



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y POSTRADUCCIONAL DE LA ÓXIDO
NITRICO SINTASA INDUCIBLE EN MACRÓFAGOS INFECTADOS
PERSISTENTEMENTE CON EL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. SANTIAGO OLIVARES CARLOS ALBERTO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. BEATRIZ GÓMEZ GARCIA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. JUAN MIRANDA RIOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA +
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

CD. MX., FEBRERO 2020.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y POSTRADUCCIONAL DE LA ÓXIDO
NITRICO SINTASA INDUCIBLE EN MACRÓFAGOS INFECTADOS
PERSISTENTEMENTE CON EL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. SANTIAGO OLIVARES CARLOS ALBERTO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. BEATRIZ GÓMEZ GARCIA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. JUAN MIRANDA RIOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA +
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

MÉXICO, CD. MX., FEBRERO, 2020.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/071/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

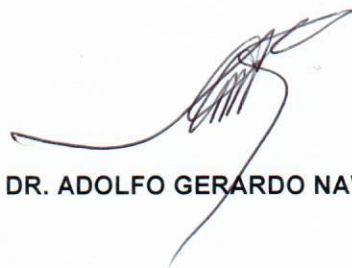
Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de noviembre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **SANTIAGO OLIVARES CARLOS ALBERTO** con número de cuenta **97231396** con la tesis titulada **“REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y POSTRADUCCIONAL DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE EN MACRÓFAGOS INFECTADOS PERSISTENTEMENTE CON EL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. BEATRIZ GÓMEZ GARCÍA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Vocal: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
Secretario: DR. JUAN MIRANDA RÍOS
Suplente: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
Suplente: DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 21 de enero de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno(a)

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS

Principalmente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por permitirme realizar mis estudios y consolidar mi formación académica.

A los siguientes proyectos de financiamiento, de los cuales se pudo obtener los reactivos y materiales necesarios para el desarrollo de los experimentos: PAPIIT IN218916, CONACyT 179838 y el presupuesto de la Facultad de Medicina, UNAM.

A mi tutor principal, la Dra. Beatriz Gómez García por aceptarme en su laboratorio y mantener en todo momento interés y atención al desarrollo del proyecto, por siempre estar dispuesta a resolver cualquier inconveniente y sobre todo por su confianza y apoyo, no solo en lo académico si no también en lo laboral.

A los miembros de mi comité tutor: Dr. Juan Miranda Ríos y Dr. Diego Julio Arenas Aranda (+), por aceptar co-dirigir el trabajo, por su disposición e interés y por sus acertadas observaciones y críticas constructivas para la mejora del proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A los sinodales: Dra. Leticia Rocha Zavaleta, Dra. Martha Legorreta Herrera, Dra. Leonor Huerta Hernández y Dr. Enrique Ortega Soto, por su tiempo y disposición para la revisión de la tesis, así como por sus comentarios y observaciones que enriquecieron el escrito final.

A la Dra. Evelyn Rivera Toledo por su importante apoyo en el laboratorio y la escritura del artículo, así como por su gran compañerismo. Al Dr. Jorge Gaona Bernal y Dr. Gerardo Arevillaga Boni por su amistad y porque siempre estuvieron dispuestos a discutir los resultados y colaborar en el trabajo.

A la Dra. Ana Flisser por su apoyo y por recibirme en su laboratorio. A todos los miembros del laboratorio de Inmunomodulación, por propiciar un excelente ambiente de trabajo, especialmente a Mayra Cruz.

DEDICATORIA

A mis tres grandes amores: mi madre (Hilda Irene), mi esposa (Iliana Mendoza) y mi hija (Natalia Santiago), las cuales representan mi principal estímulo de superación y felicidad; por su paciencia, comprensión y amor, pero sobre todo por el apoyo y la motivación para poder concluir el doctorado. A Joaquín Yolotl para que siga en el camino de la formación académica y recuerde que las metas son alcanzables.

A mis hermanos Germán y Héctor quienes con su ejemplo de lucha y superación han sido una importante inspiración para mí.

A mi tío Gustavo, Manuel y Miguel por alentar mi desarrollo académico y profesional. A mi tío Julio, José Luis (✚) y Lupita (✚) por estar cerca durante toda la vida. A Paco y Chucho por la fraternidad que nos une y por todos los momentos compartidos. A toda mi familia y amigos.

Finalmente a todas las personas que de manera directa o indirecta han contribuido al desarrollo y conclusión de esta tesis.

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	3
III. INTRODUCCIÓN	5
3.1 Generalidades	5
3.2 Clasificación y ciclo replicativo del VSRh	6
3.3 Respuesta inmune.....	11
3.4 Óxido nítrico y respuesta antiviral	16
3.5 Síntesis de NO y regulación	17
3.6 Persistencia viral	20
3.7 Probable persistencia del VSRh.....	21
IV. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
V. HIPÓTESIS	26
VI. OBJETIVOS	26

VII. METODOLOGÍA	27
7.1 Líneas celulares.....	27
7.2 Virus e infección aguda	28
7.3 Microscopía de contraste de fases.....	28
7.4 Viabilidad celular	28
7.5 Detección de antígeno viral	29
7.6 Cuantificación de nitritos	30
7.7 Determinación de NO	31
7.8 Western blot	32
7.9 RT-PCR tiempo real	33
7.10 Cuantificación del genoma viral.....	34
7.11 Ensayo de actividad de arginasa.....	34
7.12 Inhibición de la actividad de arginasa.....	35
7.13 Determinación de L-arginina	36

7.14 Análisis estadístico	36
VIII. RESULTADOS	37
8.1 Cultivo celular y detección de antígeno viral	37
8.2 Viabilidad celular	41
8.3 Concentración de NO y número de copias del genoma viral	41
8.4 NOS II, determinación de RNAm y proteína.....	44
8.5 Inhibición de la actividad de NOS II y su impacto en la multiplicación viral	47
8.6 Expresión de Arg-1 y su actividad	49
8.7 Inhibición de Arginasa en MφP	52
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	55
X. CONCLUSIONES	60
XI. PERSPECTIVAS	61
XII. LITERATURA CITADA.....	62
XIII. APÉNDICE (Artículo requisito para la obtención del grado).....	71

I. RESUMEN

El virus sincicial respiratorio humano (VSRh), es el agente causal más frecuente de infecciones respiratorias agudas (IRA's) en niños a nivel mundial. La infección severa durante los primeros meses de vida se ha asociado a una posterior hiperreactividad bronquial, asma y otras afecciones del tracto respiratorio durante la niñez por lo que se ha sugerido que el virus puede permanecer de manera crónica en el organismo. Evidencias circunstanciales tales como el aislamiento del virus en nasofaringe de niños aparentemente sanos, la detección de RNA mensajero (RNAm) de la nucleoproteína viral en tejidos de pulmón "post mortem" de infantes que fallecieron en verano sin enfermedad clínica reportada y la presencia de genoma viral en células estromales primarias de medula ósea tanto de adultos como de niños, son hallazgos que apoyan una posible persistencia viral. Debido a que durante una infección persistente el virus es capaz de regular genes virales y celulares, sobre todo aquellos relacionados con la respuesta inmune y la permanencia viral en el hospedero, decidimos estudiar la regulación en la producción de óxido nítrico (NO), una molécula importante en la resolución de la infección, ya que posee actividades antivirales y pro inflamatorias. En este trabajo utilizamos un modelo de macrófagos murinos infectados de forma persistente (MφP) y un modelo de infección aguda (MφA) con el VSRh. Los resultados muestran que la infección aguda induce a 24 horas post infección (hpi) un incremento en la producción de NO respecto al cultivo persistente. Por otra parte observamos que el RNAm de NOS II se expresó altamente en MφA respecto a MφP, mientras que la abundancia de la proteína fue similar en ambos tipos de infección, lo que sugiere una diferente regulación postranscripcional. Adicionalmente se observó que el RNAm de la

enzima arginasa-1 (Arg-1), se encuentra altamente expresado en M ϕ P respecto a M ϕ A; este incremento se correlacionó con una mayor actividad enzimática y con una afectación en la síntesis de NO. Nuestros resultados sugieren que el incremento en la producción de NO, inducido durante la infección aguda de macrófagos por el VSRh, tiene la finalidad de eliminar al virus, sin embargo también daña la célula hospedera y afecta la viabilidad celular; durante la transición a una eventual infección persistente la expresión de Arg-1 también se induce, lo cual se correlaciona con una menor producción de NO; esta condición modifica funciones celulares y favorece el mantenimiento de la replicación viral, lo que coadyuva a la permanencia del virus en la célula infectada.

