



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

**MODULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO, EN
MACRÓFAGOS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS CON EL
VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO: MODELO *IN VITRO***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIOL. SANTIAGO OLIVARES CARLOS ALBERTO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. BEATRIZ GÓMEZ GARCÍA

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS:

A la UNAM por ser una maravillosa casa de estudios y brindar oportunidades de crecimiento y superación.

Al posgrado en ciencias biológicas de la UNAM, por fomentar la investigación en lo más valioso que tenemos: ¡La vida!

A los miembros del comité tutorial: Dra. Beatríz Gómez García, Dra. Victoria Chagoya de Sánchez y Dr. Eduardo Alberto García Zepeda, por su muy valioso apoyo, orientación y dirección durante la realización del proyecto.

Al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría y por el apoyo recibido a través del proyecto No. 78862.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), por el apoyo otorgado para la conclusión de estudios de posgrado (Clave: IN204007-3)

A la Dra. Beatriz Gómez García por abrirme las puertas de su laboratorio de manera incondicional, por apoyarme sobre todas las cosas en todo momento y por su entera e inmediata disponibilidad en el momento que lo requerí. ¡Muchas gracias doctora!

A todos y cada uno de los miembros del laboratorio por su compañerismo y profesionalismo que compartieron conmigo durante toda la estancia: Dra. Rosa Elena

Sarmiento Silva, Dra. Rocío Tirado Mendoza, M. en C. Yuko Nakamura López, Q.F.B.
Sergio Alpuche Lazcano, Biomed. Marlon de Ita, a la señora Consuelo y al señor Efrén.

De manera muy especial agradezco a los próximos doctores en ciencias biomédicas:
Jorge Gaona Bernal y Gerardo Arevillaga Boni, por ser no solo excelentes compañeros,
sino unos grandes amigos con los que he compartido más que ciencia.

Finalmente a DIOS por ¡haberme concedido la dicha de estar en este tiempo y en este
espacio para disfrutar la gran experiencia de vivir!

DEDICATORIAS:

A la mujer más importante en mi vida, que representa el principal motor para mis deseos
de superación y a quien le debo absolutamente todo: ¡Mi muñequita! Gracias por estar hoy
y siempre con tu maravillosa existencia y tu apoyo incondicional ¡TE AMO!

A mis hermanos Germán y Héctor, quienes me han brindado un gran apoyo durante mi
formación académica y personal y por estar siempre en los momentos difíciles. A mis
cuñadas: Mayra y Lucero, muchas gracias.

A mi segunda madre: Lupita por creer en mí y apoyarme siempre que lo he necesitado.

Al “viejito” por ser como un hijo para mí y por el cariño entrañable que nos une.

A todos mis tíos, pero en especial a Julio, Miguel, Manuel y Gustavo. A todos mis primos y mi sobrino Ángel. ¡A toda mi familia!

A mis grandes y apreciables amigos: Andrea, Rafael, Monkey, Hugo, Will, Toño, Eumir, Aldo, Bárbara y demás de la P7.

A mis estupendas amigas de la academia de ecología: Mary, Carmen y Paty.

A mis ex-compañeros y amigos del museo de la Luz: Quique, Cuauh, Yona, Bety y Adán.

¡A tod@s mis compañer@s con l@s que en algún momento compartí cosas maravillosas!

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
VIRUS SINCITIAL RESPIRATORIO (VSR)	4
INFECCIÓN Y RESPUESTA INMUNE	7
OXIDO NÍTRICO, FUNCIONES Y SÍNTESIS	8
EXPRESIÓN DE NOS II Y SU MODULACIÓN	11
ANTECEDENTES	12
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y MÉTODOS	15
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	41
PERSPECTIVAS	42
REFERENCIAS	43

RESUMEN

En el laboratorio disponemos de un modelo *in vitro* de infección persistente con el virus sincitial respiratorio (VSR) en una línea celular murina similar a macrófagos que permite investigar modificaciones en las funciones biológicas de la célula. Reportes previos, muestran que la infección viral en forma aguda, induce la producción de especies reactivas de oxígeno, en cambio la infección persistente no, por lo cual en el presente trabajo evaluamos el efecto de la persistencia viral, en la producción del óxido nítrico (NO). La producción de NO se determinó en forma indirecta a través de la reacción de Griess y de forma directa por citometría de flujo. Se evaluó la expresión de la sintasa constitutiva eNOS (NOS III) e inducible (NOS II) del NO mediante ensayos de inmunotransferencia y la expresión del ARNm de la NOS II fue determinada por RT-PCR punto final y por RT-PCR-Tiempo real. Por otra parte, se determinó la capacidad de los macrófagos infectados persistentemente con el VSR para producir NO como respuesta a una infección bacteriana. Los resultados muestran que a infección viral de macrófagos en forma aguda, induce un incremento en la producción de NO que se correlacionó con la expresión de la proteína NOS II y con su ARNm. Por otra parte la infección persistente también induce un incremento en la expresión del ARNm de la NOS II, sin embargo la proteína y los niveles del NO no se alteraron en comparación con macrófagos testigo. La expresión de la proteína NOS III presentó una disminución en los macrófagos infectados tanto en forma aguda como persistente con respecto a los macrófagos testigo. Adicionalmente se observó que los macrófagos infectados persistentemente con el VSR, no están incapacitados para producir NO en grandes cantidades, ya que responden de manera similar a los macrófagos testigo ante la infección bacteriana. Los resultados indican que la persistencia del VSR en macrófagos modula la síntesis del NO a través de interferir en la expresión de la NOS II a nivel

post-transcripcional, como una estrategia de evasión inmune y favorecer la sobrevivencia de la célula persistentemente infectada.

ABSTRACT

In the laboratory we have a *in vitro* model of respiratory syncytial virus (RSV) persistence in a murine macrophage like cell line that allows to investigate changes on cell activities by the continuous presence and expression of the virus. Previous reports show that acute infection induces reactive oxygen intermediates, in contrast virus persistent does not do it, therefore, in this work we decided to determine the effect of viral persistence in nitric oxygen (NO) production. Oxygen production was determined indirectly by Griess technique and directly through flow cytometry. The expression of constitutive NO synthase (NOS III) and inducible (NOS II) were determined through western blot assays and the mRNA of NOS II expression was determined by semi quantitative RT-PCR. NOS II mRNA expression was quantified by RT-PCR real time. Furthermore, the effect of bacterial infection, *Haemophilus influenzae* on the persistently infected macrophage capacity to produce NO was determined. The results show that acute infection of the macrophages increases NO production that observation agrees with the expression of NOS II and mRNA. Moreover, in persistent infected macrophages NOS II mRNA expression increases but protein synthesis and NO production are not altered. In acute or infected macrophage NOS III protein synthesis was reduced with respect to mock infected macrophages. Moreover, by bacterial infection NO production in persistently infected macrophages synthesize is similar as the obtained in mock infected macrophages. The results suggest that NO synthesis is post transcriptional interfered by RSV persistence in macrophages and suggest to be a cell strategy for evading the immune response and favors its survival.

Virus sincitial respiratorio (VSR)

El virus sincitial respiratorio (VSR), se aisló por primera vez en 1957 de un niño que padecía bronconeumonía (Chanock *et al.*, 1957), actualmente se considera el agente causal más importante de enfermedades del tracto respiratorio en infantes a nivel mundial (Openshaw, *et al.* 2005; Collins, *et al.* 2008). Prácticamente todos los niños menores de un año han padecido al menos una infección por este virus y aproximadamente el 50% han presentado dos infecciones en ese periodo, (Glezen *et al.*, 1986) no obstante, es importante mencionar que el número de infecciones que requieren hospitalización es menor al 2% (Openshaw, *et al.* 2005). La infección por el VSR, también es frecuente en adultos y provoca cuadros severos de enfermedad en el tracto respiratorio (Hall, *et al.* 2001; Hashem, *et al.* 2003).

El VSR es miembro de la familia *Paramixoviridae*, perteneciente al orden de los mononegavirales, su genoma esta constituido por ARN de cadena sencilla de polaridad negativa no segmentado, tiene un tamaño de 15.2 kb y consta de diez genes que codifican para 11 proteínas virales, de las cuales nueve son estructurales: N, P, M, SH, G, F, M2-1, M2-2 y L y dos no estructurales: NS1 y NS2. El material genético del virus, se encuentra en una nucleocápside helicoidal, formada por la nucleoproteína (N), que se asocia con la proteína L (polimerasa viral) y la fosfoproteína o proteína P; este complejo a su vez, esta rodeado por la proteína de matriz M, a través de la cual interacciona con la envoltura, donde están las proteínas virales de superficie F, G y SH, asociadas con lípidos típicos de la membrana celular (Fig. 1a) (Cowton *et al.*, 2006)

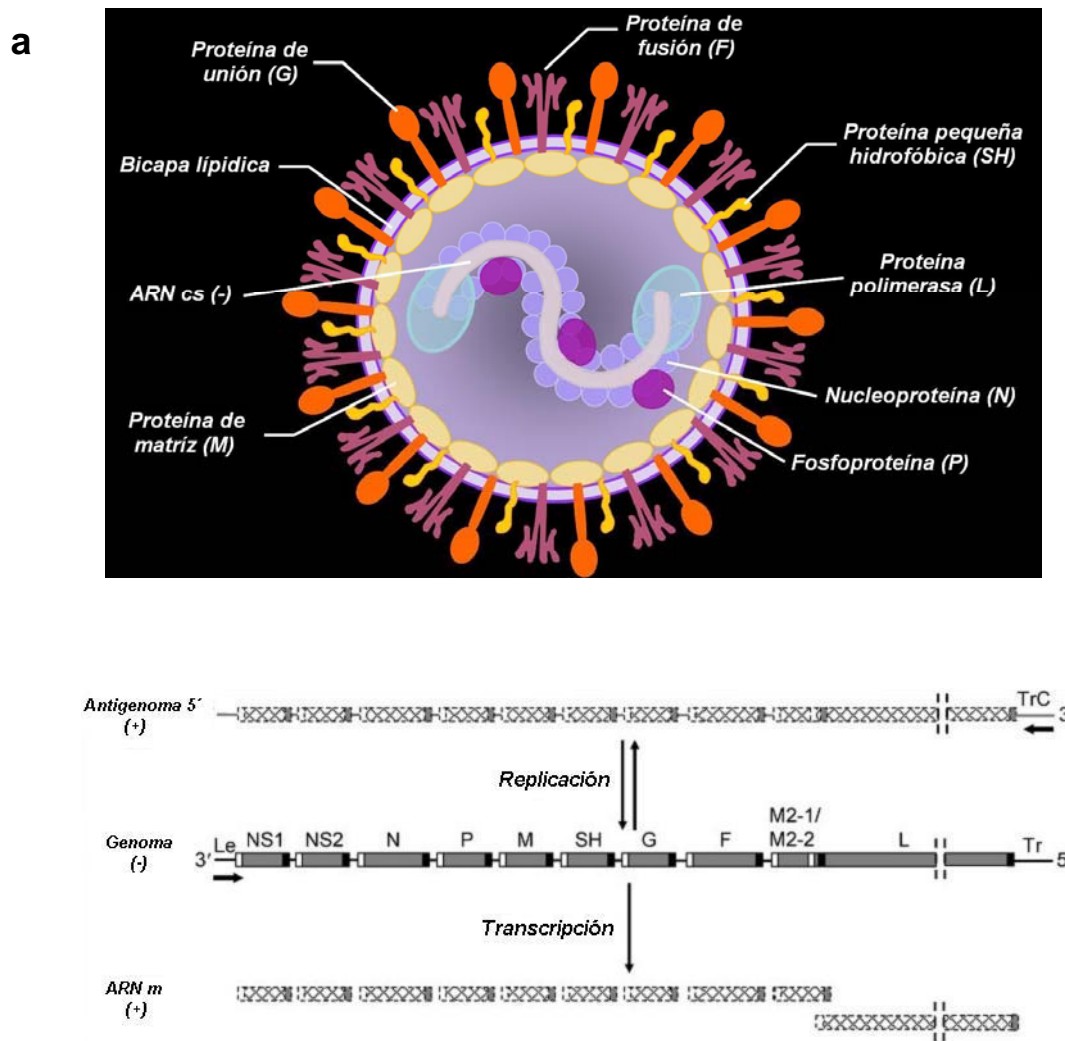


Figura. 1 Estructura del VSR. a) virión del VSR mostrando las principales proteínas estructurales. b) Representación esquemática de la organización del genoma viral, ilustrando el promotor de inicio de la transcripción (Le) y el promotor del inicio de la síntesis del genoma (TrC), así como el inicio (cajas blancas) y fin (cajas negras) de cada gene (Tomado y modificado de Cowton et al., 2006).

