van Schaik, et al., 2000). Although, cellular im-

* Corresponding author. Tel.: + 52-55-623-2469; fax: + 52-55-623-2386/82.

E-mail address: begomez@servidor.unam.mx (B. Gómez).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

73.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

R.E. Sarmiento et al. / Virus Research 84 (2002) 45–58

munity appears to play a prominent role in recovery from RSV infection it has also been implicated in exacerbating or augmenting the clinical disease (Hall, 1998; Openshaw, 1995a; Van Schaik et al., 2000; Wayde, 1998). Macrophages play pivotal role in cellular immune response to viral infections, and participate in both innate and acquired immunity. These cells are widely distributed in the organism and their presence in major organs, serous spaces, and sites of inflammation suggests that they are among the first immune cells encountered by the invading virus. Furthermore, they play an important role in disseminating the disease (Auger and Rose, 1992).

Interactions between RSV and macrophages have been addressed by *in vivo* (Becker et al., 1991; Franke-Ullmann et al., 1994; Panuska et al., 1992), *ex-vivo* (Fisher et al. 1997; Franke-Ullmann et al., 1995; Midulla et al., 1993; Auger and Rose, 1992; Panuska et al., 1995; Stadnik et al., 1997; Sone et al., 1997) and *in vitro* studies (Cuerrero-Plata et al., 2001; Sakai et al., 1997). Despite the fact that long-term viral persistence in immortalized macrophages provide a model for studies of virus-host cell interactions in a stable, well characterized, and homogenous cell population, no reports are available in establish RSV persistence in macrophage-like cell lines.

This report describes the establishment and characteristics of persistently infected immortalized macrophages with RSV Long strain. Two different cell lines were used to establish persistently infected cultures, a human promonocyte (U937; ATCC CRL 1593) and a murine macrophage-like line (P388D₁). This line is derived from a DBA/2 mouse lymphoma and is induced by methylchlorantrene; it displays a number of macrophage characteristics and is considered as a nearly mature macrophage (Koren et al., 1975; Ralph, 1980). DBA/2 mice are commonly used as experimental model to study RSV immune response (Openshaw, 1995b).

RSV persistence in U937 cells; was not sustained cells were permissive, produced infectious virus, formed characteristic RSV syncytia and survived only a few passages. On the other hand, persistence was easily and reproducibly induced in M ϕ , and the culture was characterized by typical

persistence properties. Macrophages were chosen for the study, as they are particularly important to the immune response to RSV in that they are recruited to the site of infection in large numbers (Auger and Rose, 1992). Moreover, macrophages are among the cell types selected by human and animal virus to persist (Ahmed and Chen, 1999).

2. Material and methods

2.1. Virus and cells

Stock of respiratory syncytial virus Long strain; (ATCC, VR-26) purified by plaque assay and after precipitation with polyethylene glycol in sucrose gradient (Fig. 4B, 26) was propagated, titrated in Vero cells grown in DMEM (Gibco BRL New York, NY) and supplemented with NaHCO₃, HEPES, antibiotics (penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 mg/ml, Sigma-Aldrich, Toluca, Mexico), and 10% fetal bovine serum (FBS). Viral infectivity was expressed as TCID₅₀/ml (Payment and Trudel, 1993). Intra-cellular infectious virus were determined after sonicating 10⁶ cells/ml for 10 min (Sonicator Branson B32H). The P388D₁ cell line (ATCC TIB 63; hereafter macrophages (M ϕ)) was grown as monolayer in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with NaHCO₃, HEPES, antibiotics, 0.1% of 2-mercaptoethanol (hereafter medium), and 10% FBS (complete medium).

2.2. Persistent cultures

Persistently infected cultures (M ϕ _{per}) were obtained by M ϕ infected with RSV at multiplicity of infection (moi) of 1.0. After absorption for 2 h at 37 C and removing non-absorbed virus, medium with 2% FBS was added. Cell viability was determined by trypan blue exclusion and viral infectivity and defective particles, as described subsequently. The culture was maintained for six days with a daily change of complete medium. Thereafter, surviving cells were extensively washed with medium and propagated with complete medium. Twice a week (every 3–4 days), they were subculture at 1:2 dilutions. During the

passages, viral persistence was verified and monitored by determining the presence of cells bearing viral antigen, the expression of a viral gene, and the production of infectious virus and defective particles.

2.3. Determination of viral particles interfering with RSV infectivity (defective particles; DI)

The presence of DI in $M\phi_{per}$ supernatants was determined by interference in viral infectivity and the presence in sucrose gradients of bands with different buoyant density than that observed in the original RSV stock. The viral infectivity interference determination was adapted from the colorimetric assay of Treuhaft (1983). Briefly, Vero cells were overlaid with supernatants (clarified by centrifugation at low speed) from passages of the persistent infected cultures. After incubation for 2 h at 37 °C, the liquid was removed and the cell monolayer extensively washed and infected with RSV stock (moi of 0.3) for 2 h at 37 °C. Then, non-absorbed virus was removed, and medium was added and incubated for 72 h at 37 °C. Thereafter, culture fluid was removed and replaced with neutral red in Earle solution (Sigma-Aldrich). After washing twice with PBS and incubation for 2 h at 37 °C, the colorant was absorbed by ethanol in 0.2M NaH_2PO_4 and its concentration determined by absorbance. Positive controls were cells acutely infected with RSV (moi 0.3, 72 h p.i.) and negative control mock-infected cells; both controls were included in each determination. Interference activity was expressed as percentage and calculated by the following formula: $(OD\ sample - OD\ positive\ control)/(OD\ negative\ control - OD\ positive\ control) \times 100$.