II. ABSTRACT

Human respiratory syncytial virus (RSV) is the most frequent causative agent of acute respiratory infections (ARIs) in children worldwide. Severe infection during the first months of life has been associated with subsequent bronchial hyperreactivity, asthma and other respiratory tract conditions during childhood and it has been suggested that the virus may remain chronically in the body. Circumstantial evidence such as the isolation of the virus from the nasopharynx of apparently healthy children, detection of messenger RNA (mRNA) from viral nucleoprotein in "post mortem" lung tissues of infants who died in summer without reported clinical disease and the presence of viral genome in Primary Bone Marrow Stromal Cells in both adults and children are findings that support possible viral persistence. Because during a persistent infection the virus is able to regulate viral and cellular genes, especially those related to the immune response and viral persistence in the host, we decided to study the regulation in the production of nitric oxide (NO), an important molecule in the resolution of the infection since it has antiviral and pro inflammatory activities. In this work we use a model of persistently infected (M ϕ P) and acute infection (M ϕ A) of murine macrophages with RSVh. The results show that acute infection induces an increase in NO production with respect to persistent culture after 24 hours of viral inoculation. On the other hand, we observe that the NOS II mRNA was highly expressed in M ϕ A with respect to M ϕ P, while the abundance of the protein was similar in both types of infection, which suggests a different posttranscriptional regulation. Additionally, it was observed that the mRNA of arginase-1 (Arg-1) is highly expressed in M ϕ P with respect to M ϕ A, this increase was

correlated with greater enzymatic activity and with an impact on the production of NO. Finally, it was also observed that partial inhibition of arginase activity is associated with a lower number of copies of the viral genome in M ϕ P. Our results suggest that the increase in NO production, induced during acute infection of macrophages by RSV, is intended to eliminate the virus, however it also damages the host cell and affects cell viability; during the transition to an eventual persistent infection Arg-1 expression is also induced, which correlates with reduced NO production, this condition modifies cellular functions and favors the maintenance of viral replication, which contributes to the permanence of the virus in the infected cell.

III. INTRODUCCIÓN

3.1 Generalidades

El virus sincicial respiratorio humano (VSRh) es el virus más frecuente en infecciones del tracto respiratorio en la población pediátrica a nivel mundial (Piedimonte, 2015). Según las estimaciones de diferentes estudios epidemiológicos, anualmente causa 33.8 millones de infecciones en niños menores de 5 años en todo el mundo (Díez-Domingo, *et al.* 2014), de los cuales cerca de 3.4 millones requiere hospitalización debido a la severidad de la enfermedad, provocando entre 66,000 y 199,000 decesos anualmente (Nair, *et al.* 2010). Las principales complicaciones debidas a la infección, son: inflamación de las vías respiratorias inferiores, insuficiencia pulmonar aguda, bronquiolitis y neumonía (Hall, *et al.* 2013). Entre las secuelas más importantes después de una infección severa, se tienen asociación a asma (Carbonell-Estrany, *et al.* 2008; Kusel, *et al.* 2007; Sigurs, *et al.* 2010) así como una alta sensibilidad a alérgenos presentes en el ambiente (Sigurs, *et al.* 2005).

En diversos estudios se ha determinado que el nacimiento prematuro, las malformaciones congénitas del corazón y la inmunodepresión (Jha *et al.* 2016) representan los principales factores de riesgo para sufrir una infección severa, sin embargo también son importantes otros factores como el hacinamiento, la historia familiar con asma, exposición a humo de cigarrillo y la ausencia de lactancia materna (Díez-Domingo *et al.*, 2014).

El VSRh generalmente presenta una estacionalidad en países de clima templado que empieza a finales de otoño y culmina con la entrada de la primavera (Borchers *et al.* 2013). Sin embargo, los principales factores climáticos determinantes para la transmisión del virus son la disminución de la temperatura y una alta humedad relativa (Jha *et al.* 2016), por lo cual se reportan casos fuera del periodo estacional en regiones específicas con condiciones climáticas particulares (Hall, *et al.* 2013).

3.2 Clasificación y ciclo replicativo del VSRh

El VSRh es un virus envuelto, pleómorfo, de aproximadamente 150 nm de diámetro que se clasifica dentro del orden *Mononegavirales*, familia *Pneumoviridae* y género *Orthopneumovirus* (Griffiths, *et al.* 2017). Su genoma de 15.2 Kb y polaridad negativa codifica para diez genes que dan origen a once proteínas, de las cuales nueve son estructurales y dos no estructurales (Cowton, *et al.* 2006) (Figura 1). El RNA genómico, está cubierto por una nucleocápside helicoidal conformada por la proteína viral N (nucleoproteína), la cual está asociada a la proteína L (polimerasa) y a su cofactor P (fosfoproteína), así como a la proteína M2-1 (factor de procesividad de la transcripción) (Krzyzaniak, *et al.* 2013), este complejo se encuentra rodeado por la proteína M (matriz) la cual sirve como andamiaje para interactuar con la envoltura viral donde se encuentran las proteínas de superficie F, G y SH (Cowton, *et al.* 2006).

El VSRh infecta principalmente células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio superior, gracias a la capacidad que tienen las glicoproteínas virales de superficie (F y G) de unirse a una gran variedad de proteínas celulares, entre las cuales se encuentran

anexina II (Malhotra, *et al.* 2003), el receptor de quimiocina CX3 1 (CX3CR1) (Johnson, *et al.* 2015; Tripp, *et al.* 2001), el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF) (Currier, *et al.* 2016), las lectinas dependientes de calcio (Malhotra, *et al.* 2003), el receptor 4 tipo toll (TLR-4) (Kurt-Jones, *et al.* 2000; Marchant, *et al.* 2010), la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) (Behera, *et al.* 2001), la nucleolina (Holguera, *et al.* 2014; Tayyari, *et al.* 2011) y los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs) (Krusat, *et al.* 1997).