Los diez genes del VSR, están ordenados en el genoma de manera secuencial (Fig 1b) y cada uno está flanqueado por secuencias conservadas de inicio: GS (Gen Start) y término: GE (Gen End) de la transcripción, cada gene está separado por una región inter génica que no se transcribe de longitud que varia de 1 a 56 nucleótidos. El genoma viral sintetiza 11 ARN mensajeros, ya que el gene M-2 codifica para 2 proteínas diferentes. El genoma viral tiene una región líder de 44 nucleótidos (Le) en el extremo 3' y una región rica en uracilo al final de la región "Le", importantes para el inicio de la transcripción (Cowton et al. 2006).

Una vez iniciada la transcripción, esta progresa a lo largo del genoma hasta encontrar una señal GE, donde se realiza la poliadenilación y liberación del ARN mensajero, posterior a esto, la polimerasa sin disociarse del templado, reinicia la síntesis de ARN mensajero al identificar una nueva secuencia GS del siguiente gene (Cowton et al. 2006)

Debido a que solo existe un promotor para el inicio de la transcripción en todo el genoma viral, ubicado en el extremo 3' y que la polimerasa es susceptible a disociarse de su templado en las regiones ínter génicas es frecuente obtener un gradiente de expresión génica; en el que los genes codificados próximos a la región 3' del genoma, se transcriben en mayor proporción con respecto a los localizados próximos al extremo 5' (Cowton et al. 2006).

La replicación del genoma se inicia en el promotor que se encuentra dentro de la secuencia "Le" en el extremo 3', para replicar el genoma, la polimerasa inicia la síntesis del ARN ignorando las secuencias señal GS y GE, de esa manera se sintetiza un ARN de polaridad positiva (antigenoma) complementario al genoma viral (Cowton et al. 2006). El antigenoma, es ahora el templado para la síntesis del genoma; la polimerasa viral inicia la síntesis de ARN en el extremo 3' donde se encuentra una secuencia de 155 nucleótidos (TrC), que es el promotor para iniciar la síntesis de un ARN de sentido negativo (genoma) y lograr la multiplicación viral. A diferencia del ARNm que es liberado "desnudo", el ARN geonómico y antigenómico, se asocia con la nucleoproteína del virus (N), conforme se van sintetizando (Cowton et al. 2006)

Reportes sobre la replicación y la transcripción del virus, indican que la concentración de la proteína N, es un factor importante para determinar si la polimerasa viral genera ARNm o el antigenoma.

Infección e inducción de la respuesta inmune innata

El VSR infecta principalmente células epiteliales que recubren el tracto respiratorio, sin embargo se ha demostrado que también es capaz de infectar otras células como macrófagos y células NK (Midulla *et al.*, 1989; Guerrero-Plata *et al.*, 2006). La infección viral induce la producción y liberación de una gran variedad de quimiocinas, citocinas y mediadores de bajo peso molecular como: leucotrienos, óxido nítrico (NO) y prostaglandinas con efectos pro inflamatorios, antivirales e inmuno reguladores (Krishnan *et al.*, 2004).

En la etapa inicial de la infección viral, las proteínas de superficie del VSR, sobre todo la proteína G, se une a moléculas de glicosaminoglicanos localizadas en la membrana celular, que favorecen la unión del virión a la célula (Openshaw P., et al. 2005), una vez unido, la proteína F del VSR es capaz de activar una vía de señalización a través del receptor tipo toll cuatro (TLR4) en la célula hospedera y generar una respuesta mediada por el factor de transcripción kappa beta: NF-kB, (Kurt-jones *et al.*, 2000) estimulando la producción de citocinas de tipo pro inflamatorio (Haeberle *et al.*, 2002), ocasionando un cuadro clínico de inflamación y obstrucción de las vías aéreas.

Una vez que el genoma se encuentra dentro de la célula, induce una respuesta inmune de mayor magnitud que activa factores de transcripción como STAT y NF-kB, induciendo la expresión de quimiocinas (RANTES, MIP-1 α y IL-8), citocinas como IFN- α e IFN- β y otras moléculas como factores de respuesta a interferón (IRF), tipo 1 y 7 que participan en la respuesta antiviral (Liu *et al.*, 2004).

Por otra parte el ARN de doble cadena, generado como intermediario de la replicación viral, puede ser reconocido por otros receptores citoplásmicos como TLR3 y proteínas como la del gen inducible del ácido retinoico (RIG-1) que también participan en la

inducción de la respuesta inmune innata a través de la activación de NF- κ B (Rudd et al., 2005; Liu et al., 2007).

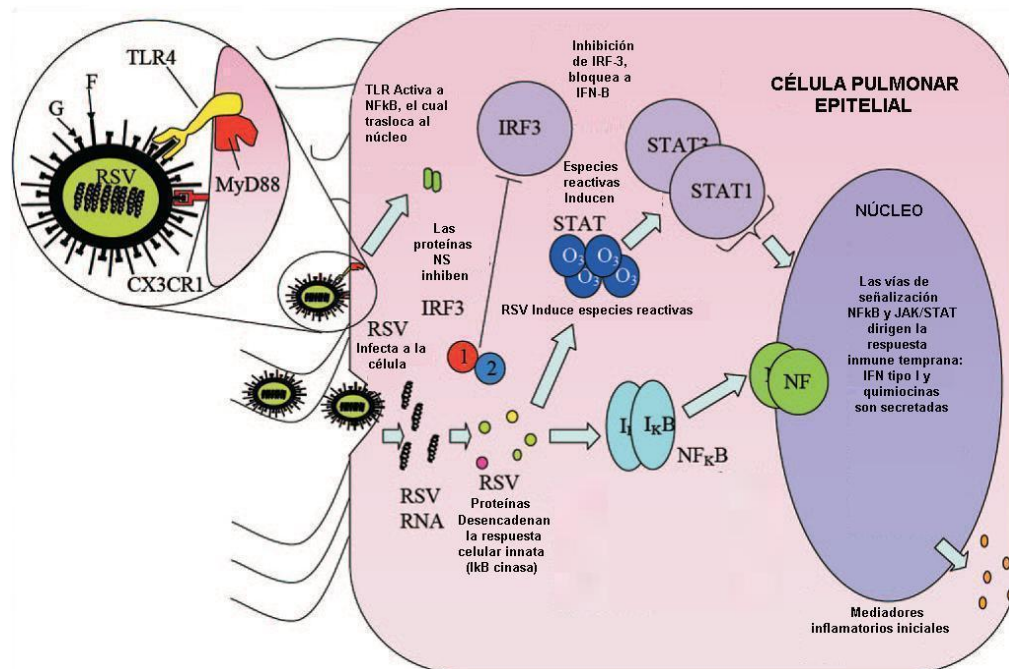


Figura 2. Infección con el VSR y respuesta inmune. La infección de células epiteliales con el VSR, induce la activación de la vía del factor de transcripción κ B, a través de receptores TLR. La expresión del genoma viral estimula la producción de especies reactivas de oxígeno, que activan las vías de factores de transcripción STAT, generando una respuesta inmune inicial de tipo inflamatorio. Las proteínas virales no estructurales inhiben la vía de respuesta a interferón tipo 3 (IRF-3) (Tomado y modificado de Openshaw *et al.*, 2005)

Uno de los principales productos microbicidas generados por la infección del VSR, es el NO (óxido nítrico) (Tsutsumi *et al.*, 1999; Kao *et al.*, 2001; Stark *et al.*, 2005) el cual tiene actividad antiviral directa contra el VSR, al inhibir su replicación en células infectadas (All-Ahmad *et al.*, 2003; Hobson *et al.*, 2008).

Óxido nítrico, funciones y síntesis

El NO, es un radical libre de vida corta, soluble en agua y lípidos, se difunde libremente desde el sitio de formación hasta el de acción. Dentro del marco de la respuesta inmune, el NO es un factor importante en la modulación de la actividad inmune, es

capaz de modificar el estado redox de la célula, alterando directamente la función de factores de transcripción como NF-kB y AP-1 (Martin *et al.*, 1997).

En células como macrófagos, linfocitos T y células NK, el NO afecta la producción de más de veinte citocinas que participan en la respuesta inmune como: IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α y TGF- β entre otros (Bogdan *et al.*, 2001).

Adicionalmente, el NO altera la nitrosilación de grupos alcohol, las funciones de proteínas, interfiere con la actividad enzimática, ya que interacciona con dominios de hierro (Fe) y azufre (S) de grupos hemo y puentes disulfuro respectivamente, promueve desaminación, rompimiento de ADN y apoptosis, así como daño oxidativo por la formación de especies reactivas de nitrógeno (Wu, 2001), que a su vez pueden actuar como moléculas de señalización celular.

La biosíntesis del NO, la realizan enzimas catalíticas, denominadas óxido nítrico sintasas (NOS), de las cuales se conocen tres subtipos, que presentan homología entre ellas del 50 al 60% (Aktan, 2004). La NOS I y III también denominadas sintasas constitutivas, se identificaron inicialmente en neuronas y endotelios respectivamente. La NOS II conocida como óxido nítrico sintasa inducible, se identificó en macrófagos de ratón (Mac Micking, 1997).

Las NOS constitutivas (I y III) se expresan constantemente en células en reposo, y se pueden activar por neurotransmisores, estimulación física, incrementos en los niveles de calcio, así como por citocinas y otros mediadores solubles (Tripathi *et al.*, 2007).

Las NOS I y III sintetizan NO en bajas concentraciones y cumplen con funciones fisiológicas como la relajación del músculo liso e inhibición de la agregación

plaquetaria, (Aktan, 2004). Por otra parte, la NOS II u óxido nítrico sintasa inducible, se expresa únicamente ante un estímulo, como la acción de citocinas pro inflamatorias, infecciones bacterianas o virales. Diferentes tipos de células como: endotelios, hepatocitos, monocitos, macrófagos y células NK, responden al estímulo produciendo altos niveles de NO (Aktan, 2004)

El NO, se sintetiza a partir de L-arginina y oxígeno molecular, por un proceso enzimático catalizado por la óxido nítrico sintasa, que utiliza electrones donados por nicotinamina adenina di-fosfato en forma reducida (NADPH). Una molécula de L-arginina, se oxida en dos ocasiones sucesivas para generar NO y L-citrulina, con la formación intermediaria de N-hidroxi-L-arginina (Aktan, 2004)

Las enzimas productoras de óxido nítrico, tienen dos dominios funcionales, uno con actividad de reductasa y otro con actividad de oxigenasa, con sitios de unión a factores y cofactores importantes para la actividad enzimática, el dominio de reductasa, comprende la región C-terminal, que contiene sitios de unión a calmodulina, NADPH, flavin adenina di nucleótido (FAD) y flavin mononucleotido (FMN), mientras que el dominio de oxigenasa, ubicado en la región N-terminal, presenta sitios de unión a un grupo Hemo, tetrahidrobiopterina (H4B) y L-arginina (Aktan, 2004). Fig 3.

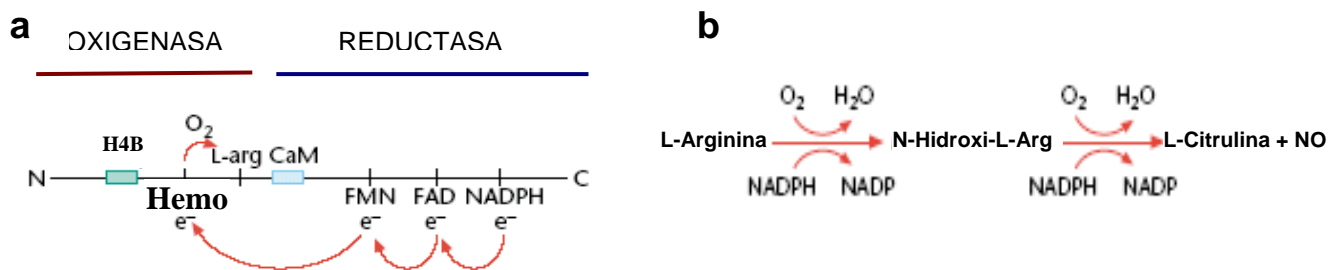


Figura. 3 (a) Estructura general de la óxido nítrico sintasa, mostrando los sitios de unión conservados para cofactores y sustratos, así como la transferencia de electrones del dominio de reductasa al dominio de oxigenasa. (b) Reacción general catalizada por la óxido nítrico sintasa para producir NO, a partir de dos oxidaciones sucesivas de L-arginina, formando como intermediario de la reacción a N-hidroxi-L-arginina. (Tomado y modificado de Kenneth, 2001)

Para que la NOS, se encuentre en forma activa, debe estar formando homo-dímeros, lo cual se logra por la unión a través de su dominio de oxigenasa, favorecido por la interacción del grupo hemo de cada monómero y estabilizado por el cofactor H4B (Aktan, 2004).