Buoyant density analysis of supernatants obtained from $M\phi_{per}$ passages was done by lineal sucrose gradient (20–60%) centrifugation (Beckman SW 40 Ti 90,000 $\times g$ 2 h 4 °C, Beckman Centrifuge L860M) after concentration with polyethylene glycol (Payment and Trudel, 1993). Gradients were fractionated from the top; buoyant density of each fraction (0.5 ml) was determined by refractometry (Carl Zeiss 120371) and protein and nucleic acid concentration by spectrophotometry (Beckman DU640). Buoyant den-

sity was calculated with the following formula: $\rho_{200C} = 2.7329\eta - 2.6425$, η = refraction units.

2.4. Inhibition of viral infectivity interference

In $M\phi_{per}$ supernatants and in buoyant density bands obtained from sucrose gradients, DI presence was confirmed by measuring inhibition of viral interference after irradiation with UV and treatment with anti-RSV. The UV irradiation dose used (10 s, 30 cm distance, General Electric lamp 15 W (G1578)) was higher than required to reduce RSV infectivity $> 6\ log_{10}\ TCID_{50}/ml$.

Viral infectivity interference was neutralized as follows: to 89 μl of $M\phi_{per}$ supernatant and to serial dilutions (1:3) in DMEM were added 11 μl of goat polyclonal IgG anti-RSV (Chemicon International, Inc., Temecula, CA) 1:9 in PBS + 1% bovine serum albumin (PBSA, Sigma), then incubated 2 h at 37 °C (incubation mixture). Thereafter, 50 μl of the incubation mixture was used to determine interference on viral infectivity as described. As control of free neutralizing antibody, 50 μl of RSV stock (moi of 0.3) was added to the remaining 50 μl of the incubation mixture and after incubating for 2 h at 37 °C, viral infectivity was determined. Interference activity was calculated from the supernatant dilution, in which no viral neutralizing antibody was detected.

2.5. Indirect immunofluorescence

Cell-viral antigen was detected by immunofluorescence assay as previously described (Sarmiento et al., 1997). First antibody was anti-RSV serum obtained in our laboratory from New Zealand rabbits after three immunizations with lineal sucrose gradient purified RSV ($10^6\ TCID_{50}/ml$ and 400 mg protein/ml) and with a infectivity neutralization titer of $1-2 \times 10^5\ TCID_{50}/ml$ (Payment and Trudel, 1993). Donkey anti-rabbit IgG fluoresceine linked whole antibody (Amersham International, Buckinghamshire, UK) diluted 1:500 in PBSA was used as second antibody. Positive control was $M\phi$ infected at moi of 1.0 for 24 h. The number of fluorescent antigen-positive cells was determined by observation with a Nikon Diaphot microscope and at least 300 cells were counted in different fields.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.6. Flow cytometry analysis

Macrophages (1×10^5) either from M ϕ cultures or from different M ϕ_{per} cultures were treated with PBS + 1% FBS for 30 min at 4 °C with continuous shaking. After incubating with rabbit anti-RSV serum, (100 μ g; in RPMI, 500 μ l) at 4 °C for 2 h, the cells were washed twice with cold PBSA and fixed for 30 min at 4 °C with 0.5% paraformaldehyde (Sigma) in PBSA pH 7.4. Second antibody donkey anti-rabbit IgG fluorescein linked whole antibody (Amersham) was added and incubated 2 h at 4 °C; thereafter, it was washed with PBSA and cell fluorescence analyzed in a FACScan analyzer (Becton-Dickinson, Mountain View, CA). In every measurement, 1×10^4 cells were analyzed.

2.7. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

Of total RNA (from M ϕ or M ϕ_{per} cells), 3–5 μ g in 4 μ l of reaction buffer 5 \times (Gibco) was used to obtain cDNA (Chomezinski and Sacchi, 1987). To the sample 2 μ l of dNTP (10 mM of each; Gibco), 1.0 μ l of dTT (Gibco), 1.0 μ l (20 U) of RNase inhibitor (Boehringer, Mannheim, Germany) were added and brought to 20 μ l with DEPC (Sigma) water. After addition of 50 μ l of mineral oil, the reaction mixture was incubated at 80 °C during 5 min and cooled on ice. Thereafter, 1 μ l (0.5 μ g/ μ l) of oligo dT (Gibco) was added, incubated at 60 °C for 10 min and ice cooled for 5 min. Subsequently, 1 μ l of Superscript II RNase H-Reverse Transcriptase (Gibco) was added and the mixture incubated at 42 °C for 1 h. To the transcription volume (2–5 μ l) were added 8 μ l of PCR buffer 10 \times (Gibco), 40 pmol of primers 1 and 2 and 0.5 μ l of Taq polymerase (Gibco). cDNA was amplified as described (Cane and Pringle, 1991).

2.8. Cell area and perimeter determinations

Both parameters were compared between M ϕ and M ϕ_{per} cells, and the determinations of each analyzed cell were done using software for digital image analysis (Image Pro Plus, Media Cybernet-

ics, Silver Spring, MD) with a microscope (Zeiss, FOMI) and a video camera (Hitachi VKM 98 E). Cells grown in eight well tissue culture chambers (1×10^5 /well; Nunc, Inc., Naperville, IL) were fixed with 2% glutaraldehyde (Sigma) in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 for 30 min at room temperature. The cells were then washed three times with PBSA and examined. For each well, five different fields (four corners and a center field) were analyzed.

3. Results

3.1. Persistently infected cultures

To obtain RSV persistently infected cultures, M ϕ was infected with RSV stock at moi from 0.1 to 5.0. The culture infected at moi of 1.0 presented the highest proportion of cells expressing viral antigen without causing syncytia. Although cell viability dropped during the first hours post-infection from 83% at 24 h to 30% at 48 h, after 72 h macrophage density began to increase. These cultures could be further propagated and viral persistence determined.

In various experiments, cultures obtained from macrophages surviving the infection (M ϕ_{per}) did not exhibit cell destruction phases, although in some cultures and in the first passages, syncytia characteristics of RSV were eventually and transiently observed (Fig. 1).