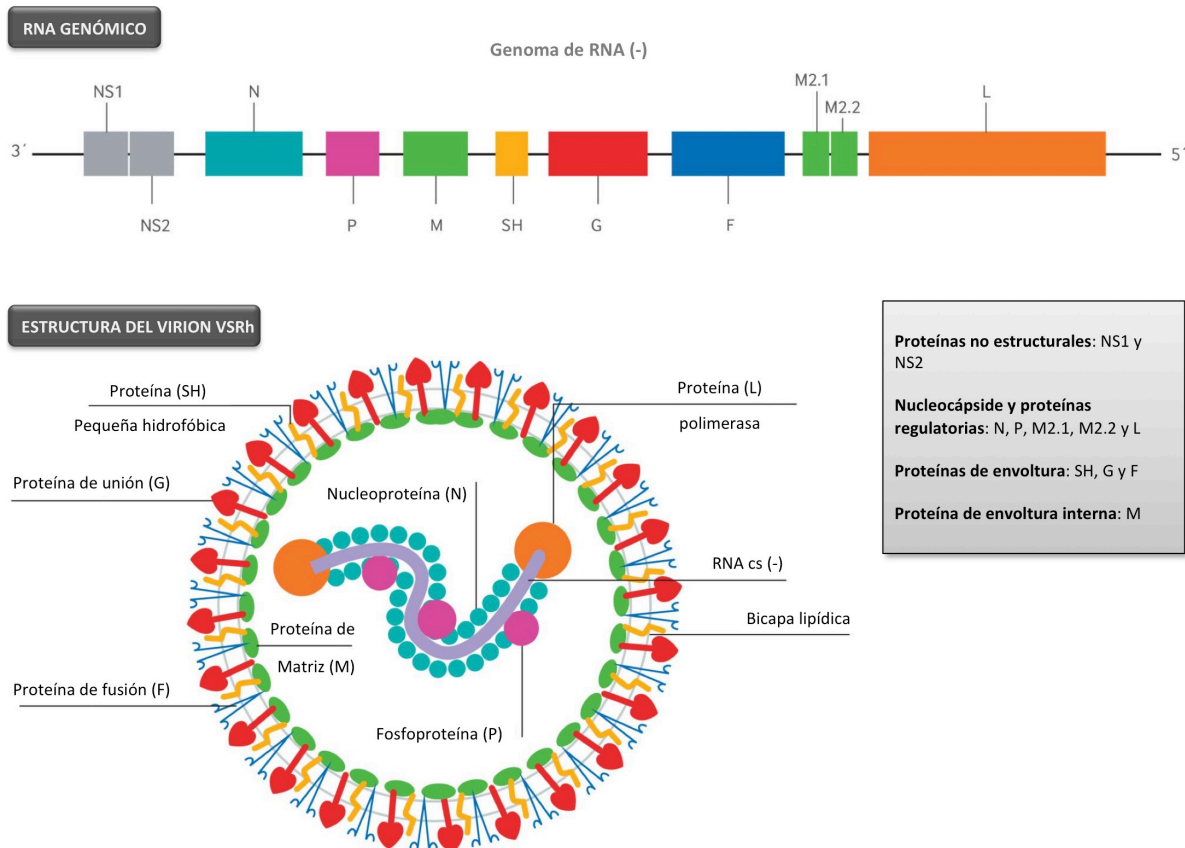


Figura 1. Estructura del VSRh. Se muestra el genoma de RNA (-) de una longitud de 15.2 Kb con la representación de los genes virales ordenados de 3' a 5' y la conformación del virus, con las proteínas estructurales. Tomado y modificado de Nam, *et al.* 2019.

La principal vía de entrada del virus es a través de macropinocitosis (Krzyzaniak, *et al.* 2013) en regiones de la membrana celular conocidas como balsas lipídicas (San-Juan-Vergara, *et al.* 2012), los cuales son micro dominios ricos en colesterol. Durante la formación del endosoma temprano, la proteína F del virus sufre un procesamiento por la enzima furina del hospedero que resulta en la eliminación de un pequeño péptido de 27 aminoácidos, la subunidad F1; posteriormente ocurre la fusión de las membranas celular y viral que inicia con formación del poro de fusión a través del cual la nucleocápside entra al citoplasma de la célula (Griffiths, *et al.* 2017). Una vez en el citoplasma, la nucleocápside, junto con algunas proteínas del hospedero, forman cuerpos de inclusión (Griffiths, *et al.* 2017), donde se lleva a cabo la transcripción viral (Bohmwald, *et al.* 2016) (Figura 2).

Los diez genes que constituyen al VSRh, están separados por una región intergénica variable de 1 a 56 nucleótidos y se encuentran flanqueados por secuencias de inicio (GS: Gen Start) y término (GE: Gen End) de la transcripción. A excepción del gene M2 que codifica para dos proteínas, los demás genes tienen un solo marco abierto de lectura y dan origen a RNAm poliadenilados y metilados (Cowton, *et al.* 2006). El único promotor viral identificado se encuentra en el extremo 3' del genoma, en una región llamada "Leader" (Le) que se divide en tres sitios funcionales: Sitio de iniciación de la polimerasa (nucleótidos 1 a 15); señal de elongación y encapsidación (nucleótidos 16 al 34) y señal de la transcripción (nucleótidos 36 a 43) (McGivern, *et al.* 2005) (Figura 3).

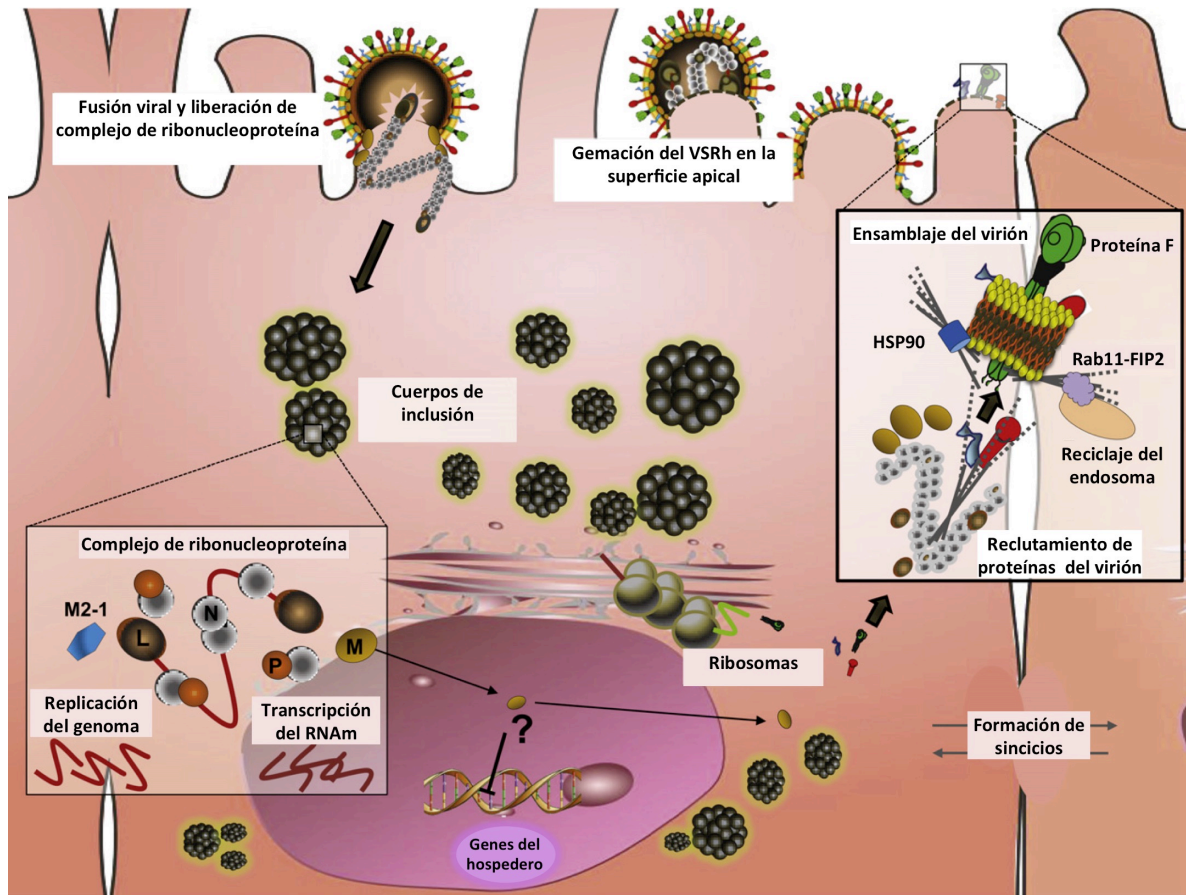


Figura 2. Ciclo de infección del VSRh en células epiteliales. Una vez que se fusionan la membrana viral y celular, el complejo de ribonucleoproteína (RNP) se disocia del recubrimiento de la matriz dentro del virión y se libera en el citoplasma; el complejo RNP inicia la transcripción de genes virales necesarios para la replicación del genoma y la síntesis de los RNAm virales ocurre principalmente en los cuerpos de inclusión que concentran las proteínas L, N y P y probablemente las proteínas M2-1 y M. Durante la infección, la proteína M migra al núcleo, posiblemente para bloquear la transcripción de los genes del huésped. Posteriormente, la proteína F se dirige a las balsas lipídicas para mediar la formación de filamentos en la superficie celular que faciliten la salida del virus; en este sitio se recluta a otras proteínas virales, como G y M. En la formación del virión, la proteína M se une a la proteína M2-1 del complejo RNP, reclutando esta estructura a la membrana celular para el ensamblaje del virus. En esta etapa, la actina facilita el ensamblaje del virus y la liberación del virión, mientras que la proteína de choque térmico HSP90 une a la actina con las proteínas virales. Finalmente, el virión sale por gemación de la superficie de las células infectadas mediante el endosoma de reciclaje en la zona apical. Tomado y modificado de Lay, *et al.* 2013