Expresión de NOS II y su modulación

Los estímulos y condiciones que determinan la expresión de la NOS II son particulares del tipo de célula y de la estirpe que se trate, sin embargo de manera general, lipopolisacáridos bacterianos, asbestos, citocinas como IFN-gamma, IL-1 β , IL-6, TNF- α entre otras, son capaces de inducir la expresión de la NOS II (Kleinert et al., 2003).

Los inductores de la expresión de NOS II, activan diferentes vías de señalización que conllevan a la translocación nuclear de varios factores de transcripción, claves en la expresión de NOS II. La región promotora de la NOS II murina, contiene sitios de unión para varios factores de transcripción y su expresión óptima depende de dos regiones reguladoras, la región proximal localizada entre las posiciones - 48 a -209 pb, que tiene sitios de unión a NF-kB y C/EBP, y la región distal localizada entre -913 y -1029, que tiene sitios de unión a los factores de transcripción NF-kB, STAT e IRF. La región distal cumple la función de incrementar la respuesta iniciada por la región proximal, en respuesta a estímulos como LPS o IFN- γ . La unión simultánea de todos los factores de transcripción mencionados, permiten el reclutamiento de coactivadores transcripcionales como CBP/p300 y la formación de un complejo transcripcional sinérgico, que promueve una expresión intensa y sostenida de la NOS II (Vila *et al.*, 2007)

El factor de transcripción NF-kB, es el principal inductor de la expresión de NOS II en células murinas (Goldring et al., 1996; Lowenstein et al., 1993; Xie et al., 1994), y

humanas (Marks-Konczalik et al., 1998; Taylor et al.,1998), por lo tanto este factor de transcripción es blanco tanto de activadores como de inhibidores de la expresión de NOS II (Ghosh et al., 1998).

Uno de los principales supresores de la expresión de NOS II en el sistema murino, es el TGF- β , que es capaz de inhibir la expresión de NOS II por varios mecanismos: Afecta la estabilidad del ARNm, inhibe la traducción del ARNm e induce inestabilidad a la enzima sintetizada (Vodovotz et al., 1993).

Adicionalmente otras citocinas inhibidoras de la síntesis del NO como: IL-4, IL-10 e IL-13, pueden actuar de manera sinérgica (Panuska *et al.*, 1995; Bogdan *et al.*, 2001).

ANTECEDENTES

El VSR infecta tanto células epiteliales como macrófagos, que participan de manera importante en la modulación de la respuesta inmune, por lo tanto la alteración en alguna de sus funciones compromete la eficiente resolución de la infección.

En la infección con el VSR, los macrófagos alveolares son el principal determinante en la respuesta inmune inicial, sin embargo su papel en la respuesta inmune adaptativa, esta limitado a la secreción de mediadores inflamatorios y a la expresión de moléculas co-estimuladoras (Pribul *et al.*, 2008).

Se ha observado que la infección de macrófagos alveolares con el VSR, induce una reducción en la producción de intermediarios reactivos de oxígeno, así como en la capacidad fagocítica y la eliminación de protozoarios, sin embargo también induce incremento en la producción de citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-6 (Ullmann *et al.*, 1995).

Por otra parte, en un estudio realizado por Panuska *et al.*, en 1995, muestra que la infección de macrófagos alveolares induce la expresión de IL-10, la cual tiene actividad moduladora, por lo que podría inhibir la expresión y acción de otras citocinas de tipo inflamatorio, impidiendo una respuesta inmune completa y efectiva. En un estudio similar se reporta que en macrófagos infectados se incrementa la expresión de otras moléculas inmuno supresoras como IL-11 y prostaglandina E2 (Bartz *et al.*, 2002).

En el modelo de infección persistente con el VSR, establecido y caracterizado en el laboratorio de la Dra. Gómez, se reporta que la continua presencia y expresión del genoma viral incrementa las actividades fagocíticas dependiente de receptores Fc γ RII

y RIII del macrófago, así como la producción de IL-1 β e IL-6 (Guerrero-Plata *et al.*, 2001), en este mismo modelo, se observó que la producción de quimiocinas como RANTES, MIP1- α , MIP1- β y MIP2 no se alteran, al igual que la producción de citocinas como IL-10 y TNF- α .

En experimentos preliminares se ha observado que la infección persistente no altera la producción de especies reactivas de oxígeno, mientras que la infección de macrófagos en forma aguda sí incrementa la producción de estas moléculas.

JUSTIFICACIÓN

La infección aguda y persistente del VSR altera las actividades biológicas del macrófago, como son fagocitosis mediada por anticuerpos, la producción de factores que modulan la respuesta inmune (Ullmann *et al.*, 1995; Guerrero-Plata *et al.*, 2001; Collins *et al.*, 2008), y la actividad bactericida (Raza *et al.*, 2000). Debido a que el óxido nítrico, es inducido por infección aguda con el VSR en células epiteliales y a que actúa como microbicida con actividad antiviral en la respuesta inmune, consideramos de interés evaluar la participación de la infección persistente del VSR en la producción de esta molécula, en una línea celular murina de macrófagos.

HIPÓTESIS

La persistencia del virus sincitial respiratorio en macrófagos inhibe la producción del óxido nítrico.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la persistencia viral en la producción del óxido nítrico, en macrófagos murinos persistentemente infectados con el VSR

Objetivos particulares

A) Evaluar la producción del óxido nítrico en el modelo de macrófagos infectados persistentemente con el virus sincitial respiratorio

B) Determinar la producción de óxido nítrico en el modelo de persistencia viral ante un estímulo bacteriano.

C) Evaluar los niveles de expresión del ARN y de proteína de las óxido nítrico sintasas inducible y constitutiva, en macrófagos infectados en forma aguda y persistente con el virus sincitial respiratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

LINEAS CELULARES

La línea celular murina P388D₁ (American Type Culture Collection ATCC: CCL-46), obtenida por Dawe y Potter (1957), derivada de un neoplasma linfoide inducido en ratón con metilcloroantreno, presenta características de macrófagos maduros y estables (Koren, *et al.* 1975). Los macrófagos persistentemente infectados con el virus sincitial respiratorio (MφP), se obtuvieron y caracterizaron en nuestro laboratorio (Sarmiento, *et al.* 2002). El porcentaje de células que expresan antígeno viral determinado por citometría de flujo varía entre el 92 y el 95% y el título de virus extracelular infectivo es de 10 a 100 TCID₅₀/ml.

Los cultivos celulares de MφN y MφP, se mantuvieron y se propagaron en medio RPMI 1640 (GIBCO/BRL, Grand Island, NY), suplementado con antibióticos (penicilina: 100 UI/ml y estreptomina: 100 mg/ml), 0.2 % de NaHCO₃, 10 mM de HEPES, 1x10⁻⁶ Molar de 2-mercaptoetanol y SFB al 5% v/v.

Tanto la línea celular epitelial humana HEp-2 (ATCC: CCL-23), que fue donada por el Dr. Aubrey Tingle (Research Center, University of Vancouver), así como la línea celular de fibroblastos de riñón de mono verde VERO (ATCC: CCL-81) se propagaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO/BRL Grand Island, NY), suplementado con antibióticos (penicilina: 100 UI/ml y estreptomina: 100 mg/ml), 0.2 % de NaHCO₃, 10 mM de HEPES, 2 mM de glutamina (Gibco) y SFB al 5% v/v.

VIRUS

El virus sincitial respiratorio de la cepa Long (ATCC, VR-26) utilizado en este trabajo, fue donado por el Dr. Michael Trudel (Institute Armand-Frappier, Montreal, Canadá). El

virus se propagó en la línea celular VERO y se determinó su infectividad, en la misma línea.

PROPAGACIÓN

Monocapas confluentes de células VERO, se infectaron a multiplicidad de infección (moi) de 1 con el VSR, en DMEM suplementado con SFB al 2.5%. Después de dos horas de adsorción a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ condiciones de incubación (CI), se retiró el sobrenadante; y se adicionó medio DMEM fresco suplementado con 2.5% de SFB y 2 mM de glutamina. Las células infectadas se mantuvieron en CI por 72 horas, posteriormente se colectó el sobrenadante y se sonicó durante 10 minutos en un sonicador ultrasonic cleaner (Mettler electronics). Los sobrenadantes se centrifugaron a baja velocidad (1500 rpm durante 10 minutos a 4°C) y se transfirieron a tubos nuevos. La infectividad viral se estabilizo añadiendo sulfato de magnesio a concentración final de 0.1 molar y finalmente las soluciones virales se distribuyeron en alícuotas conservándolas a -70°C hasta su utilización.

TITULACIÓN DE LA INFECTIVIDAD VIRAL

El virus obtenido por propagación, se diluyó 1:3 de manera serial, en medio DMEM y se determinó el título viral infectivo. La titulación se hizo en placas de 96 pozos con células VERO semiconfluentes. Para cada dilución se utilizaron 4 pozos con 50µl/pozo y la placa se incubó por dos horas para permitir la adsorción viral, posteriormente el medio se eliminó y a cada pozo se le añadieron 150µl de DMEM suplementado con 2.5% de SFB. La placa se incubó durante 72 horas mas y finalmente. El titulo viral infeccioso se calculó de acuerdo a la formula de Kärber, la cual se basa en el efecto citopático

observado y se expresa como dosis media infectiva por mililitro (TCID₅₀/ml) de acuerdo a Payment y Trudel (1993).

$$TCID_{50} = -\Delta + [-\delta(\Sigma - 1/2)]$$

Donde:

Δ es el log₁₀ de la última dilución con el 100% de los pozos con efecto citopático.

δ es el log₁₀ del factor de dilución.

Σ es la sumatoria de los pozos que presentan efecto citopático (expresado en fracciones), tomando en cuenta las siguientes diluciones: la dilución en la que el total de los pozos presenta efecto citopático (4/4) y hasta la primer dilución en la que ningún pozo presenta efecto citopático (0/4).

INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS EN FORMA AGUDA (M ϕ A)

Placas semi confluentes de M ϕ se infectaron con VSR a una multiplicidad de infección (moi) de 2 y se mantuvieron por dos horas en C.I. para permitir la adsorción viral. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se agregó medio RPMI fresco suplementado con 5% de SFB, a partir de este momento se comenzó a contar el tiempo para realizar las diferentes determinaciones efectuadas en el cultivo.

BACTERIAS

La bacteria gram negativa *Haemophilus influenzae* no tipificable (ATCC: 2019), se utilizó como inductor de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en macrófagos. La bacteria se obtuvo liofilizada, y se propagó en placas de agar-chocolate suplementadas con polienriquecimiento (Bioxon), a 37°C, en una atmósfera al 5% de CO₂ por 24 horas, antes de iniciar el ensayo correspondiente.

INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS CON *Haemophilus influenzae* no tipificable (HiNT)

Placas semi confluentes de M ϕ N, M ϕ A y M ϕ P se infectaron con HiNT a una moi de 10, utilizando como vehículo medio RPMI a 4°C. Posteriormente las placas se incubaron a 4°C por 15 minutos para permitir la unión de las bacterias a las células y una vez concluida la incubación, el sobrenadante se eliminó y se substituyó por medio RPMI al 2.5% de SFB a 37°C. Las placas se mantuvieron en C.I. por 24 horas, y se realizaron las determinaciones de nitritos y expresión de la óxido nítrico sintasa inducible NOS II.

DETECCIÓN DE ANTÍGENO VIRAL

La expresión de antígeno viral del VSR se determinó a través de citometría de flujo en los cultivos de M ϕ A y M ϕ P. 5×10^5 células, se colocaron en tubos Eppendorf® color ámbar de 1.5 ml. y se fijaron/permeabilizaron con acetona-metanol 1:1 (vol/vol) frío durante 30 segundos en agitación, posteriormente las células se centrifugaron a 2000 rpm/3 minutos y se resuspendieron en una solución de bloqueo inespecífica (PBS al 50% de SFB), en la cual se mantuvieron por 2 horas a 37°C en agitación constante. Las células se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en 500 μ l del anticuerpo policlonal: α -RSV conjugado con FITC (Chemicon, AB1128F), diluido en solución de bloqueo (1:450) manteniéndolas dos horas a 37°C, en agitación constante y protegidas de la luz. Después de centrifugar y resuspender las células en PBS, (varias veces de manera sucesiva, para eliminar el exceso de fluorescencia) se analizaron en el citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). Los resultados se procesaron con el software WinMDI 2.8 y representados gráficamente como porcentaje de células que expresan antígeno viral e intensidad media de fluorescencia.