One of these cultures (M ϕ_{per1}) was subcultured for 26 passages. Each time the cells were subcultured viral presence was determined. Cell-viral antigen was determined, the expression of the N gene was confirmed, in the supernatants infectious virus was titred (Fig. 2A), and the presence of DI was measured by interference capacity in viral infectivity (Fig. 3). Although viral persistence was confirmed the percentage of cells expressing viral antigen was low (40–60) (Fig. 6B).

With the aim of increasing the number of cells expressing viral antigen we attempted to obtain cultures from a single cell. However, to propagate macrophages a minimum of five cells was required regardless of whether they stemmed from M ϕ or M ϕ_{per1} . From M ϕ_{per1} passage 26 and after cloning

the cells by limited dilution three times, ten different cultures with characteristics of being persistently infected were obtained. One was further propagated ($M\phi_{per1}$), and although it was regarded as persistently infected no increase in the percentages of cells presenting viral antigen (40–60) was observed (Fig. 6C). Therefore, its response to superinfection was studied by infecting with the original virus at various moi. By superinfecting passage 10 of $M\phi_{per1}$ at moi of 1.0, a second culture ($M\phi_{per2}$) was established in which 90–95% of the cells expressed viral antigen (Fig. 6D, E and F) and RSV persistence was monitored and confirmed.

3.2. Infectious virus

Infectious virus levels (determined by TCID₅₀/ml) were not always detectable during $M\phi_{per0}$, $M\phi_{per1}$, or $M\phi_{per2}$ passages (Fig. 2A and B). In the first passages of $M\phi_{per0}$, high viral titers were detected; in the eighth passage, a viral concentra-

tion (2×10^5 TCID₅₀/ml) similar to that obtained by acute infection of macrophages ($1-4 \times 10^5$ TCID₅₀/ml, data not shown) was observed. The high titer could be due to the remaining input viruses and/or those produced by acutely infected macrophages. In subsequent passages (10–26), virus concentrations decreased to reach undetectable levels (Fig. 2A). To the contrary, in $M\phi_{per1}$ and $M\phi_{per2}$, the highest viral concentration observed was 5×10^3 TCID₅₀/ml (Fig. 2B), which is lower than that produced by acute infected macrophages. Moreover, after the first passages no extracellular infectious virus was detected in $M\phi_{per1}$ and $M\phi_{per2}$. When cells from the passages in which no extracellular virus was evident were sonicated after extensive washing, intracellular infectious virus with a titer of approximately 1×10^2 TCID₅₀/ml was observed.

Although no infectious virus was observed by TCID₅₀/ml, viral titers fluctuating between $1-3 \times 10^2$ TCID₅₀/ml were observed by plaque assay determined in Vero cells (results not shown).

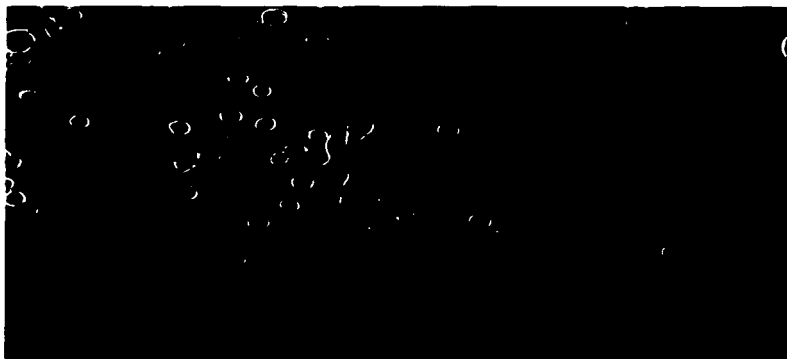


Fig. 1. Cytopathic effect in RSV persistently infected $M\phi$ cells. Characteristic syncytia of RSV in $M\phi_{per0}$ cell passage 10.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

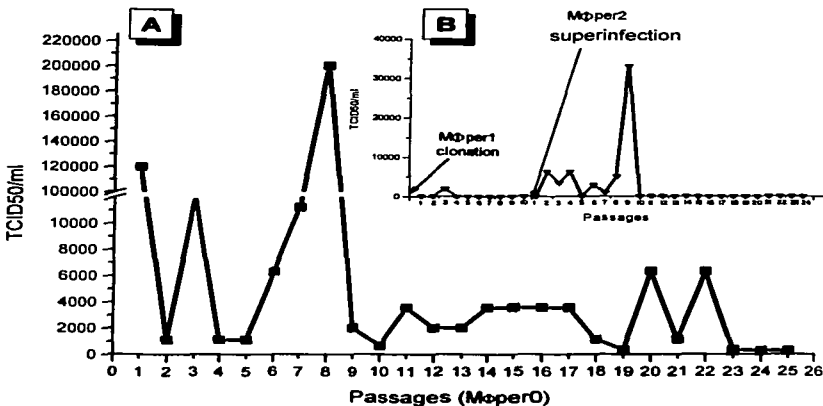


Fig. 2. Titer of infectious virus from supernatants obtained from Mφ_{per} cultures. Extracellular viruses were determined by TCID₅₀/ml. Panel A, culture obtained from Mφ cells that survived RSV infection at moi of 1.0 (Mφ_{per0}). Panel B, subline Mφ_{per1} obtained by cell cloning Mφ_{per0} at passage 26 and subline Mφ_{per2} obtained from Mφ_{per1} passage 10, cells that survived superinfection with the original virus.