Al cabo de unas horas, es frecuente obtener un gradiente de expresión génica debido al único promotor y a que la polimerasa viral es susceptible a disociarse de su templado en las regiones intergénicas (Cowton, *et al.* 2006). Posterior a esto, la polimerasa viral cambia la modalidad de transcripción a replicación del genoma, a

través de un proceso que involucra la participación de proteína viral M2-2 (Karron, *et al.* 2015). La multiplicación del virus requiere la síntesis de un RNA de polaridad positiva, denominado “antigenoma”, el cual sirve como “templado” para la replicación. La síntesis del antigenoma comienza en el sitio de iniciación de la polimerasa dentro de la región “Le”; una vez unida la polimerasa viral, la síntesis progresa sin tomar en cuenta las señales de inicio y fin de la transcripción de los genes virales hasta el extremo 5´del genoma. Posteriormente, la polimerasa viral inicia la síntesis del RNA de polaridad negativa a partir del extremo 3´ del antigenoma en la región conocida como complementaria de “Trailer” (TrC) cuya secuencia de 155 nucleotidos funciona como un potente promotor para la síntesis del genoma viral (Fearn, *et al.* 2000) (Figura 3). Una vez sintetizado el genoma, la nucleocápside se asocia con la proteína de matriz quien a su vez favorece la interacción con las proteínas virales F, G y SH que se encuentran en dominios de la membrana celular ricos en colesterol (Low, *et al.* 2008) y finalmente tiene lugar la formación de viriones a través del proceso de gemación (Bohmwald, *et al.* 2016) (Figura 2).

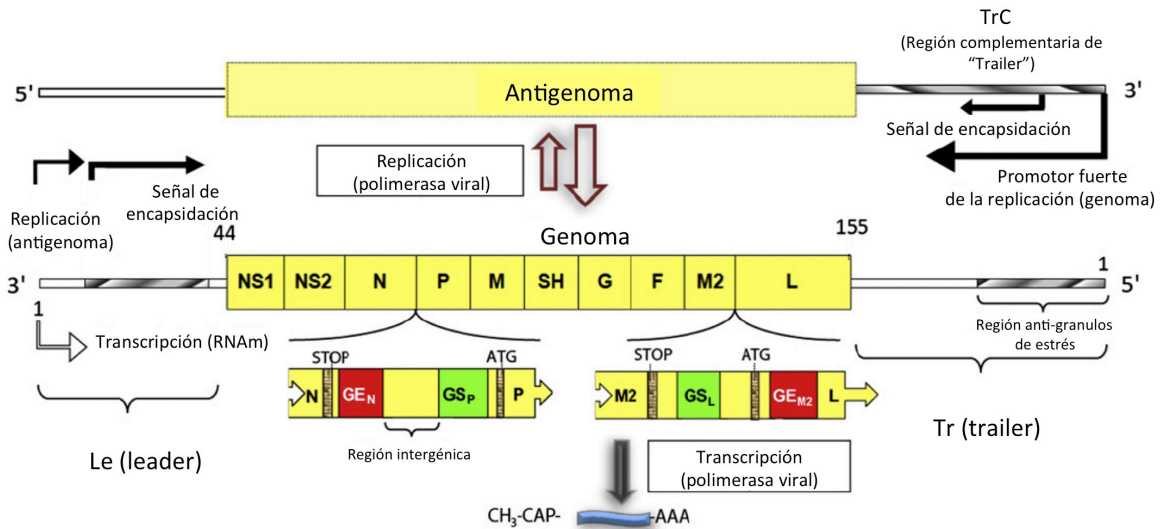


Figura 3. Replicación y transcripción del genoma del VSRh. El genoma contiene una región "leader" en el extremo 3' (Le) que garantiza tanto la replicación de antigenoma como la transcripción de RNAm. La región "trailer" 5' (Tr) codifica un elemento que evita la formación de gránulos de estrés en la célula hospedera. La síntesis del antigenoma está regulada por la región "Le", que contiene una señal de encapsidación, la cual asegura la asociación de la nucleoproteína con el antigenoma nascente. El antigenoma es copiado a RNA genómico gracias a la fuerte actividad promotora de la región complementaria de "trail" (TrC), que se especula contiene una señal de encapsidación para la asociación de la nucleoproteína con el genoma nascente. Los genes virales están separados por señales de inicio (GS) y de fin de la transcripción (GE) a partir de los cuales se generan RNAm monocistrónicos metilados en el extremo 5' y poliadenilados en el extremo 3'. La traducción del RNAm viral se lleva a cabo con la maquinaria de síntesis de proteínas del hospedero. Tomado y modificado de Lay, *et al.* 2013.

3.3 Respuesta inmune

La respuesta inmune generada por la infección del VSRh, es una de las líneas más estudiadas debido a su complejidad. Desde la etapa inicial de la infección, cuando la proteína F del virus se une al receptor TLR4 de la célula hospedera, se activa una de las principales vías de señalización de la respuesta inmune innata, generando la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B (Kurt-Jones, *et al.* 2000), lo que estimula la síntesis de citocinas de tipo pro inflamatorio (Haeberle, *et al.* 2002).

Posteriormente, una vez que la nucleocápside se encuentra dentro de la célula, se induce una respuesta de mayor magnitud que activa otros factores como STAT, que potencia la transcripción de los genes antivirales IFN- α e IFN- β ; la producción de las quimiocinas RANTES y MIP-1 α , así como la citocina IL-8 entre otras moléculas (Liu, *et al.* 2004). Los receptores citoplásmicos TLR3 y RIG-1 reconocen al RNA de doble cadena generado como intermediario de la replicación viral y también participan en la inducción de la respuesta inmune innata a través de la activación de NF-kB (Liu, *et al.* 2007; Rudd, *et al.* 2005).

Las células dendríticas, así como los macrófagos cumplen un papel muy importante pues representan la conexión entre la respuesta inmune innata y la adaptativa; ambas estirpes celulares se encargan de internalizar, procesar y presentar el antígeno a células T “virgenes” en los ganglios linfoides locales y dependiendo de las señales proporcionadas durante esta activación, se definirá el tipo de respuesta efectora que tendrá lugar (Varga, *et al.* 2013; Johansson, 2016). Las células dendríticas activadas en el marco de una respuesta efectiva, migran rápidamente a los ganglios linfoides y activan a las células TCD8⁺ de manera directa a través de los receptores de células T y CD40L o bien de manera indirecta transfiriendo el antígeno a células dendríticas CD8a⁺ residentes del ganglio linfático que son potentes activadores de células TCD8⁺ (Varga, *et al.* 2013). Sin embargo también se ha observado que las mismas células dendríticas infectadas pueden inhibir la activación de los linfocitos T en el ganglio (Gomez, *et al.* 2014). Las células TCD8⁺ arriban a los pulmones algunos días después del inicio de la infección y ejercen su acción a través de la secreción de citocinas y la lisis de células

infectadas por medio de gránulos líticos (perforina y granzima B) (Johansson, 2016) o inducción de apoptosis a través del ligando de Fas que sobre expresan en la membrana celular (Braciale, *et al.* 2012). Las células TCD4⁺ también son activadas por las células dendríticas y en presencia de citocinas como IL-6, se promueve su diferenciación a células T foliculares (Thf) específicas para el VSRh, las cuales coadyuvan a la diferenciación de células B extra foliculares hacia células plasmáticas secretoras de anticuerpos promoviendo la formación del centro germinal y maduración de afinidad (Varga, *et al.* 2013) (Figura 4).