DETERMINACIÓN DE NITRITOS

La producción de nitritos, se determinó a través de la reacción descrita originalmente por Griess en 1879 y de acuerdo a las instrucciones del Griess Reagent System (Promega, G2930). La reacción se hizo en una placa de 96 pozos fondo plano (Nunclon, Dinamarca). En cada pozo de la placa se incubaron 50 μ l de sobre nadantes provenientes de cultivos de M ϕ N, M ϕ A, y M ϕ P, mas 50 μ l de una solución de sulfanilamida (1% en una solución al 5% de ácido fosfórico) por 5 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Posteriormente se agregaron 50 μ l de la solución NED (naftil-etilen-diamina dihidrocloruro al 0.1%) a cada uno de los pozos y se incubaron nuevamente por 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente; la reacción de Griess generó un producto de color purpura/magenta, que se analizó en un lector de placas microplate espectrophotometer (BIO-RAD) a una longitud de onda de 535nm.

Cada determinación se hizo por triplicado; la concentración de nitritos totales de las muestras se calcularon utilizando una curva estándar obtenida a partir de diluciones seriales de una solución de nitrito de sodio 100 μ M que se hizo simultáneamente al momento de cuantificar la absorbancia de las muestras.

DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

La producción de óxido nítrico se determinó por citometría de flujo, empleando el reactivo Diaminofluoresceína-2/Diacetato (DAF-2/DA) de Sigma-Aldrich®. El reactivo DAF-2/DA entra a las células por difusión pasiva y al ser cortado por esterasas citoplásmicas reacciona con el óxido nítrico, generando una emisión de fluorescencia en longitud de onda de 515 nm.

La determinación se hizo con 5X10⁵ células con 1ml de medio RPMI suplementado con 5% de SFB, distribuidos en placas de 12 pozos fondo plano (Nunclon, Dinamarca).

Después de incubar por 24 horas en C.I. se retiró el sobrenadante y se adicionaron 500µl de una solución de DAF-2/DA 5µm, diluido en medio RPMI suplementado con 5% de SFB. Las placas se protegieron de la luz y se mantuvieron por 15 minutos en C.I., posteriormente se retiró el sobrenadante y las células se despegaron por pipeteo con un mililitro de de PBS estéril. Después de un par de centrifugaciones en tubos Eppendorf® ámbar de 1.5 ml a 1500rpm/3minutos, para eliminar el exceso de DAF-2/DA, las células se resuspendieron en 500µl de PBS estéril y se transfirieron a tubos Falcon de polipropileno para analizarse en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson) Los resultados obtenidos se graficaron con base a la intensidad media de fluorescencia y el análisis se realizo con el software WinMDI 2.8.

WESTERN BLOT

Los ensayos de inmunotransferencia se realizaron con extractos de proteína total de MφN, MφA y MφP, así como también con extractos de esos mismos cultivos infectados con HiNT. La extracción de la proteína total se llevo a cabo con el amortiguador de lisis RIPA, al cual se le adicionó por cada mililitro, 10 µl del inhibidor de proteasas de serina AEBSF (R&D Systems). De los extractos obtenidos, se cargaron 30µg de proteína total por carril en geles de poliacrilamida a una concentración del 10% y se separaron con una corriente de 90 voltios. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, de Amersham Pharmacia Biotech) en una cámara de transferencia semi seca durante 40minutos a 15 voltios. Una vez confirmada la transferencia, la membrana se trató con solución de bloqueo (PBS al 8% de leche descremada, libre de grasa) y mantenida en agitación constante por dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se lavó en agitación constante varias veces con solución de lavado (PBS al 0.1% de tween-20). La membrana se incubó posteriormente durante toda la noche en agitación constante a 4°C con uno de

los siguientes anticuerpos primarios policlonales (Santa Cruz Biotechnology) anti-GAPDH (sc-20357), anti-NOS II (sc-650) y anti-NOS III (sc-654), diluidos en la solución de bloqueo (1:200). Después de lavar la membrana varias veces, se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, acoplado a peroxidasa (ZyMED[®] laboratories Inc) IgG anti-conejo (81-6120) o IgG anti-cabra (61-1620), a una dilución (1:2500) en la solución de bloqueo. La membrana se mantuvo en agitación constante un par de horas a temperatura ambiente, posteriormente se lavo varias veces con la solución de lavado y se incubó con una solución de revelado (Tris-HCl 50mM pH 7.6, 0.06% diaminobencidina y 0.1% de peróxido de hidrógeno) durante 15 minutos en agitación constante a temperatura ambiente. Finalmente la membrana se lavó con agua varios minutos, y su imagen se visualizó en un transiluminador (BIO-RAD[®]). La imagen se analizó utilizando el software Quantity One de BIO-RAD[®] y los valores de densitometría se graficaron como nivel de expresión de la proteína.

RT-PCR, TRANSCRIPCIÓN REVERSA

La extracción de ARN total, se realizo mediante el método descrito por Chomezynski y Sacchi (1987), utilizando el reactivo TRIZOL[®] (Invitrogen).

El ADNc, fue sintetizado en un tubo eppendorf[®] de 0.6 ml, donde se adicionó 1 μ l de oligo-dT, 1 μ l de mezcla de dNTPs 10 mM, 2 μ g de ARN total y agua DEPC hasta obtener un volumen final de 13 μ l. El tubo se incubó a 65°C por 5 minutos e inmediatamente se transfirió a un baño con hielo. Posteriormente se agregaron 4 μ l de una solución amortiguadora de la reacción de transcripción 5X y 2 μ l de DTT 0.1 M. El tubo se incubó durante dos minutos a 42°C y se le agregó 1 μ l de la enzima transcriptasa reversa (SUPERSRIPT II), manteniéndolo a la misma temperatura por

50 minutos más. Finalmente la reacción se incubó a 70°C por 15 minutos y se amplificaron los segmentos de los genes de interés mediante PCR.

AMPLIFICACIÓN

Las amplificaciones se hicieron en tubos para PCR Axigen® de 0.2ml, adicionando lo siguiente a cada tubo: 5µl de solución amortiguadora 10X para PCR, 1.5 µl de MgCl₂ 50 mM, 1µl de mezcla de dNTPs 10 mM, 1µl de cada uno de los oligonucleotidos iniciadores 10 mM, 0.4 µl de Taq ADN polimerasa (5U/µl de Invitrogen®), 2 µl de ADNc y 38.1 µl de agua-DEPC. La reacción se llevó a cabo en un termociclador iCycler de BIO-RAD® bajo las siguientes condiciones:

- Una incubación inicial de 3 minutos a 95°C para desnaturalizar completamente el templado.
- 32 ciclos secuenciales de los pasos: A) 30 segundos a 95°C para desnaturalización, B) 30 segundos a 60°C para el alineamiento de los iniciadores de la NOS II; (30 segundos a 55°C para los iniciadores de GAPDH) y C) 40 segundos a 72°C para la extensión del producto.
- Una incubación final de 5 minutos a 72°C.

Los oligonucleótidos se diseñaron para amplificar un producto de 472 pares de bases del gen de la NOS II, que comprende la región entre los nucleótidos 3127 y 3599:

Sentido: 5'-**CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC**-3'
3127 3151

Antisentido: 5'-**GGCTGTCAGAGAGCCTCGTGGCTTTGG**-3'
3572 3599

Los resultados obtenidos se analizaron con el software Relative Quantitation (Applied Biosystems) y se graficaron como cantidad relativa de ARNm.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes, con sus correspondientes desviaciones estándar y diferencias entre tratamientos se consideraron significativas cuando se obtuvo una $p < 0.05$.

RESULTADOS

1) Determinación de la expresión de antígeno viral

Previamente a la realización de los experimentos se comprobó el porcentaje de células que expresan el antígeno del VSR en el modelo de infección aguda y persistente.

La determinación en la expresión del antígeno viral se realizó por citometría de flujo, con el anticuerpo α -RSV conjugado con FITC (Chemicon, AB1128F) y se efectuó de manera rutinaria a lo largo del estudio para comprobar las características del cultivo. El número de células que expresan antígeno viral en la población de macrófagos infectados en forma persistente ($M\phi P$) varía entre el 92 al 97%, en cambio en el cultivo infectado en forma aguda ($M\phi A$) este valor varía entre 30 a 35% (Fig. 1).

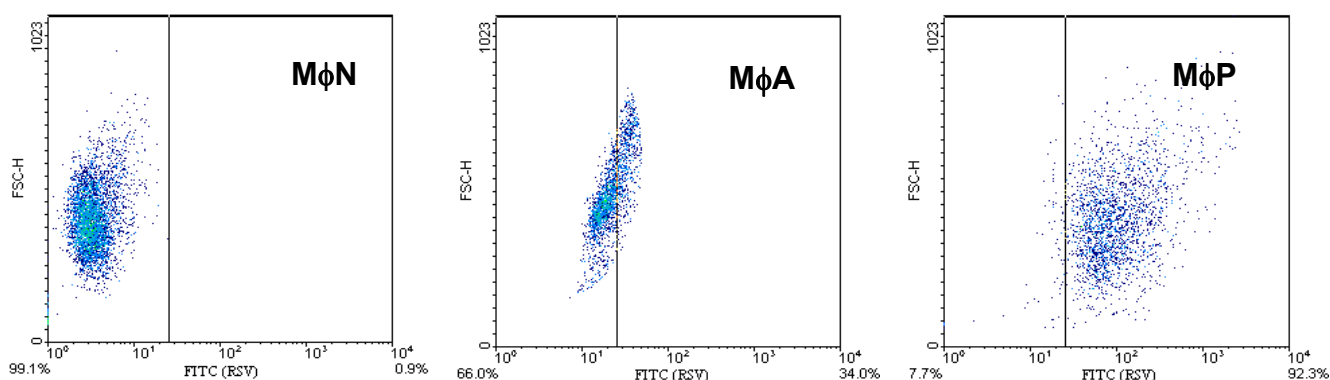


Figura 1. Expresión de antígeno del Virus Sincitial Respiratorio, en macrófagos con infección aguda ($M\phi A$) y macrófagos con infección viral persistente ($M\phi P$). La determinación se realizó en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). 24 horas posteriores a la absorción viral en $M\phi A$ y a 24 horas de cultivo de $M\phi N$ y $M\phi P$. Se presenta el porcentaje de células positivas al antígeno viral, en cada uno de los cultivos.

2) Determinación de la producción de óxido nítrico

Inicialmente, la determinación del NO se realizó en forma indirecta, debido a que el NO es un compuesto muy reactivo de vida media corta. Se cuantificó la concentración de nitritos presentes en los sobrenadantes de cultivos de macrófagos testigo ($M\phi N$), infectados con el VSR en forma aguda ($M\phi A$) y persistente ($M\phi P$), mediante la reacción de Griess.

La determinación de nitritos se hizo a diferentes tiempos post-infección a partir de las dos horas y la última determinación se realizó a las 24 horas. Determinaciones posteriores no se hicieron puesto que el estrés oxidativo generado por la infección, puede inducir apoptosis o necrosis que definitivamente alteraría nuestros resultados.

Los resultados muestran que la infección de macrófagos en forma aguda ($M\phi A$) con el VSR a una moi de 2, induce 120% de incremento en la concentración total de nitritos respecto a la obtenida en macrófagos testigo ($M\phi N$). Estos resultados son evidentes en la determinación realizada 24 horas post-infección (Figura 3).

Por otra parte en nuestro modelo de infección viral persistente ($M\phi P$) la concentración de nitritos a lo largo del estudio fue similar a la de macrófagos testigo ($M\phi N$) (Fig 2), lo cual difiere de manera importante con los resultados obtenidos en el modelo de infección aguda.

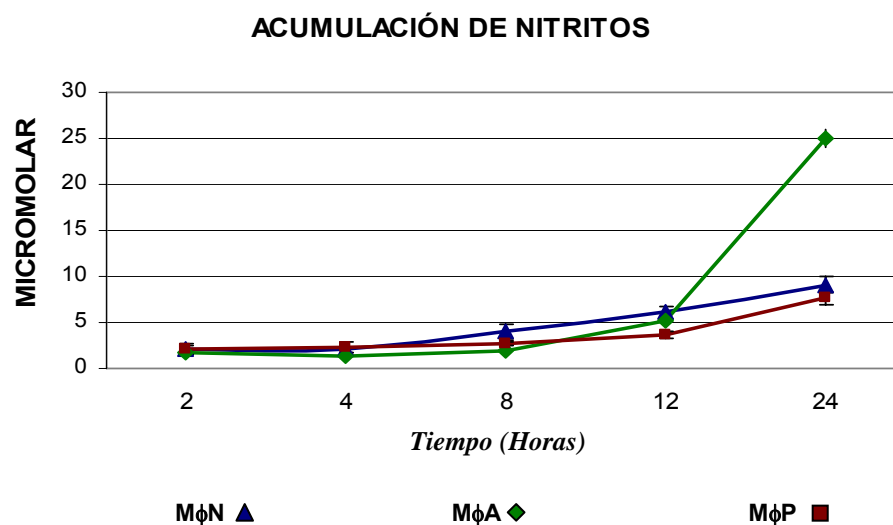


Figura 2. Determinación de la producción de nitritos, en macrófagos testigo ($M\phi N$), infectados con el virus sincitial respiratorio en forma aguda ($M\phi A$) y en forma persistente ($M\phi P$) a diferentes tiempos de cultivo.