3.3. Defective particles

The presence of DI in Mφ_{per} cultures was inferred by biological assay, interference of viral infectivity, and by the presence in sucrose gradients of bands with different buoyant densities from those observed in the stock virus. Interference in RSV stock virus multiplication in Mφ_{per0} did not appear until passage 11 and then was present in all subsequent passages of Mφ_{per0}, Mφ_{per1}, and Mφ_{per2}. The highest interference percentages (80–90) were observed in the first Mφ_{per0} passages (11–15). Thereafter, interference values of 40–60% were obtained in all subsequent passages of Mφ_{per0} (16–26) Mφ_{per1} (1–6), and Mφ_{per2} cultures (1–24). With the aim of investi-

gating whether defective particles remain inside acute infected Mφ and Mφ_{per} cells, macrophages were sonicated and infectious virus and viral interference were determined. Infectious virus with a titer of approximately 1×10^2 TCID₅₀/ml was released by sonication or Mφ acute infected cells (results not shown). Viral interference of approximately 30% was observed by sonicated cells from Mφ_{per} cultures; in contrast, no significant increase was observed when cells from acute infected Mφ were sonicated (Fig. 3) suggesting that DI remain inside Mφ_{per} cells.

No interference of viral infectivity was detected when supernatants from various passages of the persistently infected cultures were irradiated with UV (Fig. 3). Moreover, the interference present in

supernatants from $M\phi_{per}$ cultures was neutralized by polyclonal IgG anti-RSV (Fig. 3). To assure neutralization of the defective particles without affecting the titer of the stock RSV used in the assay, supernatants at different dilutions were used. It is particularly important in this assay not to have free anti-viral antibodies because in their presence results can be misleading.

Supernatants from $M\phi_{per2}$ culture were analyzed by ultracentrifugation in a sucrose gradient and the fractions assayed as described. As shown in Fig. 4A, five bands with buoyant densities of 1.019, 1.09, 1.13, 1.18, and 1.268 g/ml were ob-

served. In contrast, analysis of stock RSV (Fig. 4B) showed only one band of 1.18 g/ml corresponding to the reported RSV virion buoyant density (Payment and Trudel, 1993). Furthermore, the presence of DI and infectious virus was determined in the different bands. Viral infectivity determined by TCID₅₀/ml and by plaque assay. Viral antigen was observed in Vero cells infected with bands 1.13, 1.18 and 1.268, suggesting the presence of infecting virus; in contrast no viral antigen was detected when the infection was carried out with the remaining bands. Interference in viral infectivity was observed with buoyant den-

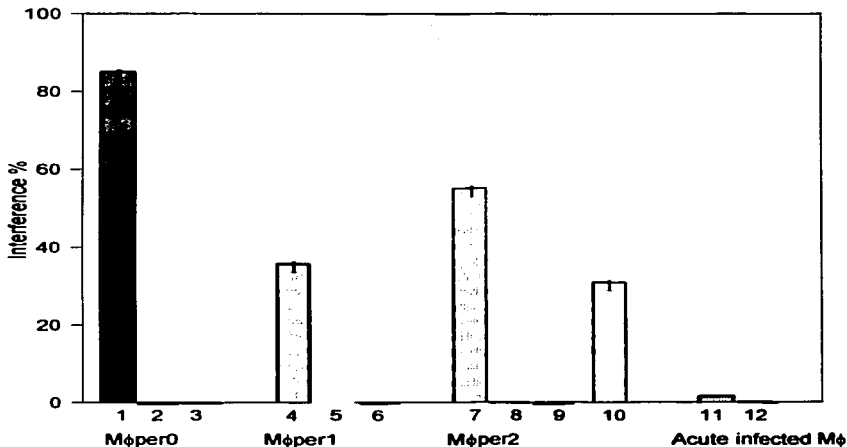


Fig. 3. Percentage of interference on viral infectivity. Interference in RSV titer by sonicated cells and supernatants harvested from $M\phi_{per}$ cultures and $M\phi$ acute infected was determined as described in Materials and Methods. Supernatants: of $M\phi_{per}$ cultures 1, 4, and 7; UV-treated 2, 5, and 8; anti-RSV antibody-treated 3, 6, and 9; from acute infected cells 11; sonicated cells from $M\phi_{per2}$ 10, and from acute infected 12.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

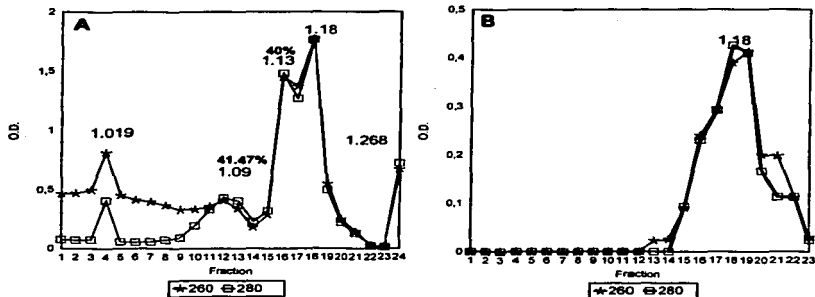


Fig. 4. Linear sucrose gradient of RSV stock and supernatants from $M\phi_{per2}$ culture. Buoyant and optical densities were determined for each fraction as described in Material and Methods. The numbers refer to the buoyant density values of the observed gradient bands. Panel A supernatant from $M\phi_{per2}$ culture. Panel B from RSV stock.

sity bands of 1.09 and 1.13 g/ml (41.47 and 40%, respectively).

3.4. Cell-viral antigen

During an extended period of $M\phi_{per0}$ and $M\phi_{per1}$ passages, 40–60% of cells displayed fluorescence. However, judged by the intensity of immunofluorescence the level of RSV protein expression varied, and fluorescent-positive macrophages with undetectable, intermediate, and bright levels of fluorescence (implying differences in viral antigen concentrations among the cells) are shown in a representative photomicrograph of $M\phi_{per0}$ cells (Fig. 5A). Faintly stained cells were infected because similar patterns were not evident in uninfected controls (Fig. 5B). A substantial increase of cells exhibiting viral antigen was obtained by superinfection of $M\phi_{per1}$ passage 10.