En la mayoría de los casos de infección severa por VSRh, durante la etapa aguda se ha observado la inducción de una respuesta inmune tipo Th2, la cual se caracteriza por la síntesis de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 así como eotaxina, lo que genera un importante reclutamiento de neutrófilos y eosinófilos hacia el tracto respiratorio superior e inferior, lo que provoca una intensa inflamación y obstrucción de la vía aérea de los infantes infectados provocado por la eosinofilia, hiperplasia celular y sobre producción de moco (Collins, *et al.* 2008; Geevarghese, *et al.* 2014; McNamara, *et al.*, 2003; Russell, *et al.*, 2017). Adicionalmente, se ha descrito que las células Th17 también se encuentran implicadas en la severidad de la enfermedad provocada por la infección del VSRh (Kallal, *et al.* 2010; Lukacs, *et al.* 2010; Mukherjee, *et al.* 2011) ya que las concentraciones elevadas de la citocina IL-17 están involucradas en el desarrollo de asma e inflamación de las vías aéreas (Mukherjee, *et al.* 2011). Recientemente la citocina IL-33 también se ha asociado con la severidad de la enfermedad en neonatos por infección del VSRh (Saravia, *et al.* 2015).

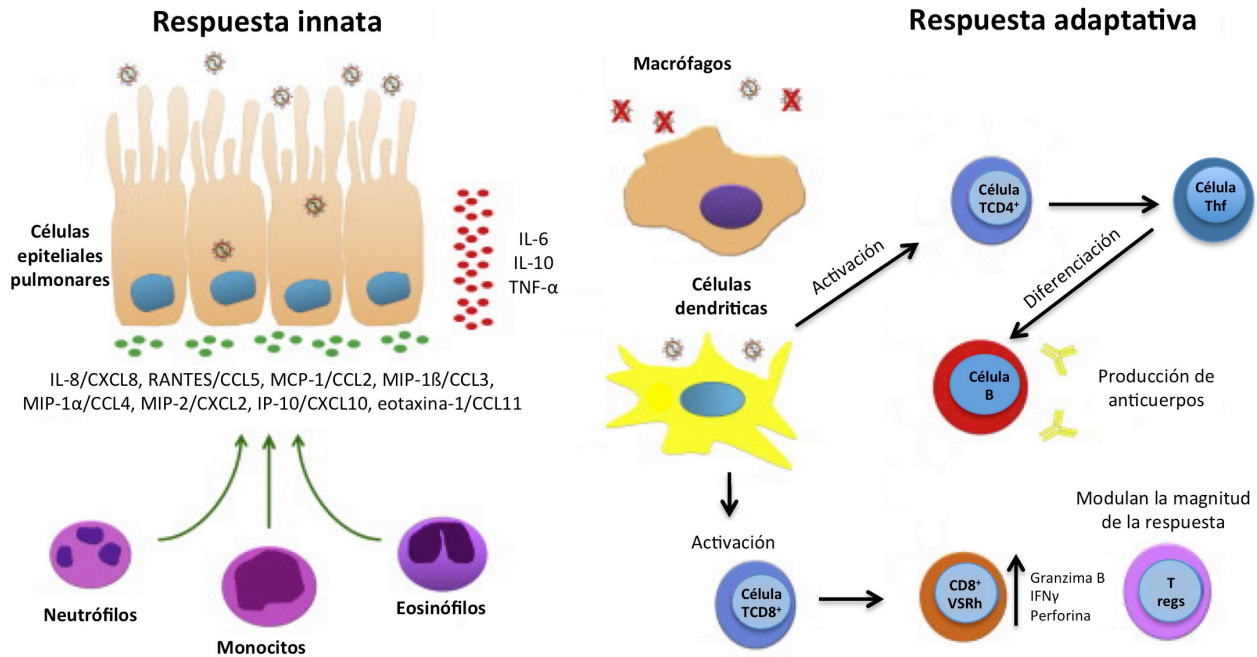


Figura 4. Respuesta inmune innata y adaptativa contra el VSRh. Después que el virus infecta la vía aérea, las células epiteliales, secretan citocinas y quimiocinas pro inflamatorias, las cuales atraen y activan neutrófilos, monocitos y eosinófilos al sitio de infección. Los macrófagos alveolares juegan un papel importante en la disminución de la carga viral en los pulmones y junto con las células dendríticas representan el enlace entre la respuesta innata y la adaptativa. La infección desencadena la activación y respuesta de células TCD8⁺ y TCD4⁺, mientras que las células B son diferenciadas a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Las células T reguladoras (Tregs), tienen un papel importante en regular la magnitud de la respuesta de las células TCD8⁺ específicas contra el VSRh. Tomado y modificado de Gómez R. *et al* 2014.

Debido a lo anterior, varios investigadores coinciden en que la severidad del cuadro clínico ante una infección con el VSRh, esta dada principalmente por la intensidad de la respuesta inmune del hospedero más que por el virus de manera directa (Griffiths, *et al.* 2017). Otro grupo de investigadores sugieren que el tipo de respuesta inmune esta influenciado por la edad en la que ocurre la infección, ya que se ha observado una predominancia de respuesta tipo Th2 sobre Th1 en infantes menores de un año (Culley, *et al.* 2002; Geevarghese, *et al.* 2014).

Una respuesta inmune efectiva es la que dirigen los linfocitos Th1, lo que implica un aumento en la síntesis de IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12, asociada a una eficiente eliminación del virus, sin promover patogénesis en el hospedero (Russell, *et al.* 2017). Sin embargo, se ha observado que a pesar de que el IFN se incrementa en la edad adulta, la cantidad de IL-2 producida es deficiente, lo cual afecta la capacidad de expandir subconjuntos de células T CD4⁺ (Doria, *et al.* 1988; Frasca, *et al.* 1997) y esto compromete la respuesta inmune. San-Juan-Vergara, *et al.* 2019 y Taleb, *et al.* 2018, han reportado que la respuesta mediada por anticuerpos generada después de la infección por el VSRh tampoco es eficiente; tanto IgA como IgG específicas disminuyen rápidamente de manera particular en niños pequeños, donde la presencia de anticuerpos maternos combinado con la inmadurez del sistema inmune probablemente contribuye a una pobre respuesta ante la infección aguda por VSRh (Kasel, *et al.* 1987). No obstante, en niños menores de seis meses, se ha observado que un 50% a 75% presentan anticuerpos neutralizantes específicos para el virus después de la infección (Brandenburg, *et al.* 1997; Murphy, *et al.* 1986).

Por otro lado, en la mayoría de los adultos el título de anticuerpos IgG específicos para el VSRh se reduce a una cuarta parte aproximadamente después de un año de la infección (Falsey, *et al.* 2006). Adicionalmente, los bajos títulos de IgA nasales presentes en esta población se han correlacionado con el incremento en la tasa de re infección por el virus (Habibi, *et al.* 2015; Walsh, *et al.* 2004).

3.4 Óxido nítrico y respuesta antiviral.