Posteriormente, se realizó una determinación directa a través de citometría de flujo, en macrófagos infectados en forma aguda (24 horas post-infección), $M\phi P$ y $M\phi N$. La infección viral en forma aguda indujo un incremento en la producción de NO superior al 100% con respecto a los macrófagos testigo ($M\phi N$) (Fig 3). En cambio la infección viral

persistente (M ϕ P) no induce incremento en la producción de NO, con respecto a los macrófagos testigo, confirmando los resultados obtenidos en la determinación de nitritos. (Fig. 2).

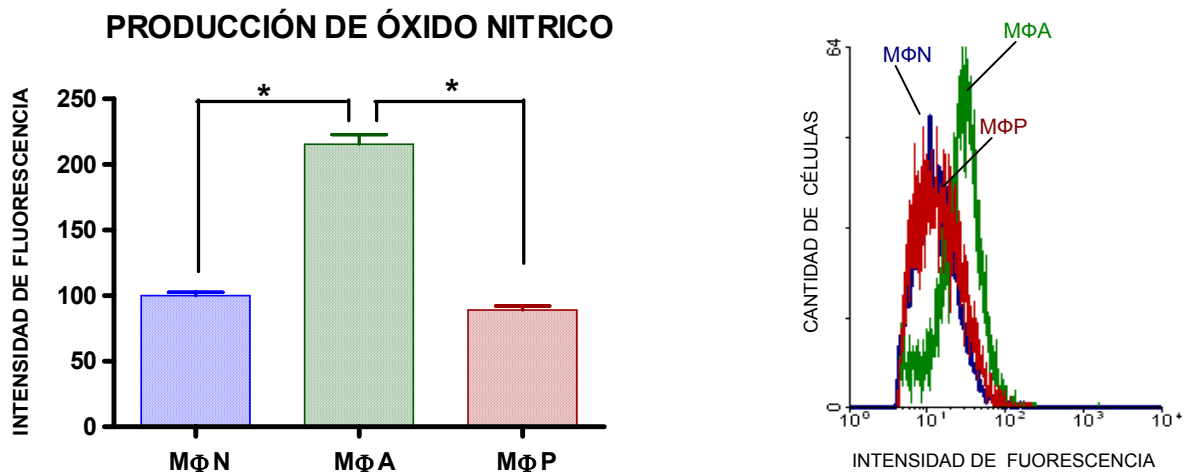


Figura 3. Determinación de la producción de óxido nítrico en macrófagos, por citometría de flujo: Macrófagos testigo (M ϕ N), macrófagos infectados con el virus sincitial respiratorio en forma persistente (M ϕ P) y en forma aguda (M ϕ A) a 24 horas de cultivo. Se obtuvo una diferencia significativa en M ϕ N y M ϕ P con respecto a M ϕ A ($p < 0.05$), en cambio no hubo diferencias significativas entre M ϕ N y M ϕ P.

Los resultados obtenidos sugieren que la continua presencia del VSR modula la producción de ON, por lo tanto procedimos a determinar si la persistencia viral impedía la capacidad del macrófago de producir ON. Evaluamos la respuesta de los macrófagos a agentes reportados como excelentes inductores de la producción del NO: lipopolisacrido bacteriano (LPS) y la bacteria gram negativa *Haemophilus influenzae* no tipificable (HiNT). La concentración de nitritos en los sobrenadantes de los cultivos se cuantificó por medio de la reacción de Griess (Fig 4).

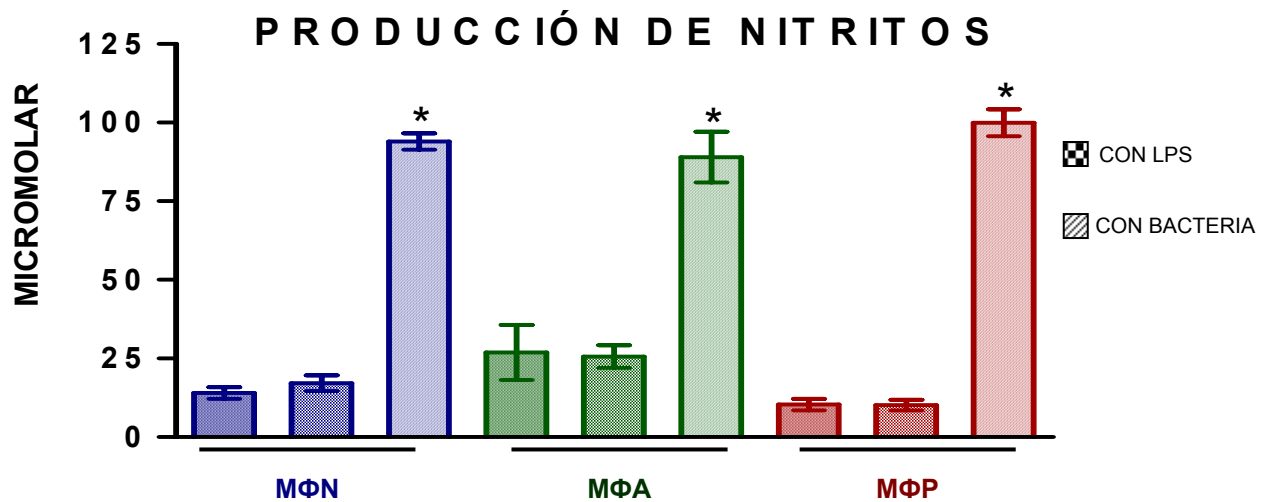


Fig 4. Determinación de la respuesta de macrófagos testigo (MφN) e infectados en forma aguda (MφA) y persistente (MφP) con el VSR, a la estimulación por lipopolisacárido bacteriano (LPS) y la bacteria *Haemophilus influenzae* no tipificable (B). La concentración de nitritos en sobrenadantes de cultivos se determinó por la reacción de Griess a 24 horas de cultivo. Las diferencias significativas entre tratamientos de MφN, MφA y MφP, se denotan con * ($p < 0.05$).

El estímulo con LPS no incrementó significativamente la producción del NO (Fig. 4), en cambio la infección con la bacteria *Haemophilus influenzae* no tipificable (HiNT) si indujo un incremento importante en la producción de NO. Esta observación indica que los macrófagos persistentemente infectados con el VSR responden ante un estímulo bacteriano sintetizando NO en cantidades similares a los macrófagos testigo.

3) Expresión de las proteínas NOS II y NOS III

Una vez establecido lo anterior decidimos evaluar si la incapacidad de sintetizar NO observada en el cultivo persistente, por la sola presencia del virus se relacionaba con alguna alteración en la expresión de las óxido nítrico sintasas constitutiva (NOS III) e inducible (NOS II). Para esto se determinó por ensayos de Western blot la concentración de ambas enzimas en MφN MφA y MφP.



DENSITOMETRÍA DE NOS III

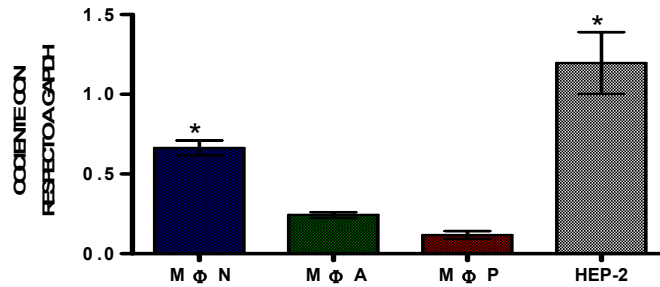


Figura 5. Western blot de la proteína NOS III, en cultivos de macrófagos testigo (MφN), macrófagos infectados en forma aguda (MφA) y macrófagos infectados persistentemente (MφP) con el virus sincitial respiratorio, así como en células HEP-2 (utilizadas como control positivo). Los MφA y MφP, presentaron diferencias significativas con respecto a MφN y a HEP-2 ($p < 0.05$), mientras que no hubo diferencias significativas entre MφN y HEP-2.

La determinación en la expresión de la enzima constitutiva (NOS III) por Western blot mostró que los macrófagos testigo presentan niveles bajos de expresión con respecto a las células epiteliales humanas HEP-2, utilizadas como control positivo, mientras que los macrófagos infectados en forma aguda y persistente presentan una disminución mayor en la expresión de la enzima (Fig 5).

Los resultados sugieren que la infección viral abate la expresión de la NOS III, sin embargo la producción de nitritos en MφA claramente se incrementa después de las 12 horas post-infección (Fig 2). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la NOS III no participa al menos de manera directa en el incremento de la producción de NO y que por lo tanto dicho incremento se da a través de la enzima inducible (NOS II). Si esto es así, entonces la expresión de dicha enzima se encontraría alterada en los macrófagos con infección viral persistente, impidiendo una síntesis de NO similar a la observada en la infección aguda.

Los ensayos de inmunotransferencia para determinar la expresión de NOS II, se realizaron a diferentes tiempos post-infección, en M ϕ A y a los mismos tiempos post-cultivo en M ϕ N y M ϕ P (Fig 6).

Como se observa, la expresión de NOS II presenta un incremento dependiente del tiempo a partir de las cuatro horas post-infección en M ϕ A, y a las 24 horas el factor de incremento es de 20 con respecto a los macrófagos testigo. Estos resultados indican que el incremento en la producción de NO por la infección aguda se debe a un incremento en la expresión de la NOS II. Por otra parte, la infección persistente en macrófagos, induce solo un ligero incremento en la expresión de NOS II (Factor de 2 a 24 horas post-cultivo), sin embargo esto no se ve reflejado en la producción de NO, ya que esta no cambia con respecto a M ϕ N (Fig. 2 y 3).

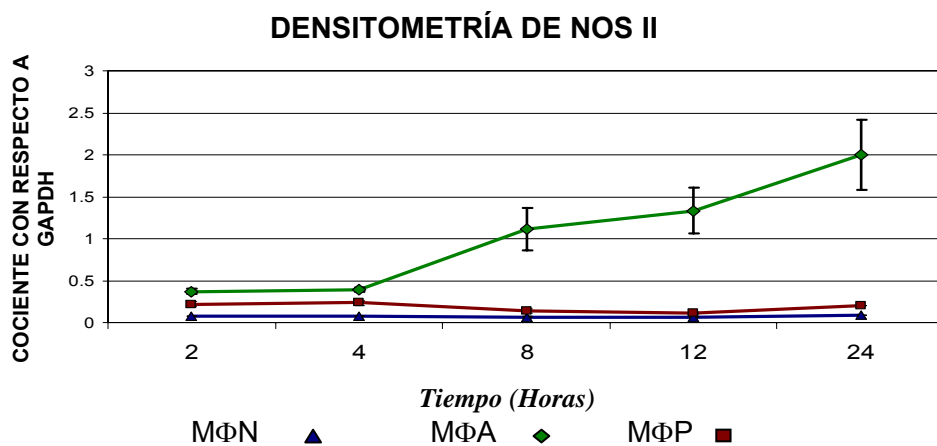
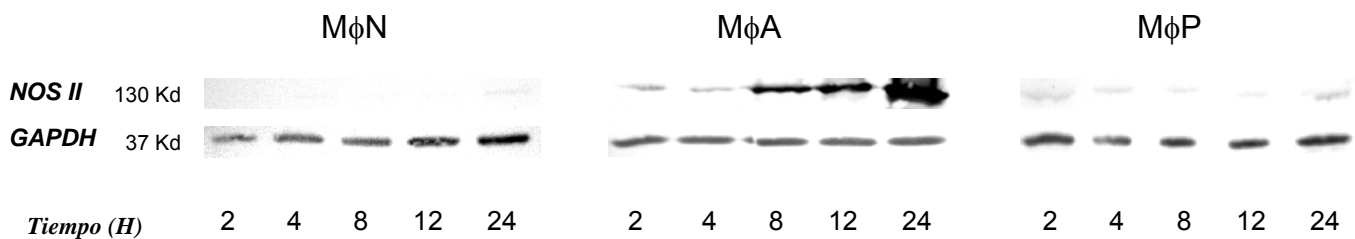


Figura 6. Análisis de la expresión de NOS II por western blot, en macrófagos testigo (M ϕ N), macrófagos infectados en forma aguda (M ϕ A) y macrófagos infectados persistentemente (M ϕ P) con el virus sincitial respiratorio. Las determinaciones se hicieron a 2, 4, 8, 12 y 24 horas posteriores al inicio de la infección aguda y a los mismos tiempos de iniciado el cultivo en el caso de los M ϕ N y M ϕ P.