Fluorescence microscopy does not lend itself to accurate quantitation of antigens; therefore, cyto-metric analysis was performed. When the fluorescence intensity of anti-RSV antibody treated $M\phi$ cells and $M\phi_{per}$ cells was compared, a significant

increase was observed in $M\phi_{per}$ cells, which could be attributed to the presence of RSV antigen (Fig. 6). Acute infected $M\phi$ cells displayed specific fluorescence in a symmetrical distribution (Fig. 6A), implying that a single positive cell population was present. In determinations done with $M\phi$ and $M\phi_{per0}$ or $M\phi_{per1}$ cells, overlapping of the curves was evident; nevertheless, infected cells (40–60%) could be identified (Fig. 6B and C). In contrast, when assays were carried out with $M\phi$ and $M\phi_{per2}$, no overlapping of curves was observed and the percentage of fluorescence-positive cells was > 95 (Fig. 6D, E, and F). Furthermore, the infected cells were distributed asymmetrically suggesting macrophage populations with differences in viral antigen concentrations. The presence of viral antigen in percentages similar to those observed in immunofluorescence assays confirmed the accuracy of our determinations.

3.5. Amplification of mRNA from a RSV gene

The results obtained by RT-PCR assays showed a clear band of 278 bp (Fig. 7) corre-

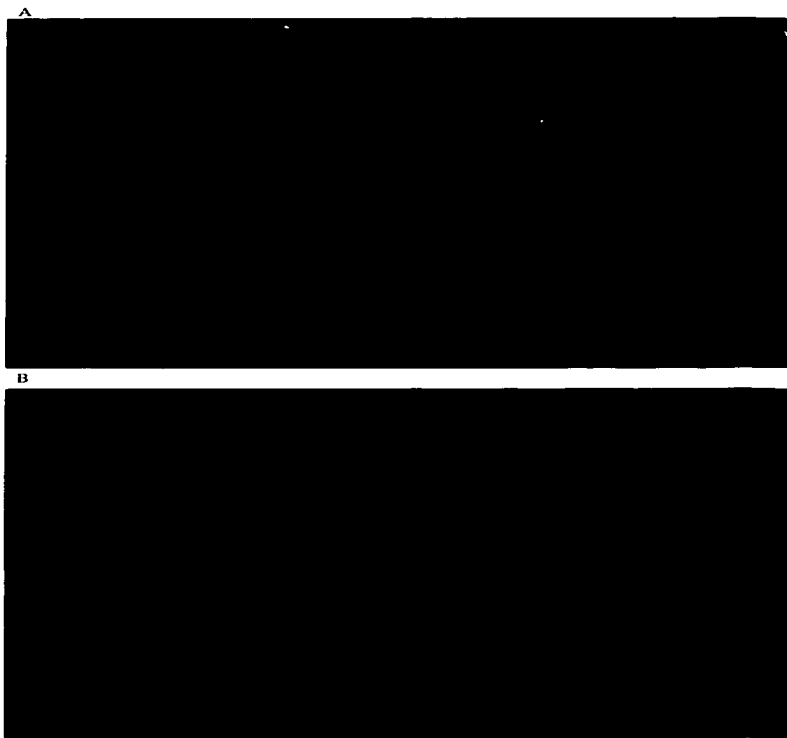


Fig. 5. Indirect immunofluorescence staining of RSV antigen in M ϕ persistently infected. Fixed M ϕ_{6000} or M ϕ cells were incubated with anti-RSV serum as first antibody, and as second antibody donkey anti-rabbit IgG fluoresceine-linked whole. A. M ϕ_{6000} cells passage 6. B. M ϕ cells.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

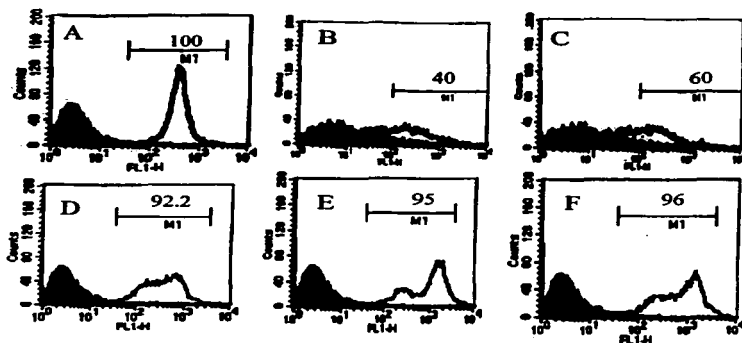


Fig. 6. Fluorescence profiles of macrophage-like cells acute and persistently infected with RSV. Surface viral antigen on cells from M ϕ acute infected and M ϕ_{per0} cultures was treated with anti-RSV serum and stained with anti-rabbit fluoresceine isothiocyanate conjugate (Amersham) and analyzed by flow cytometry as described in the Section 2. In each experiment, an isotype control (pre-immune serum) was included and the obtained fluorescence intensity value was subtracted in all assays. The log of fluorescence intensity is shown in the abscissa and the cell number in the ordinate. The percentage of cells presenting RSV antigen are in numbers. A, M ϕ cells acute infected; B, M ϕ_{per0} cells passage 24; C, M ϕ_{per1} cells passage 4; D, M ϕ_{per2} cells passage 18; E, M ϕ_{per2} passage 21, and F, M ϕ_{per2} passage 24. Filled histograms uninfected macrophages and open histograms infected macrophages.

sponding to the amplified gene N segment (7). This was observed in all the studied passages: M ϕ_{per0} (passages 22–24), M ϕ_{per1} (passages 1–10) and M ϕ_{per2} (passage 1–24).