El óxido nítrico (NO) es un compuesto de vida media muy corta, puede difundir libremente a través de la membrana celular debido a que es soluble tanto en agua como en lípidos. Sus acciones virostáticas las lleva a cabo de manera directa e indirecta; directamente nitrosila grupos alcohol (S-nitrosotioles) en residuos de cisteína lo que altera funciones de las proteínas integrasas (Wink, *et al.* 2011), proteasas (Saura *et al.*, 1999), ribonucleótido reductasas (Lepoivre, *et al.* 1991) y transcriptasa reversa (Persichini *et al.* 1999) necesarias para la multiplicación viral.

De manera indirecta promueve daño oxidativo por la formación de especies reactivas de nitrógeno, las cuales a su vez pueden actuar como moléculas de señalización celular, activan la transducción de vías específicas en células endoteliales y monocitos de forma dependiente de la concentración (Wink *et al.* 2011). En adición a sus efectos antivirales el NO también presenta acciones citostáticas en las células infectadas, ya que inhibe la síntesis de DNA, proteínas (Kim *et al.*, 1998) y el metabolismo mitocondrial (Abdul-Cader *et al.*, 2016).

En general, el NO es capaz de interferir con actividades de ciertas enzimas debido a su interacción con átomos de hierro en grupos hemo (Ischiropoulos, 2003) y con el azufre de puentes disulfuro (Hernansanz-Agustin, *et al.* 2013). Adicionalmente, el NO altera de manera directa la función de factores de transcripción asociados a la respuesta inmune como NF- κ B y AP-1 (Martin, *et al.* 1997; Sekkaï, *et al.* 1998).

En el caso específico de la respuesta contra el VSRh, se ha reportado que la infección de células epiteliales induce un incremento en la síntesis de NO (Tsutsumi, *et al.* 1999; Kao, *et al.* 2001; Stark, *et al.* 2005; Phipps, *et al.* 2007; Song, *et al.* 2009) y este inhibe la multiplicación viral tanto en modelos *in vitro* (Ali-Ahmad *et al.* 2003; Hobson, *et al.* 2007) como *in vivo* (Stark, *et al.* 2005).

3.5 Síntesis de NO y regulación

La síntesis del NO, se lleva a cabo por enzimas específicas llamadas óxido nítrico sintasas (NOS), de las cuales se han descrito tres subtipos en función de las células donde se identificaron inicialmente (Aktan, 2004). Las NOS I y NOS III identificadas inicialmente en neuronas y células endoteliales respectivamente, se conocen como sintasas constitutivas debido a que presentan una expresión basal, cumplen funciones fisiológicas y específicas del tejido donde se encuentran como la relajación del músculo liso e inhibición de la agregación plaquetaria, sin embargo se ha observado que la expresión de estas enzimas se activan por neurotransmisores, estimulación física, incrementos en los niveles de calcio, o incluso por citocinas y otros mediadores solubles (Tripathi, *et al.* 2007).

Por otra parte, la NOS II descrita inicialmente en macrófagos se asocia principalmente a la respuesta inmune y se expresa bajo ciertos estímulos por lo que también se denomina sintasa inducible (Panuska, *et al.* 1990). Los principales estímulos que inducen la expresión de la NOS II, son infecciones y la síntesis de citocinas como IFN- γ , IL-1 β , IL-6 y TNF- α entre otras (Kleinert, *et al.* 2004) (Figura 5).

Las NOS poseen dos dominios funcionales, uno con actividad de reductasa y otro de oxigenasa, además de sitios de unión a cofactores importantes como calmodulina, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma reducida (NADPH), flavín adenín dinucleótido (FAD), flavín mononucleótido (FMN), grupo Hemo y tetrahidrobiopterina (H4B) (Aktan, 2004). Las NOS, utilizan como sustrato a L-arginina y oxígeno, para generar NO y L-citrulina como productos finales (Aktan, 2004).

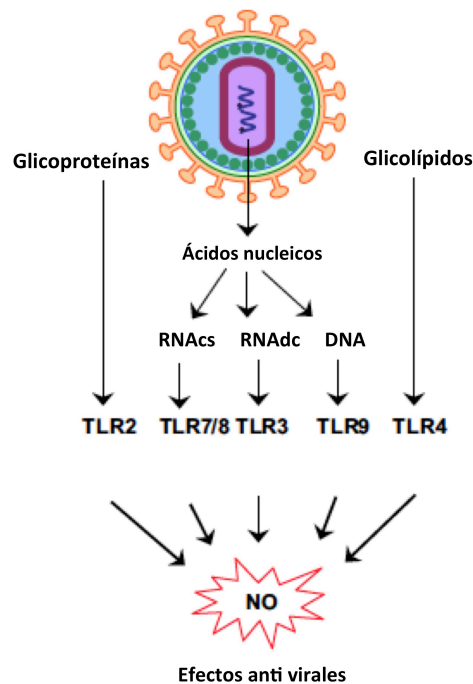


Figura 5. Estimulación de la síntesis de NO por virus. Diferentes componentes virales como glicoproteínas, glicolípidos y los ácidos nucleicos virales, estimulan la producción de NO a través de distintos receptores tipo toll, lo cual induce efectos antivirales. Tomado y modificado de Abdul-Cader *et al.* 2016.

Los inductores de la expresión de NOS II, activan diferentes vías de señalización que promueven la translocación nuclear de los factores de transcripción NF- κ B, C/EBP, STAT e IRF-3, necesarios para una expresión intensa y sostenida del gene (Vila del Sol, *et al.* 2007). La región promotora del gene contiene dos regiones reguladoras: la

región proximal (- 48 a -209 pb), que tiene sitios de unión para NF- κ B y C/EBP; y la región distal (-913 y -1029) con sitios de unión para NF- κ B, STAT e IRF-3. La región distal incrementa la respuesta iniciada por la región proximal y la unión simultánea de todos los factores de transcripción mencionados, permiten el reclutamiento de coactivadores transcripcionales como CBP/p300 formando un complejo transcripcional sinérgico (Vila del Sol, *et al.* 2007).

Por otro lado, uno de los principales supresores de la expresión de NOS II es el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el cual inhibe la traducción del RNAm de NOS II y afecta su estabilidad, además de alterar la vida media de la enzima (Vodovotz, *et al.* 1993; Kutty, *et al.* 1995; Vuolteenaho, *et al.* 2005; Toshifumi, *et al.* 2005). Adicionalmente, se han descrito otras citocinas inhibitoras de la síntesis de NO como IL-4, IL-10 e IL-13, que pueden actuar de manera sinérgica (Panuska, *et al.* 1995; Bogdan, 2001) estas citocinas se asocian a una respuesta inmune tipo Th2 e inducen entre otras cosas la expresión de la enzima Arg-1 en macrófagos (Rath, *et al.* 2014), la cual afecta de manera indirecta la síntesis de NO debido a una competencia con NOS II por el sustrato L-arginina (Moraes, 2010). Adicionalmente, existen evidencias de que cuando disminuye la disponibilidad de L-arginina, se promueve la fosforilación del factor de iniciación de la transcripción eIF2 α , lo cual conduce a una inhibición de la traducción del RNAm de NOS II (Lee, *et al.* 2003). De esta manera, se conocen dos mecanismos acoplados a través de los cuales la enzima Arg-1, es capaz de modular la síntesis de NO a diferentes niveles. Finalmente, es importante mencionar que todos los cofactores son necesarios para una actividad enzimática óptima, por lo que cualquier alteración

que implique cambios en estas moléculas impactarán de manera directa la síntesis de NO (Hemrich, *et al.* 2005).