Para determinar si el incremento en la producción de NO (observado en macrófagos por la infección con HiNT) (Fig 4) está relacionado con la expresión de la enzima NOS II, se realizaron ensayos de inmunotransferencia en M ϕ N, M ϕ A y M ϕ P infectados con HiNT (Fig 7).

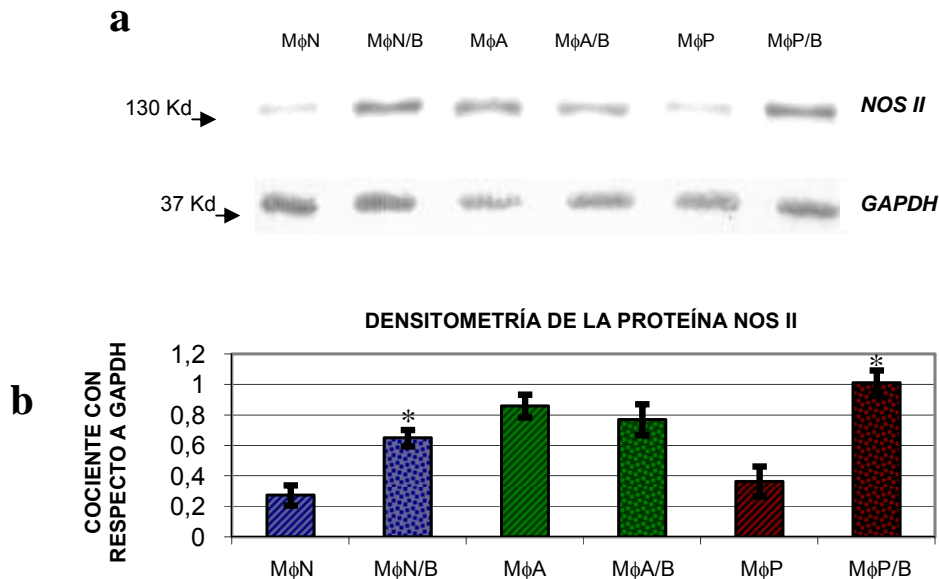


Fig 7. Expresión de la proteína NOS II por infección bacteriana. a) Western blot de la proteína NOS II. Macrófagos testigo (M ϕ N); infectados con la bacteria *Haemophilus influenzae* no tipificable (M ϕ N/B); infectados en forma aguda con el VSR (M ϕ A); más bacteria (M ϕ A/B); infectados persistentemente con el VSR (M ϕ P), más bacteria (M ϕ P/B). b) Expresión de NOS II, normalizado con respecto a GAPDH y en función de valores densitométricos. Las diferencias significativas entre tratamientos se denotan con * ($p < 0.05$).

Los resultados muestran que la infección bacteriana estimula la síntesis de la NOSII en M ϕ N, así como también en M ϕ P, sugiriendo que el incremento en la producción de nitritos observada por la infección de HiNT (Fig. 4) se debe a la actividad de NOS II. Estos resultados sugieren que la infección persistente con el VSR no induce la expresión de la NOS II, sin embargo la enzima es funcional en el sistema y se puede inducir por un estímulo bacteriano para producir grandes cantidades de NO.

4) Determinación del ARNm de NOS II por RT-PCR punto final

Con base en los resultados obtenidos se decidió evaluar el papel de la infección viral persistente en la expresión de NOS II a nivel transcripcional, para lo cual, se determinó la expresión del ARNm por medio de ensayos de RT-PCR punto final (Fig 8)

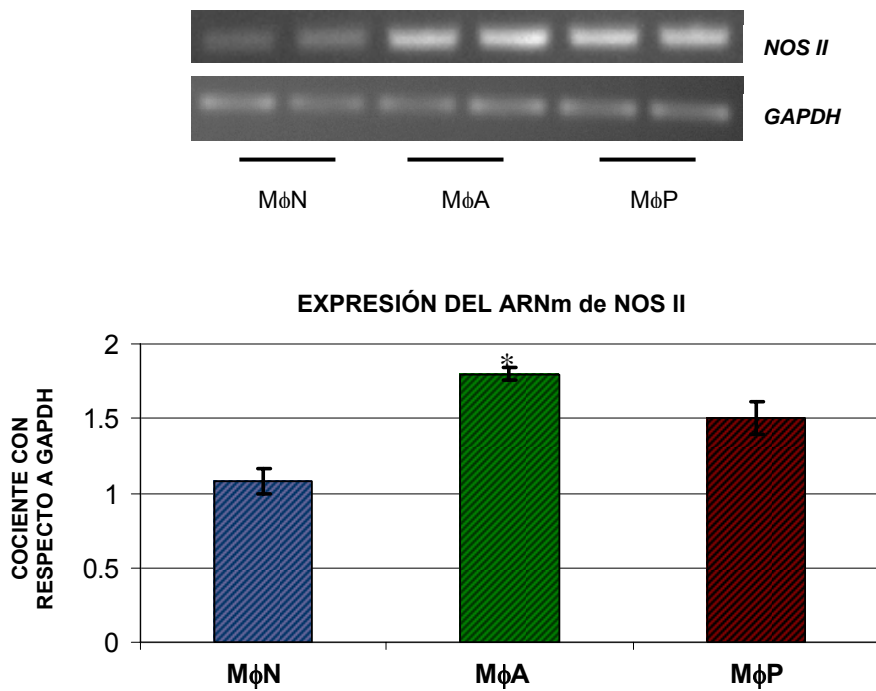


Figura 8. Expresión del ARNm de la NOS II. La determinación, se realizó por RT-PCR punto final, en dos diferentes pases de cultivo. Macrófagos testigo (MφN), macrófagos infectados en forma aguda (MφA) y persistente (MφP) con el VSR. Solo hubo diferencia significativa entre MφA y MφN. ($p < 0.05$)

Los macrófagos infectados con el VSR en forma aguda y persistente presentaron incremento en el nivel de expresión del ARNm de la sintasa NOS II, en comparación con los macrófagos testigo.

Para cuantificar el fenómeno observado se realizaron ensayos de RT-PCR-tiempo real, que permite determinar con mayor precisión la magnitud de la inducción y el nivel de expresión del ARNm de la sintasa NOS II por la presencia del VSR (Fig 9).

5) Determinación del ARNm de NOS II por RT-PCR tiempo real

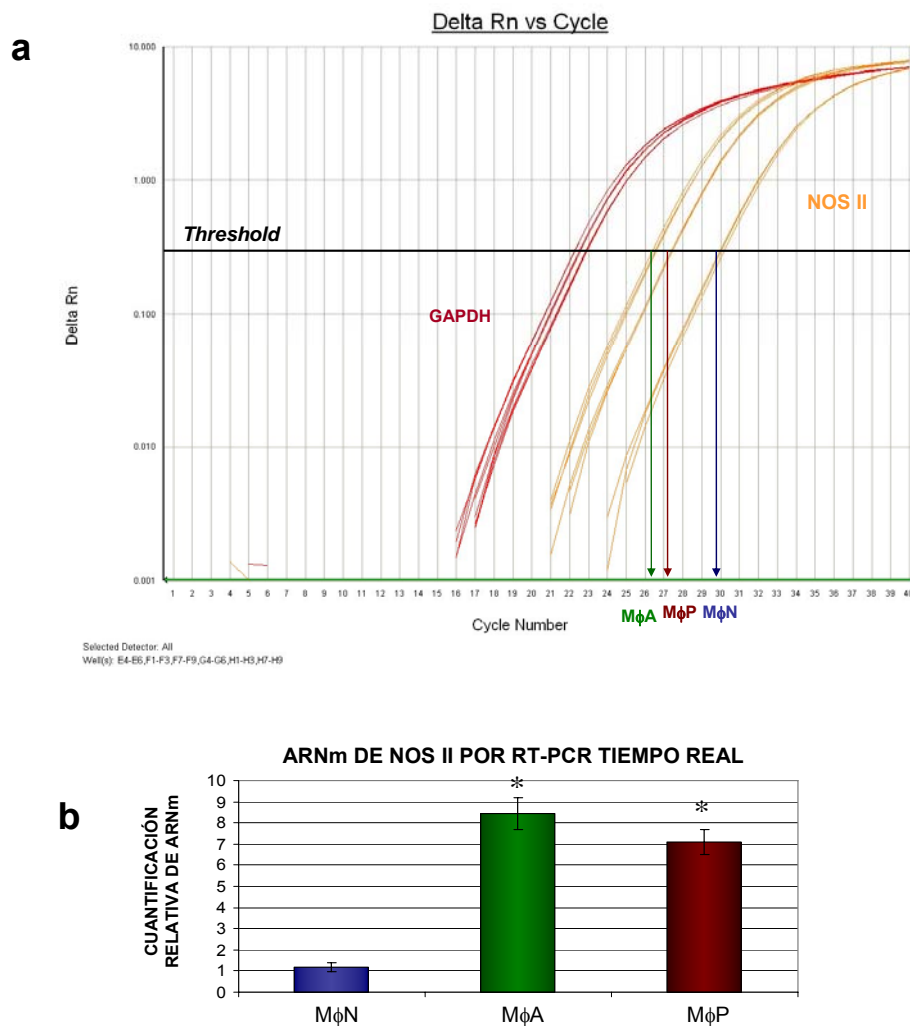


Figura 9. Expresión del ARNm de la NOS II, por PCR tiempo real. (a). Curvas de amplificación de GAPDH y NOS II. Macrófagos testigo (MφN), macrófagos infectados en forma aguda (MφA) y en forma persistente (MφP) con el RSV. (b) Niveles de expresión del ARNm de NOS II, normalizados con GAPDH. Las diferencias significativas con respecto a MφN, se denotan con * ($p < 0.05$).

Los resultados muestran claramente que la infección viral en forma persistente, incrementa la expresión del ARNm de la NOS II de manera similar a la observada en la infección aguda, no obstante la producción de NO es igual a la de macrófagos testigo (Fig. 3). Por otra en MφP la expresión de la proteína NOS II no parece incrementarse en la misma magnitud en la que se incrementa su ARNm, ya que se observa solo un ligero incremento en su expresión con respecto a los macrófagos testigo (Fig 5). En función de los resultados obtenidos se sugiere que la presencia y expresión continua

del genoma viral en el macrófago modula la transcripción y la traducción de la NOS II impidiendo la producción de NO como respuesta a la infección persistente.

DISCUSIÓN

El VSR ocasiona enfermedades de las vías respiratorias asociadas con problemas posteriores de inflamación que originan cuadros de alergia y de bronquitis crónica, lo cual se ha relacionado con una posible persistencia del virus en el organismo. El VSR infecta principalmente células epiteliales del tracto respiratorio, sin embargo, se ha observado que también es capaz de infectar otras células como dendríticas y macrófagos, alterando sus funciones principales (Franke, *et al.* 1994; Ullmann, *et al.* 1995; Jones *et al.*, 2006).

En el laboratorio disponemos de un modelo *in vitro* de persistencia del VSR en macrófagos murinos y hemos observado que la persistencia viral altera funciones del macrófago, como son la fagocitosis mediada por anticuerpos y la síntesis de factores involucrados en la respuesta inmune (Guerrero-Plata *et al.*, 2001, Tirado *et al.*, 2005). Sin embargo, el efecto de la persistencia viral en la producción del NO, no se ha estudiado a pesar de considerársele mediador fundamental de la respuesta inmune en las vías áreas (Bingisser *et al.*, 2001).

En este trabajo evaluamos comparativamente la capacidad de producir NO de un cultivo de macrófagos infectados con el VSR en forma aguda con uno infectado en forma persistente.

Durante la infección de macrófagos en forma aguda, se observó que la cantidad de células positivas a la infección osciló entre el 30 y el 35% de la población total (Fig 1).

Estudios realizados por diferentes grupos muestran que es difícil infectar más del 40% de una población de macrófagos mediante infección aguda con el VSR, incluso utilizando una *moi* de 5 (Ullmann, *et al.* 1995), y se ha sugerido que la resistencia que presentan las células a la infección se asocia a un mayor estado de diferenciación. (Dakhama *et al.*, 1998). En nuestro estudio, utilizamos una línea celular diferenciada con características de macrófago bien establecidas, lo cual puede influir en que solo una fracción de la población de macrófagos fue susceptible a la infección viral.

En el presente trabajo, se demostró que la infección de macrófagos en forma aguda con el VSR es capaz de inducir un incremento en la producción de nitritos, a partir de las 12 horas post-infección (Fig 2). En contraste, otros estudios realizados en células epiteliales muestran que la infección con el VSR por sí sola no induce incremento en la producción de NO, aunque si se estimulan a las células al mismo tiempo con citocinas tipo Th1, se induce la producción de NO 48 horas post-infección (Tsutsumi *et al.*, 1999). Otro estudio mostró que la infección de células epiteliales con VSR purificado induce solo un ligero incremento en la producción de NO y este incremento se detectó hasta 72 horas post-infección. Estos datos sugieren que la habilidad del VSR para inducir la producción de NO depende más de las citocinas secretadas por las células infectadas que de un efecto estimulador directo del virus (Hacking, 2002).