3.6. Cell morphology

No appreciable difference in growth rate between M ϕ_{per0} , M ϕ_{per1} , or M ϕ_{per2} cultures with respect to M ϕ was observed, although slight morphologic alterations could be observed in macrophages. Therefore, the area and perimeter of M ϕ_{per0} (passage 25), M ϕ_{per1} (passage 8), and M ϕ_{per2} (passage 10) were compared with M ϕ cells. The difference between the areas and perimeter of the infected macrophages (M ϕ_{per0} , M ϕ_{per1} , or M ϕ_{per2}) with respect to M ϕ cells was

analyzed using non-parametric Mann–Whitney Z test (Sigma Plot Scientific Graphic Software 3.0). Fig. 8 shows the results obtained with M ϕ_{per2} and

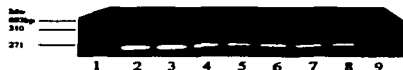


Fig. 7. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products. DNA primers for the RSV gene N segment of 278 bp between nucleotides 858 and 1135 were used to synthesize cDNA and amplify it by PCR according to the described procedure. The PCR products were run on agarose gel and viewed with a UV monitor camera after ethidium bromide staining. Lane 1, DNA size standards ϕ X174 DNA/Hae III (Gibco). Amplified RNA extracted from acutely infected M ϕ cells (Lane 2), M ϕ_{per0} cells (Lanes 3 and 4), M ϕ_{per1} cells (lanes 5 and 6), M ϕ_{per2} cells (Lanes 7 and 8), and M ϕ cells (Lane 9).

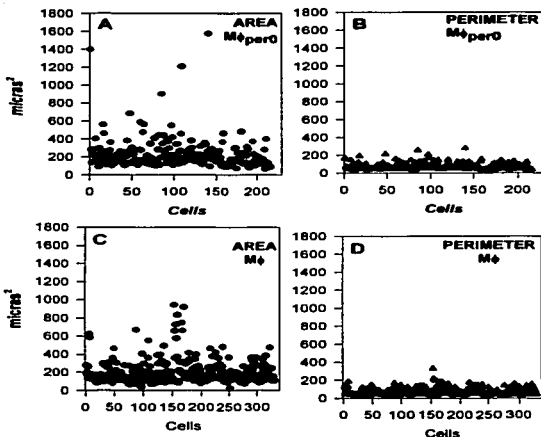


Fig. 8. Morphologic analysis of macrophage-like cells persistently infected with RSV and non-infected cells. Panel A and B of 317 macrophages from $M\phi_{per0}$ (passage 10). A cell area and B, perimeter. Panel C and D of 205 macrophages from $M\phi$ culture. C cell area and D perimeter. Analysis showed significant differences in the cell area (Fig. 8A and C; $P < 0.0129$), and no significant change in the perimeter (Fig. 8B and D; $P < 0.1401$).

$M\phi$. P values of < 0.05 were considered significant. Analysis showed a significant difference in cell area (Fig. 7B and D) but no significant change in perimeter (Fig. 8A and C).

4. Discussion

Similar characteristics to RSV persistently infected cultures described here were reported in persistently infected human (Baldridge and Senterfit, 1976; Bangham and McMichael, 1986; Iankevich and Preizin, 1977; Parry et al., 1979), monkey (Pringle et al., 1978) and murine (Fernie

et al., 1981) cell lines. No cell destruction phase was observed during continuous passages, and growth patterns between infected and non-infected cultures were similar. After an initial production of infectious virus, the culture stabilized with low-to-undetectable levels of virus production and resisted superinfection with the original virus. In addition cell-viral antigen detected by immunofluorescence was expressed although the percentage varied; rarely all cells were fluorescence positive in MCR-5 (Parry et al., 1979) and in monkey BS-C-1 cell lines (Pringle et al., 1978). In contrast, 17–29% of human HeLa cells presented viral antigen (Iankevich and Preizin, 1977).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

R.E. Sarmiento et al. / Virus Research 84 (2002) 45-58

In the culture we report on here, 40-60% of macrophages were immunofluorescence-positive in the persistent cultures obtained from cells surviving the initial RSV infection ($M\phi_{\text{per}1}$) or by cloning ($M\phi_{\text{per}1}$). Although $M\phi_{\text{per}1}$ and $M\phi_{\text{per}2}$ were regarded as persistently infected cultures, the presence of non-infected $M\phi$ was not excluded. In fact, the presence of non-infected macrophages can be inferred by the relatively low percentage of cells expressing viral antigen (40-60) (Fig. 6 B and C) and by the increase in infectious titer virus by superinfection with the original virus. A substantial increase in the percentage of cells bearing viral antigen (90-95%) (Fig. 6D, E, and F) was evident in macrophages surviving the superinfection ($M\phi_{\text{per}2}$). The increase in fluorescence positive cells and in produced virus can be explained, $M\phi$ could become acute infected with concomitant production of virus and cell lysis by exposure to the original virus. However, the possibility that some $M\phi$ might become persistently infected cannot be excluded.

The evidence that RSV genome was present and expressed in $M\phi_{\text{per}}$ cells was based on several types of assays: the presence of viral antigen by immunofluorescence and FACS, production of the virus and defective particles, and by expression of a viral gene N. This gene was selected because no significant changes in its sequence have been reported in RSV isolates from various countries (Cane and Pringle, 1991).

Stable persistent infections of cultured cells with RNA virus have been obtained by a variety of methods, such as infecting in the presence of antiviral antibody, infecting simultaneously with defective particles, infecting with mutants at restrictive temperatures (ts) or using naturally resistant cells (Ahmed and Chen, 1999). Although RSV persistently infected cultures have been readily established without external factors (Baldrige and Senterfit, 1976; Bangham and McMichael, 1986; Fernie et al., 1981; Iankevich and Prezin, 1977; Parry et al., 1979; Pringle et al., 1978) the use of ts mutants (Parry et al., 1979; Pringle et al., 1978) and partially resistant cells (Fernie et al., 1981) has been reported.