3.6 Persistencia viral

Para que un virus tenga éxito en establecerse de manera persistente, se debe lograr un equilibrio entre el patógeno y el hospedero, donde el virus pueda evadir la respuesta inmune destinada a eliminarlo y por otro lado que el huésped no muera por los efectos propios de la infección viral. Dentro de la persistencia viral es posible distinguir de manera general dos modalidades principales, una donde el virus se reproduce a títulos elevados por largos periodos, con la generación de complejos inmunes y mutaciones virales que promueven tolerancia inmunológica, por lo que el virus no puede ser eliminado y se conoce como infección crónica (Nathanson, 2007). Por otra parte, existe un tipo de persistencia denominada latencia, donde la expresión de genes virales es limitada y el genoma del virus se encuentra integrado al genoma de la célula huésped o en forma episomal sin multiplicarse. En cualquier momento, el virus puede cambiar su estado latente para multiplicarse durante periodos cortos y normalmente la vigilancia inmunitaria es competente para eliminarlo, sin embargo la integración al genoma del hospedero y las formas episomales le permiten mantenerse en la célula. Un tercer tipo de persistencia se caracteriza por una multiplicación viral a muy bajos niveles, el virus puede transmitirse de célula a célula y aunque la vigilancia inmune es potencialmente efectiva, mecanismos como la variación antigénica y la de “puentes intercelulares” favorecen la persistencia viral (Nathanson, 2007).

3.7 Probable persistencia del VSRh

Aunque la persistencia de este virus no se ha confirmado, diversos investigadores han aportado evidencias circunstanciales de que esto es posible. En estudios tanto *in vitro* como *in vivo* se ha observado que el VSRh es capaz de infectar células epiteliales, macrófagos, células NK, linfocitos y células mesenquimales, entre otras (Cheung, *et al.* 2016; Sarmiento, *et al.* 2002; Goritzka, *et al.* 2015; Qin, *et al.* 2011; Bohmwald, *et al.* 2016); relacionado a esto, se ha reportado la presencia del virus en tejidos extra pulmonares, que incluyen el sistema nervioso central, el corazón y el hígado de pacientes, lo que indica que existen más sitios potenciales donde el virus eventualmente podría establecerse de manera persistente (Piedimonte, 2015).

En 2010, se reportó la presencia de secuencias de RNA homólogas al genoma del VSRh en células estromales de médula ósea de donadores “sanos” (Rezaee, *et al.* 2011), por lo que se ha sugerido que estas células son sitios donde el virus puede persistir de manera latente debido a que se considera un sitio inmunoprivilegiado, donde el virus puede pasar desapercibido por periodos variables y eventualmente multiplicarse e infectar nuevamente al epitelio respiratorio. En este sentido, se ha propuesto que las disfunciones en las vías respiratorias que ocurren de manera crónica en pacientes después de una infección severa, podrían relacionarse con una posible persistencia viral (Schwarze *et al.* 2004; Piedimonte, 2015).

Las evidencias adicionales de una posible persistencia viral, son los siguientes: A) La detección del virus a través de RT-PCR en muestras de aspirados nasofaríngeos de

niños sanos incluidos como controles en estudios epidemiológicos (Singleton, *et al.* 2010; Wiertsema, *et al.* 2011) y B) El aislamiento de RNAm viral en tejidos pulmonares de niños post-mortem durante los meses de verano, en los cuales no es común la circulación del virus (Cubie, *et al.* 1997).

IV. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones virales persistentes son de gran interés desde el punto de vista clínico y biológico, ya que al estudiarlas se trata de explicar entre otros fenómenos, patologías crónicas provocadas por la presencia continua del virus en un organismo, pero también los mecanismos empleados por el virus para lograr coexistir con el hospedero modulando la respuesta inmune sin poner en peligro la sobrevivencia. En el laboratorio de la Dra. Gómez se logró el establecimiento de un modelo de infección persistente con el VSRh en macrófagos murinos de la línea celular P388D1, los cuales provienen de un neoplasma linfóide inducido por metil colantreno en un ratón de la cepa DBA/2 (Dawe, *et al.* 1957). Los macrófagos de esta línea fueron infectados a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 1 con el VSRh silvestre de la cepa A Long; inicialmente se observó un limitado número de sincicios y un elevado porcentaje de muerte celular durante las primeras 48 horas posteriores a la infección (Figura 6), sin embargo a partir de las 72h los macrófagos sobrevivientes comenzaron a proliferar y este cultivo se propagó durante algunos pases donde se determinó que del 40 al 60% de la población expresaban proteínas virales en su membrana celular (Sarmiento, *et al.* 2002).

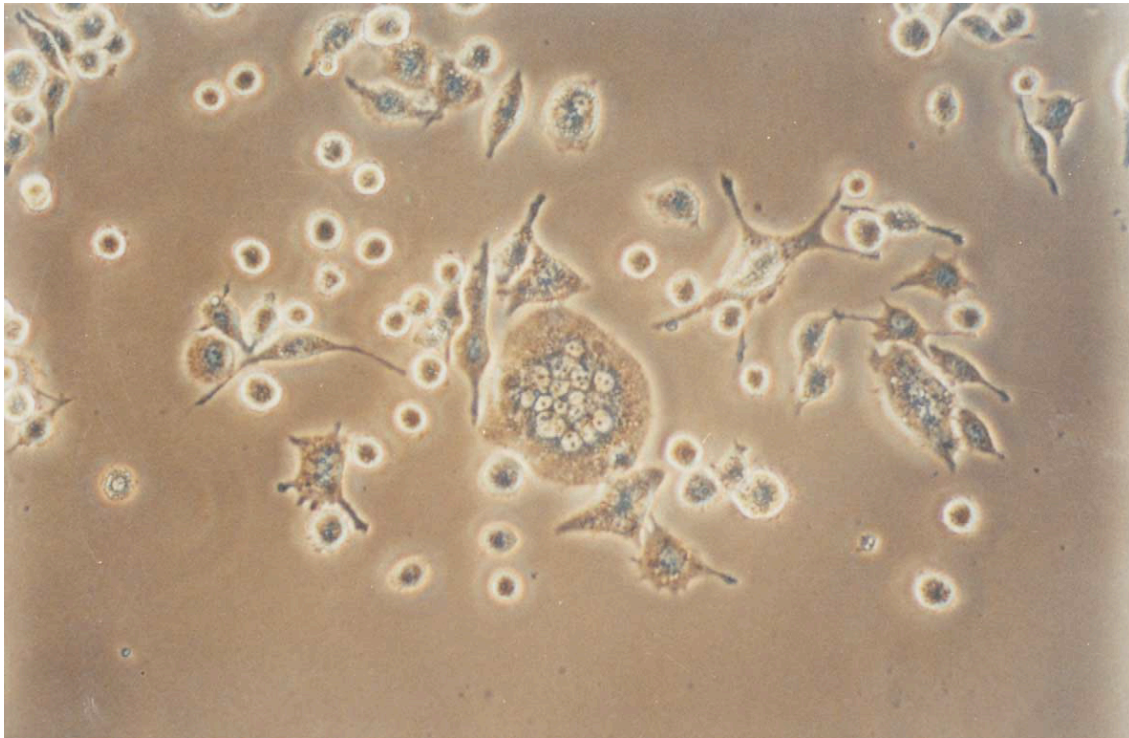


Figura 6. Cultivo de macrófagos P388D1, infectados con el VSRh en pase número 10. Observado a través de microscopio de contraste de fases con un aumento de 40X. Se observa la formación de un sincicio y células con diferente morfología, evidenciando el efecto citopático en pases tempranos de MφP (Tomado de Sarmiento, *et al.* 2002).

Posteriormente se realizó una clonación por dilución limitante y se re infectaron los clones obtenidos nuevamente a una m.o.i. de 1; a partir de este procedimiento el cultivo fue estable con una expresión de antígeno viral en mas del 90% de la población (MφP) (Sarmiento, *et al.* 2002). En la actualidad se han realizado mas de 100 pases del cultivo infectado y se conserva la expresión constitutiva del RNAm del gen viral “N” determinado por RT-PCR así como la síntesis de proteínas virales (N y F) evaluadas por inmunofluorescencia en mas del 90% de las células (Figura 7) y un bajo título de virus infectivo extra celular ($2.69 \times 10^2 \pm 205$ TCID₅₀/ml) (Rivera-Toledo, *et al.* 2017).