En el presente trabajo el virus que utilizamos para la infección aguda no se purificó y cabe la posibilidad que citocinas producidas por las células HEP-2 durante el proceso de propagación viral participen en la inducción de NO observada en la infección aguda de los macrófagos. Adicionalmente, otros investigadores han propuesto que la producción de NO como respuesta a la infección por VSR depende de la *moi* a la que se infecta y de la replicación viral (Kao *et al.*, 2001).

En nuestro caso la replicación viral no se determinó en los cultivos de macrófagos infectados en forma aguda ni persistente, sin embargo antecedentes del laboratorio indican que la replicación viral en el cultivo infectado persistentemente es muy baja, ya que al titular el sobrenadante, se han encontrado 100 TCID₅₀/ml (Sarmiento *et al.*, 2002).

Por otra parte existen estudios que sugieren que la respuesta a la infección del VSR depende del tipo celular infectado, por ejemplo la activación de factores de transcripción y expresión de genes inducibles en células epiteliales requiere una replicación viral activa (Garofalo *et al.*, 1999; Kao *et al.*, 2001), mientras que en otros tipos celulares como macrófagos la sola unión del virus o de proteínas virales de superficie es suficiente para generar una respuesta a través del factor nuclear de transcripción kB, así como la producción de citocinas y quimiocinas (Becker *et al.*, 1991; Kurt-Jones *et al.*, 2000).

Para determinar de una manera mas especifica la producción de NO como respuesta a la infección viral, se utilizó el reactivo Diamofluoresceina-2/diacetato (DAF-2/DA), el cual es permeable a la membrana celular y es capaz de emitir fluorescencia funcionando como un indicador directo del NO en tiempo real (Kojima *et al.*, 1997; López-Figueroa *et al.*, 2000; Strijdom *et al.*, 2004). La determinación se realizó por citometría de flujo y los resultados obtenidos confirmaron lo observado mediante la determinación de nitritos. Debido a que la infección persistente al parecer no indujo incremento en la producción de NO (Fig. 3), se sugirió que la continua presencia del virus podría haber incapacitado a la célula para producir NO, por lo que se realizaron ensayos de estimulación con LPS para evaluar la capacidad de producción de NO por parte del cultivo infectado persistentemente con el VSR. De manera inesperada, la

estimulación con LPS no indujo incremento significativo en la producción de NO ni siquiera en macrófagos testigo (Fig. 4), por lo que se utilizó como inductor a la bacteria gram negativa *Haemophilus influenzae*.

La línea celular murina P388D₁ que se utilizó como modelo de estudio y sobre la cual se indujo la persistencia es posible se encuentre en un estado de tolerancia a LPS, dicho estado de tolerancia se puede generar *in vitro* al estimular los macrófagos con una dosis baja de LPS por un tiempo prolongado y en un segundo estímulo a una dosis mayor, la respuesta generada es mínima. Aunque en nuestro estudio no se realizó una estimulación previa con LPS para propiciar un estado de tolerancia, la línea celular produce de manera constitutiva interleucina 1- β (IL-1 β), la cual puede provocar dicho estado para el LPS, puesto que IL-1 β y LPS comparten las mismas vías de transducción de señales.

Los resultados mostraron que el establecimiento de la infección viral persistente no incapacitó a los macrófagos para producir NO ante un estímulo secundario. Al parecer la vía de señalización para la producción de NO activada por receptores en nuestro modelo de macrófagos murinos no es eficiente, sin embargo el estímulo que provocó un microorganismo completo como la bacteria HiNT resultó excelente para inducir la producción de NO, posiblemente por la activación de otras vías de señalización asociadas al proceso de fagocitosis (Forman *et al.*, 2001; Underhill *et al.*, 2002).

La determinación en la expresión de la sintasa constitutiva del NO (NOS III), demostró que la infección tanto aguda como persistente por el VSR inhibe la expresión de la enzima (Fig 5). Por lo tanto, el incremento en la producción del NO por la infección aguda no es atribuible a la actividad de la enzima NOS III. De manera general, se ha observado que la expresión de la NOS III es importante en el inicio de la activación de macrófagos, ya que el NO producido en bajos niveles por la NOS III potencia la

actividad del factor de transcripción kB y la expresión de la NOS II (Connelly *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha observado que una vez que los macrófagos se activaron, la expresión de la NOS III se inhibe por altas concentraciones de NO y por la expresión de la NOS II (Schwartz *et al.*, 1997; Connelly *et al.*, 2001; Chauhan *et al.*, 2003). De manera particular, Kao y col. reportan que la infección de células epiteliales con el VSR no induce la expresión de las sintasas constitutivas I y III del NO, mientras que en otro estudio realizado en un modelo murino *in vivo* se demuestra que la producción de NO observada por la infección del VSR se correlaciona con el incremento en la expresión de la NOS II, mientras que las sintasa constitutivas (NOS I y NOS III) no presentan cambio alguno (Stark *et al.*, 2005).

En el presente estudio se observó una correlación directa entre la expresión de la NOS II y la producción de NO en el modelo de infección aguda a partir de las 4 horas post-infección. Al respecto, en un estudio realizado sobre la infección de células monocíticas humanas con el VSR, se observa que la proteína F del virus es capaz de unirse al receptor TLR4 de la membrana celular, desencadenando la activación del factor nuclear de transcripción (NF-kB) (Kurt-Jones *et al.*, 2000) que induce un incremento en la producción de citocinas de tipo pro inflamatorio como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 a partir de las 16 horas post-estimulación, en este mismo trabajo se destaca que la replicación viral no es necesaria para inducir una respuesta inicial a la infección del VSR. En otro trabajo (Haeberle *et al.*, 2002) se muestra también que la infección viral induce una respuesta temprana mediada por el factor nuclear de transcripción kB a partir de los 30 minutos post-infección, lo que indica que no es necesaria la replicación viral para generar una respuesta. No obstante dentro de la respuesta inmune generada por la infección del VSR también se ha identificado una etapa en la cual es importante la expresión del genoma viral y la replicación. En un estudio realizado por Liu *et al* en 2007 se demuestra que los transcritos primarios del VSR generados 12 horas post-

infección activan una respuesta mediada por el gen inducible del ácido retinoico tipo 1 (RIG-1), que a su vez activa al factor nuclear NF- κ B así como al factor de respuesta a interferón tipo 3 (IRF-3), incrementando la respuesta por la infección viral. De manera adicional se ha identificado que el receptor TLR-3 es uno de los principales receptores intracelulares involucrados en la respuesta al VSR, ya que se une al ARN de doble cadena generado durante la replicación viral e induce la producción de quimiocinas como CXCL8, CCL5 y CXCL-10 (Rudd *et al.*, 2005).

El incremento en la producción de NO observado por la infección aguda del VSR en nuestros macrófagos tal vez se deba a diferentes eventos que ocurren durante las fases de la infección. La unión de la proteína F con receptores de la membrana celular como TLR4 durante la etapa de adsorción viral puede ser el primer estímulo generado para la inducción de la NOS II. La posterior producción de citocinas de tipo inflamatorio que se producen por la infección pueden actuar de manera paracrina e incrementar la expresión de la NOS II y finalmente la aparición de transcritos en la expresión de genes tempranos del VSR puede potenciar la magnitud de la inducción generando un incremento en la expresión de la NOS II y la subsecuente producción de NO.

Por otra parte, nuestros resultados indican que la infección persistente con el VSR no altera la producción de NO ni la expresión de la NOS II. En trabajos previos del laboratorio sobre el mismo modelo de infección se ha observado que la persistencia viral no incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROIs), comparado con macrófagos testigo, mientras que la infección aguda si incrementa de manera significativa la producción de ROIs. En el presente trabajo demostramos que la producción de NO, no se modifica por la persistencia viral, lo que puede ser una estrategia del virus para evitar estrés oxidativo y nitrosativo que indudablemente provocaría apoptosis y/o necrosis en la célula infectada. Al respecto, un trabajo realizado por Hobson y col., sugiere que la infección persistente de células dendríticas

no induce incremento en la producción de NO, el cual se mantiene en bajos niveles limitando la replicación viral. Sin embargo, cuando es inhibida la actividad de NOS II, la tasa de replicación viral se incrementa de manera significativa (Hobson *et al.*, 2008).

La importancia del NO en la modulación de la respuesta inmune contra el VSR se ha demostrado en otros trabajos (Ali-Ahmad *et al.*, 2003; Stark *et al.*, 2005) y por lo tanto, es lógico pensar que para lograr una infección viral persistente, el virus utilice alguna estrategia para limitar la producción del NO, así como de otros factores celulares involucrados en la respuesta inmune.

En este estudio se demostró, que la infección viral persistente es capaz de inducir un incremento en la expresión del ARNm de la enzima NOS II. Sin embargo, esto no se ve reflejado en la síntesis de la proteína, ni en la producción de NO, por lo tanto los resultados sugieren que existe una modulación postranscripcional en la expresión de la NOS II inducida por la persistencia viral. Esta modulación podría deberse a una acción directa del virus mediada por alguna proteína viral, o de una manera indirecta por la producción de citocinas inmunoregulatorias que actúen de manera paracrina en el cultivo de macrófagos infectados persistentemente. De manera específica, se han descrito varias moléculas que modulan la producción de NO por diferentes mecanismos y a diferentes niveles (Aktan *et al.*, 2004). Sin embargo, el TGF- β_1 es una de las citocinas más importantes en la modulación del NO ya que inhibe la expresión de la NOS II a nivel transcripcional (Matsuno *et al.*, 2001; Berg *et al.*, 2007) y postranscripcional (Vodovotz *et al.*, 1993; Mitani *et al.*, 2005), impidiendo la producción de NO en grandes cantidades ante la activación de macrófagos. Aunque no hay estudios que demuestren la producción de TGF- β_1 por la infección del VSR, en el modelo de persistencia viral, podría ser factible que los macrófagos produzcan esta citocina inmunoregulatoria que modula la eficiente traducción del ARNm. Adicionalmente otras citocinas que se inducen por la infección del VSR, como IL-4 e IL-10 tienen actividades

inhibitorias en la producción de NO (Panuska et al., 1995; Paludan et al., 1999; Bartz et al., 2002), las cuales podrían estar implicadas en el fenómeno de modulación observado en el modelo de infección persistente.

Otra citocina, posiblemente responsable de la modulación pos-transcripcional de la NOS II observado en nuestro modelo de persistencia viral es IL-13 que es capaz de inhibir la traducción del ARNm de la NOS II sin alterar sus niveles de expresión en macrófagos activados (Bogdan *et al.*, 1997; El-Gayar *et al.*, 2003).

Los resultados sugieren que la continúa presencia y expresión del genoma viral induce una respuesta inicial eficiente ante la infección. Sin embargo al parecer la traducción del ARNm se observa entorpecida por la misma presencia del virus. Esta inhibición en la traducción de la enzima NOS II puede ser parte de una estrategia del virus para evadir la respuesta inmune y lograr persistir en la célula infectada. Hasta el momento hay evidencias que sugieren que la producción de citocinas inmuno reguladoras pudieran estar implicadas en la modulación traduccional observada. Sin embargo, no se descarta la posibilidad que proteínas virales de manera directa puedan tener una participación importante en la inhibición de la traducción del ARNm de la NOS II en nuestro modelo de infección viral persistente.

CONCLUSIONES

- 1) La infección de macrófagos murinos en forma aguda con el VSR estimula la producción de óxido nítrico, lo cual se relaciona con un incremento en la expresión de la proteína NOS II.
- 2) La infección de macrófagos murinos en forma persistente con el VSR no estimula la producción de óxido nítrico.

3) Los macrófagos murinos infectados con el VSR ya sea en forma aguda o persistente, presentan una disminución en la expresión de la proteína NOS III.

4) La continúa presencia y expresión del genoma viral en los macrófagos infectados persistentemente con el VSR induce un incremento en la expresión del ARNm de NOS II.

PERSPECTIVAS

En función de los resultados anteriores, por una parte se propone evaluar la estabilidad del ARNm de la NOS II para determinar si hay diferencias entre los macrófagos testigo y los infectados de manera persistente, lo cual se podría asociar con una aparente deficiencia en la traducción como parte de una estrategia del virus para evitar la producción constante de óxido nítrico y las repercusiones que esto conlleva.