In the present study persistent infection of an immortalized macrophage cell line with RSV

Long strain was achieved without external factors. Although antibody to human RSV is almost universal in adult bovine serum it was not present in the fetal bovine serum (results not shown) in which the persistently infected cells were propagated. Therefore, antibody was not essential for either initiation or maintenance of the persistent infection. Although the viral genome of a paramyxovirus (SV5) can persist in a quiescent state (Fearns et al., 1994), this cannot be taken in consideration in the persistently infected immortalized macrophage culture described here because mRNA of RSV gene N was found in all RT-PCR determinations.

Persistence establishment and maintenance of RNA virus in cell cultures can occur through a variety of mechanisms. Among these are the generation of mutants or variants by changes in the viral genome (Ahmed and Chen, 1999; Bangham and Kirkwood, 1990; Villarreal et al., 2000), such as the production of DI (Bangham and Kirkwood, 1990). The participation of DI in the establishment of RSV persistence in the culture that we report is questionable; no DI were detected in the viral stock used to establish $M\phi_{\text{per}1}$. To the contrary, DI might be involved in the maintenance of $M\phi_{\text{per}}$ cultures; indeed, DI were present in $M\phi_{\text{per}1}$ after the eleventh passage, and then after all passages in $M\phi_{\text{per}}$ cultures. Therefore, it is possible that maintenance of RSV persistence was mediated by DI interference with infectious RSV. In contrast, in RSV persistently infected BS-C-1 cultures no DI were found (Pringle et al., 1978).

RSV persistently infected P388D₁ macrophage cultures are easily and reproducibly established; perhaps relatively nocytopathic variants might be selected rapidly. Studies to characterize RSV variants in supernatants obtained from $M\phi_{\text{per}2}$ are in progress.

Infection in vivo of macrophages by RSV is very probable, as studies in vivo and ex vivo have demonstrated that human (Midulla et al., 1993; Panuska et al., 1990a,b; Sone et al., 1997) and murine (Franke-Ullmann et al., 1994) macrophages and even a macrophage-like cell line (Sakai et al., 1997) are permissive to the virus. Moreover, RSV infection of macrophages has significant effects on cells, such as an increased

production of mediators with immunoregulatory activity (Becker et al., 1991; Midulla et al., 1993; Openshaw, 1995a; Panuska et al., 1990a,b) and a reduced phagocyte capacity (Franke-Ullmann et al., 1995). Recently, we documented the effect of viral persistence on the biological functions of M ϕ _{PER2}, expression of cellular genes (interleukines 1 and 6, tumor necrosis factor α , and Fc γ RII and Fc γ RIII receptor) and on its functions (phagocytosis) (Guerrero-Plata et al., 2001).

The culture we describe, i.e. long-term RSV persistently infected murine macrophage-like culture (M ϕ _{PER2}) in which virus-specific antigens were present in nearly 100% of cells without causing syncytia, provides an *in vitro* model for the study of the manner in which the macrophage and the virus interact, and the process of maintaining RSV persistence. Furthermore, the culture allows experiments using a cell type that has the property of disseminating the infection and facilitating experiments on the cellular aspects of immunity due to the availability of the wide array of cellular and humoral factors in the mouse.

Acknowledgements

We are grateful to Dr Andrés Castell-Rodríguez for excellent technical assistant and useful comments in area and perimeter determinations and to Dr Gustavo Pedraza-Alva for help with FACS analysis. We also thank Dr Carlos Arias-Ortiz for his critical reading of the manuscript and constructive discussions. This work was funded by grants from the Proyecto Universitario de Investigación en Salud (PUIS), the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and the Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA). Dr Beatriz Gómez was supported by a sabbatical grant from DGAPA

References

Ahmed, R., Chen, I., 1999. Persistent Viral Infections, John Wiley, UK.
 Ager, M.J., Rose, J.A., 1992. The biology of the macrophage. In: Lewis, C.E., McGee, J. (Eds.), The Macrophage IRL, Oxford University Press, Oxford, pp. 1-55.

Baldrige, P., Senterfit, L., 1976. Persistent infection of cells in culture by respiratory syncytial virus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 151, 684-688.
 Bangham, C., McMichael, A., 1986. Specific human cytotoxic T cell recognize B-cell lines persistently infected with respiratory syncytial virus. Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 9183-9187.
 Bangham, C.R., Kirkwood, T.B.L., 1990. Defective interfering particles: effects in modulating virus growth and persistence. Virology 179 (2), 821-826.
 Becker, S., Quay, J., Soukup, J., 1991. Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. J. Immunol. 147, 4307-4312.
 Cane, P.A., Pringle, C.R., 1991. Respiratory syncytial virus heterogeneity during an epidemic: analysis by limited nucleotide sequencing (SH gene) and restriction mapping (N gene). J. Gen. Virol. 72, 349-357.
 Chomezinski, P., Sacchi, N., 1987. Single step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156-159.
 Fears, R., Young, D.F., Randall, R.E., 1994. Evidence that the parainfluenza virus 5 can establish quiescent infections by remaining inactive in cytoplasmic inclusion bodies. J. Gen. Virol. 75 (12), 3525-3539.
 Fernie, B., Ford, E., Gorin, J., 1981. The development of a BALB/C cells persistently infected with respiratory syncytial virus: presence of ribonucleoprotein on cell surface. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 167, 83-86.
 Fisher, J.E., Johnson, J.E., Kuli-Zade, R.K., Johnson, T.R., Aung, S., Parker, R.A., Graham, B.S., 1997. Over expression of interleukin-4 delays virus clearance in mice infected with respiratory syncytial virus. J. Virol. 71 (11), 8672-8677.
 Franke-Ullmann, G., Freihorst, J., Steinmüller, C., Verhagen, W., Hockertz, S., Lohmann-Matthes, M.L., 1994. Interaction of alveolar macrophages and respiratory syncytial virus. J. Immunol. Methods 174, 173-184.
 Franke-Ullmann, G., Pförtner, C., Walter, P., Steinmüller, C., Lohmann-Matthes, M., Kobzik, L., Freihorst, J., 1995. Alteration of pulmonary macrophage function by respiratory syncytial virus infection *in vitro*. J. Immunol. 154, 268-280.
 Guerrero-Plata, A., Ortega, E., Gómez, B., 2001. Persistence of respiratory syncytial virus in macrophages alters phagocytosis and pro-inflammatory cytokine production. Viral Immunol. 14, 19-30.
 Hall, C.B., 1998. Respiratory syncytial virus. In: Feigen, R.D., Cherr, J.D., Fletcher, J. (Eds.), Textbook of Pediatric Infectious Diseases. W.B. Saunders Co, Philadelphia.
 Han, L.L., Alexander, J.P., Anderson, L.J., 1999. Respiratory syncytial virus pneumonia among the elderly: an assessment of disease burden. J. Infect. Dis. 179, 25-30.
 Iankevich, O., Preizner, R., 1977. Chronic infection of HeLa cells with respiratory syncytial virus. Vopr. Virusol. 2, 142-147.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