Por otra parte, se conocen varias moléculas que modulan la producción de óxido nítrico a nivel postranscripcional, entre las más importantes el TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-13, las cuales se propone cuantificar comparativamente en cultivos de macrófagos testigo e infectados persistentemente con el VSR, para determinar una posible asociación en su expresión y la inhibición de la producción de óxido nítrico.

REFERENCIAS

Aktan F. (2004) iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life sciences*. 75: 639-653

Ali-Ahmad D., Bonville C., Rosenberg H., Domachowske. (2003) Replication of respiratory syncytial virus is inhibited in target cells generating nitric oxide *in situ*. *Frontiers in bioscience*. 8: 48-53.

Bartz H., Büning-Pfaue F., Tükkel O., Schauer U. (2002) Respiratory syncytial virus induces prostaglandin E2, IL-10 and IL-11 generation in antigen presenting cells. *Clinical and experimental immunology*. 129:438–445

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. *Journal of Immunology*. 147:4307–12.

Berg D., Gupta A., Richardson M., O'Brien L., Calnek D., Grinnel B. (2007) Negative regulation of inducible nitric oxide synthase expression mediated through TGF- β dependent modulation of transcriptional factor TCF11. *The Journal of biological chemistry*. 51: 36837-36844.

Bingisser R., Holt P. (2001) Immunomodulating mechanisms in the lower respiratory tract: nitric oxide mediated interactions between alveolar macrophages, epithelial cells and T-cells. *Swiss medical weekly*. 131: 171-179.

Bogdan C., Thüring H., Dlaska M., Röllinghoff M., Weiss G. (1997) Mechanism of suppression of macrophage nitric oxide release by IL-13: influence of the macrophage population. *Journal of immunology*. 9: 4506-4573.

Bogdan C. (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology*. 10: 907-916

Chanock R., Roizman B., Myers R. (1957) Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA) I. Isolation, properties and characterization. *American journal of hygiene*. 3: 281-290.

Chauhan S., Seggara G., Vo P., Macallister R., Hobbs A., Ahluwalia A. (2003) Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice. *The federation of american societies for experimental biology publishes journal*. 6: 773-775

Collins P., Graham B. (2008) Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *Journal of virology*. 5: 2040-2055.

Connelly L., Palacios-Callender M., Ameixa C., Moncada S., Hobbs A. (2001) Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro-and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *Journal of immunology*. 166: 3873-3881.

Cowton V., McGivern D., Fearn R. (2006) Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *Journal of general virology*. 87: 1805-1821.

Dakhama A., Kaan P., Hegele R. (1998) Permissiveness of guinea pig alveolar macrophage subpopulations to acute respiratory syncytial virus infection in vitro. *CHEST*. 114: 1681-1688.

El-Gayar S., Thüring H., Pfeilschifter J., Röllinghoff M., Bogdan C. (2003) Translational control of inducible nitric oxide synthase by IL-13 and arginine availability in inflammatory macrophages. *Journal of immunology*. 9: 4561-4568.

Forman H., Torres M. (2001) Redox signaling in macrophages. *Molecular aspects of medicine*. 5: 189-216.

Franke G., Freihorst J., Steinmüller C., Verhagen W., Hockertz S., Lohmann-Matthes M. (1994). Interaction of alveolar macrophages and respiratory syncytial virus. *Journal immunology methods*. 174: 173-184.

Garofalo R., Welliver R., Ogra P. Clinical aspects of bronchial reactivity and cell-virus interaction. *Mucosal immunology*. 2a ed. San Diego: Academic Press, 1999 pp. 1223-1237.

Glezen W., Taber L., Frank A., Kasel J. (1986). Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *American journal of diseases of children*. 140:543–546.

Goldring C., Reveneau S., Algarte M., Jeannin J. (1996) In vivo footprinting of the mouse inducible nitric oxide synthase gene: inducible protein occupation of numerous sites including oct and NFIL6. *Nucleic acids research*. 24: 1682– 1687.

Ghosh S., May M., Kopp E., (1998) NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology*. 16: 225– 260.

Guerrero-Plata A., Ortega E., Gómez B. (2001) Persistence of respiratory syncytial virus in macrophages alters phagocytosis and pro-inflammatory cytokine production. *Viral immunology*. 1: 19-30.

Guerrero-Plata A., Casola G., Suarez X., Yu L., Spetch M., Peeples E., and Garofalo R. (2006). Differential response of dendritic cells to human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 34:320–329.

Hacking D., Rockett K., Hull J., Kwiatkowski. (2002) Synergistic action of cytokines and purified respiratory syncytial virus in nitric oxide induction. *Journal of leukocyte biology*. 71: 729-730.

Haeberle H., Takizawa R., Casola A., Brasier A., Dieterich H., Van Rooijen N., Gatalica Z., Garofalo R. (2002) Respiratory syncytial virus-induced activation of nuclear factor- κ B in the lung involves alveolar macrophages and toll-like receptor 4-dependent pathways. *The journal of infectious diseases*. 186: 1199-11206.

Hall C., Long C., Schnabel K. (2001) Respiratory syncytial virus infections in previously healthy working adults. *Clinical infectious diseases*. 33: 792-796.

Hashem M., Hall C. (2003) Respiratory syncytial virus in healthy adults: the cost of a cold. *Journal of clinical virology*. 27: 14-21.

Hobson L., Everard M. (2008) Persistence of respiratory syncytial virus in human dendritic cells and influence of nitric oxide. *Clinical and experimental immunology*. 151: 359-366.

Jones A., Morton I., Hobson L., Evans G., Everard M. (2006) Differentiation and immune function of human dendritic cells following infection by respiratory syncytial virus. *Clinical and experimental immunology*. 143: 513-522

Kao Y., Piedra A., Larsen G., Colasurdo G. (2001) Induction and regulation of nitric oxide synthase in airway epithelial cells by respiratory syncytial virus. *American journal respiratory critical care medicine*. 163: 532-539.

Kenneth K. (2001) Nitric oxide: synthesis and action. *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley & Sons.

Kleinert H., Schwarz P., Förstermann U. (2003) Regulation of expression of inducible nitric oxide synthase. *Biological chemistry*. 10: 1343-1364.

Kojima H., Sakurai K., Kikuchi K., Kawahara S., Kirino Y., Nagoshi H., Hirata Y., Akaike T., Maeda H., Nagano T. (1997) Development of a fluorescent indicator for the biomaging of nitric oxide. *Biological and pharmaceutical bulletin*. 20: 1129-1232.

Krishnan S., Halonen M. and Relliver W. (2004) Innate Immune Responses in Respiratory Syncytial Virus Infections. *Viral Immunology*. 2: 220-233.

Kurt-Jones E., Popova L., Kwinn L., Haynes L., Jones L., Tripp R., Walsh E., Freeman M., Golenbock D., Anderson L., Finberg R. (2000) Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature Immunology*. 5: 398-401.

Liu T., Castro S., Allan R., Brasier A., Jamaluddin M., Garofalo R., and Casola A. (2004) Reactive oxygen species mediate virus-induced STAT activation. *The journal of biological chemistry*. 23: 2461–2469

Liu P., Jamaluddin M., Li K., Garofalo R., Casola A., Brasieri A. (2007) Retinoic acid-inducible gene I mediates early antiviral response and toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells. *Journal of virology*. 3:1401-1411

López-Figueroa M., Caamaño C., Morano M., Ronn L., Akil H., Watson S. (2000) Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications*. 272: 129-133.

Lowenstein C., Alley E., Raval P., Snowman A., Snyder S., Russell S., Murphy W. (1993) Macrophage nitric oxide synthase gene- two upstream regions mediate induction by interferon- γ and lipopolysaccharide. *Proceedings of the national academy of sciences*. 90: 9730– 9734.

Mac Micking J., Xie Q., and Nathan C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology*. 15:323–50

Marks-Konczalik J., Chu S., Moss J. (1998) Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor- κ B-binding sites. *Journal of biological chemistry*. 273: 22201– 22208.

Martin L., Krunkosky T., Dye J., Fischer B., Jiang N., Rochelle L., Akley N., Dreher K., Adler K. (1997) The role of reactive oxygen and nitrogen species in the response of airway epithelium to particulates. *Environmental health perspectives*. 105: 1301-1307.

Matsuno R., Aramaki Y., Tsuchiya S. (2001) Involvement of TGF- β in Inhibitory Effects of Negatively Charged Liposomes on Nitric Oxide Production by Macrophages Stimulated with LPS. *Biochemical and biophysical research communications*. 281: 614–620

Midulla, F., Huang Y., Gilbert I., Cirino N., McFadden E., Panuska J. (1989) Respiratory syncytial virus infection of human cord and adult blood monocytes and alveolar macrophages. *American review of respiratory disease*. 140: 771-777.

Mitani T., Terashima M., Yoshimura H., Nariai Y., Tanigawa Y. (2005) TGF- β 1 enhances degradation of IFN-gamma-induced iNOS protein via proteasomes in RAW 264.7 cells. *Nitric oxide*. 1: 78-87.

Openshaw J., Tregoning J. (2005) Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. *Clinical microbiology reviews*. 3: 541-555.

Paludan S., Ellermann-Eriksen S., Lovmand J., Mogensen S. (1999) Interleukin-4 Mediated Inhibition of Nitric Oxide Production in Interferon-g-Treated and Virus-Infected Macrophages. *Scandinavian journal of immunology*. 49: 169–176.

Panuska J., Merolla R., Rebert N., Hoffmann S., Tsivitse P., Cinno N. (1995) Respiratory syncytial virus induces interleukin-10 by human alveolar macrophages. Suppression of early cytokine production and implications for incomplete immunity. *The journal of clinical investigation*. 96: 2445-2453

Payment, P. and Trudel M. *Methods and techniques in virology*. Marcel Dekker, New York. 1993 pp. 33.

Pribul P., Harker J., Wang B., Wang H., Tregoning J., Schwarze J., Openshaw P. (2008) Alveolar macrophages are a major determinant of early responses to viral lung infection but do not influence subsequent disease development. *Journal of virology*. 9: 4441-4448.

Raza M., Blackwell C., Elton R., Weir D. (2000). Bactericidal activity of a monocytic cell line (THP-1) against common respiratory tract bacterial pathogens is depressed after infection with respiratory syncytial virus. *Journal medical of microbiology*. 49: 227-233.

Rudd B., Burstein E., Duckett C., Li X., Lukacs N. (2005) Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression. *Journal of virology*. 6: 3350-3357

Sarmiento R., Tirado R., Gómez B. (2002) Characteristics of respiratory syncytial virus persistently infected macrophage-like culture. *Virus research*. 84: 45-58

Schwartz D., Mendonca M., Schwartz I., Xia Y., Satriano J., Wilson C., Blantz R. (1997) Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *The journal of clinical investigation*. 100: 439-448.

Stark J., Khan A., Chiappetta C., Xue H., Alcorn J., Colasurdo G. (2005) Immune and functional role of nitric oxide in a mouse model of respiratory syncytial virus infection. *Journal of infection diseases*. 191: 387-395.

Strijdom H., Muller C., Lochner A. (2004) Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 4: 897-902.

Taylor B., de Vera M., Ganster R., Wang Q., Shapiro, R., Morris Jr. S., Billiar T., Geller D. (1998) Multiple NF κ B enhancer elements regulate cytokine induction of the human

inducible nitric oxide synthase gene. *Journal of Biological chemistry*. 273: 15148–15156.

Tirado R., Ortega A., Sarmiento R., Gómez G. (2005) Interleukin-8 mRNA synthesis and protein secretion are continuously up-regulated by respiratory syncytial virus persistently infected cells. *Cellular immunology*. 233: 61-71.

Tripathi P., Tripathi P., Kashyap L., Singh V. (2007) The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunology and medical microbiology*. 51: 443–452

Tsutsumi H., Takeuchi R., Ohsaki M., Seki K., Chiba S. (1999) Respiratory syncytial virus infection of human respiratory epithelial cells enhances inducible nitric oxide synthase gene expression. *Journal of leukocyte biology*. 66: 99-104.

Ullmann F., Pfortner C., Walter P., Steinmuller C., Lohmann-Matthes M., Kobzik L., Freihorst J. (1995) Alteration of pulmonary macrophage function by respiratory syncytial virus infection in vitro. *The journal of immunology*. 154: 268-280.

Underhill D., Ozinsky A. (2002) Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual review of immunology*. 20: 825-852.

Vila V., Díaz M., Fresno M. (2007) Requirement of tumor necrosis factor- α and nuclear factor- κ B in the induction by IFN- γ of inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Journal of leukocyte biology*. 81: 272-283.

Vodovotz Y., Bogdan C., Paik J., Xie Q., Nathan C. (1993) Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor- β . *The journal of experimental of medicine*. 178: 605– 613.

Xie Q., Kashiwabara Y., Nathan C. (1994) Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *Journal of biological chemistry*. 269: 4705– 4708.