R.E. Sarmiento et al. / Virus Research 84 (2002) 45-58

- Koren, H.S., Handwerker, B.S., Wunderlich, J.R., 1975. Identification of macrophage-like characteristics in a cultured murine tumor line. *J. Immunol.* 114, 894-897.
- Midulla, F., Vallani, A., Panuska, J.R., Dab, I., Kolla, J.K., Merolla, R., Ronchetti, R., 1993. Respiratory syncytial virus lung infection in infants: immunoregulatory role of infected alveolar macrophages. *J. Infect. Dis.* 168, 1209-1213.
- Openshaw, P., 1995a. Immunopathological mechanisms in respiratory syncytial virus disease. *Springer Semin. Immunopathol.* 17, 187-201.
- Openshaw, P., 1995b. Immunity and immunopathology to respiratory syncytial viruses: the mouse model. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 152, S59-S562.
- Panuska, J.R., Cirino, N.M., Midulla, F., Despot, J.E., McFadden, E.R., Huang, Y.T., 1990a. Productive infection of isolated human alveolar macrophages by respiratory syncytial virus. *J. Clin. Invest.* 86, 113-119.
- Panuska, J.R., Midulla, F., Cirino, N.M., Villani, A., Gilbert, I.A., McFadden, E.R., Huang, Y.T., 1990b. Virus-induced alterations in macrophage production of tumor necrosis factor and prostaglandin E2. *Am. J. Physiol.* 259 (6), L396-L402.
- Panuska, J.R., Hertz, M., Taraf, H., Villani, A., Cirino, N.M., 1992. Respiratory syncytial virus infection of alveolar macrophages in adult transplant patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145, 934-939.
- Panuska, J.R., Merolla, R., Rebert, N.A., Hoffmann, S.P., Tsivitse, P., Cirino, N.M., Silverman, R.H., Rankin, J.A., 1995. Respiratory syncytial virus induces interleukin-10 by human alveolar macrophages. *J. Clin. Invest.* 96, 2445-2453.
- Parry, J.E., Shirodaria, P.V., Pringle, C.R., 1979. Pneumovirus: the cell surface of lytically and persistently infected cells. *J. Gen. Virol.* 44, 479-491.
- Payment, P., Trudel, M., 1993. *Methods and Techniques in Virology*. Marcel Dekker, New York, pp 36-37, 73-74.
- Pringle, C.R., Shirodaria, P.V., Cash, P., Chiawell, D.J., Malloy, P., 1978. Initiation and maintenance of persistent infection in cells in culture by respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 28, 199-211.
- Ralph, P., 1980. Functions of macrophage cell line. In: Van Furth, R. (Ed.), *Mononuclear Phagocytes*. Martinus Nijhoff, The Hague, pp. 439-445.
- Sakai, S., Ochiai, H., Kawamata, H., Kogure, T., Shimada, Y., Nakajima, K., Terawasa, K., 1997. Contribution of tumor necrosis factor and interleukin-1 alpha on the production of macrophage inflammatory protein-2 in response to respiratory syncytial virus infection in a murine macrophage cell line, RAW264.7. *J. Med. Virol.* 53, 145-149.
- Sarmiento, R.E., Tirado, R., Gómez, B., 1997. Reinfection induced increase of rubella persistently infected cells in a macrophage-like cell line. *Virus Res.* 50, 15-22.
- Simoes, E.A., 1999. Respiratory syncytial virus infection. *Lancet* 354, 847-852.
- Stadnik, A.W., Gillan, T., Anderson, R., 1997. Respiratory syncytial virus triggers synthesis of IL-6 in BALB/c mouse alveolar macrophages in the absence of virus replication. *Cell Immunol.* 176, 122-126.
- Treuhar, M.W., 1983. A colorimetric assay for quantification of defective interfering particles of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 64, 1301-1309.
- Sone, S., Tsutsumi, H., Takeuchi, R., Matsuda, K., Imai, S., Ogra, P.L., Chiba, S., 1997. Enhanced cytokine production by milk macrophages following infection with respiratory syncytial virus. *J. Leukoc. Biol.* 61, 630-636.
- Van Schaik, S.M., Welliver, R.C., Kimpen, J.L.L., 2000. Novel pathways in the pathogenesis of respiratory syncytial virus disease. *Pediatr. Pulmonol.* 30, 131-138.
- Villarreal, L.P., DeFillipis, V.R., Gottlieb, K.A., 2000. Acute and persistent viral strategies and their relationship to emerging disease. *Virology* 272, 1-6.
- Wayde, P.R., 1998. Respiratory syncytial virus (RSV) disease and prospects for its control. *Antiviral Res.* 39, 63-79.

85