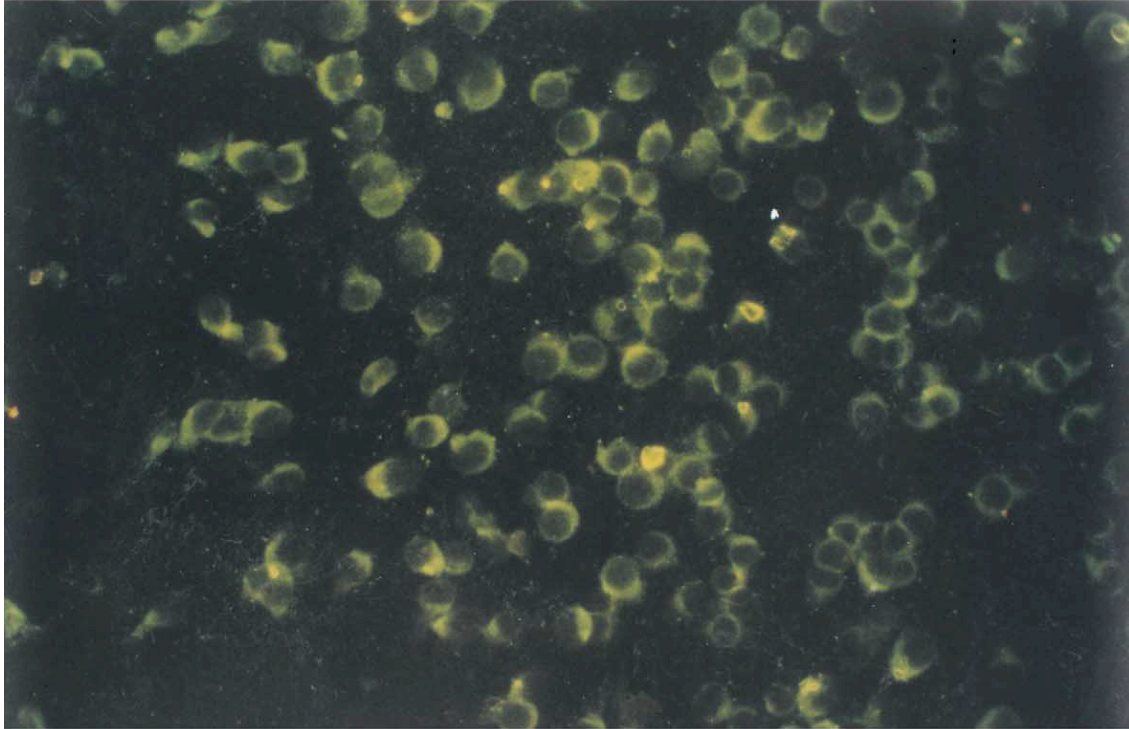


Figura 7. Expresión de antígeno viral en M ϕ P. Las células fueron fijadas e incubadas con un anticuerpo primario contra el VSRh hecho en conejo, posteriormente las células se incubaron con el anticuerpo secundario IgG anti conejo hecho en burro, acoplado a fluoresceína. La imagen fue adquirida en un microscopio de epifluorescencia Diaphot de Nikon con un aumento de 10X (Tomado de Sarmiento, *et al.* 2002).

Adicionalmente, se han detectado cambios en la proteína F del virus proveniente del cultivo persistente que se asocian con una disminución en la actividad fusogénica y la frecuencia de sincicios, así como con el bajo título viral observado en sobrenadantes del cultivo M ϕ P (Sarmiento, *et al.* 2009). Por otra parte la fagocitosis mediada por receptores Fc γ (Fc γ R), se encuentra incrementada de 3 a 6 veces respecto a macrófagos no infectados (M ϕ N), lo cual se asoció a un aumento en la expresión de receptores Fc γ RII y Fc γ RIII en la membrana celular de M ϕ P (Guerrero-Plata, *et al.* 2001); adicionalmente la fagocitosis independiente de anticuerpos también se encuentra alterada, ya que la eficiencia para fagocitar la bacteria *Haemophilus influenza*

no tipificable (HiNT) disminuyó significativamente en M ϕ P, relacionado con una disminución en la expresión del receptor de la membrana celular ICAM-1, el cual sirve como ligando de unión a la bacteria (Arrevillaga, *et al.* 2012). En cuanto a la actividad para presentar antígenos, se determinó que los M ϕ P tienen un incremento en la expresión de los alelos K y D del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I), lo cual se correlaciona con un eficiente procesamiento y presentación de antígenos específicos tanto del VSRh como de un péptido derivado de la nucleoproteína del virus de influenza (NP147-155) a células T CD8⁺ (Guerrero-Plata, *et al.* 2004). Se ha observado que la síntesis de citocinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α , se encuentran incrementadas significativamente respecto a M ϕ N (Guerrero-Plata, *et al.* 2001; Del Moral, *et al.* 2018) lo que sugiere que la infección persistente mantiene a los macrófagos en un estado activado permanentemente. Otro aspecto en el que se observó alteración por la infección persistente es la apoptosis; mientras que los M ϕ N son susceptibles a la muerte celular con el inhibidor de proteínas cinasas estaurosporina, los M ϕ P se mantuvieron viables en más del 75% de la población (Nakamura-López, *et al.* 2011), lo cual fue correlacionado con una disminución en la síntesis de pro-caspasa 9 y un aumento en la expresión de las proteínas anti apoptóticas Bcl-2, Bcl-x y XIAP. Esto último se considera crucial ya que la inhibición de la vía intrínseca de apoptosis favorece la supervivencia de la célula y el mantenimiento del virus (Nakamura-López, *et al.* 2011).

Dadas las características del modelo de infección persistente, nos pareció interesante evaluar una molécula importante en la respuesta inmune innata con actividades anti virales, como el óxido nítrico (NO), el cual es sintetizado como

respuesta a la infección aguda de células epiteliales (Tsutsumi, *et al.* 1999; Kao, *et al.* 2001; Kilani, *et al.* 2004; Song, *et al.* 2009). Debido a que el VSRh también infecta macrófagos y estos son mediadores importantes de la respuesta inmune, nos propusimos estudiar la síntesis del NO en el contexto de una infección aguda y una infección persistente, la cual resulta de particular interés ya que se ha demostrado que la continua presencia del genoma viral induce cambios en la expresión de genes celulares, lo cual podría interferir en el proceso de una respuesta exitosa para lograr la eliminación del virus.

V. HIPÓTESIS

La infección crónica del VSRh en macrófagos, altera la producción del óxido nítrico, impidiendo la respuesta antiviral, lo cual favorece la persistencia del virus.

VI. OBJETIVOS

- A) Evaluar la síntesis de NO en macrófagos murinos, en el contexto de una infección aguda (M ϕ A) y una infección persistente con el VSRh (M ϕ P).
- B) Comparar la expresión de NOS II a nivel de RNAm y proteína en M ϕ A y M ϕ P.
- C) Estimar el impacto de la producción de NO en la multiplicación del genoma viral en M ϕ A y M ϕ P.
- D) Estudiar la participación de Arg-1 en la modulación de la producción de NO en M ϕ A y M ϕ P.

VII. METODOLOGÍA

7.1 Líneas celulares

La línea celular murina P388D1 (American Type Culture Collection ATCC: CCL-46, obtenida por Dawe y Potter en 1957, presenta características de macrófagos maduros y estables (Koren, *et al.* 1975). Los macrófagos persistentemente infectados con el virus sincicial respiratorio (MφP), se obtuvieron y caracterizaron en nuestro laboratorio (Sarmiento, *et al.* 2002). El porcentaje de células que expresan antígeno viral en el cultivo, varía entre el 90% y el 98%, mientras que el virus infeccioso presente en los sobrenadantes es de $2.69 \times 10^2 \pm 205$ TCID₅₀/mL en promedio, como se reportó previamente (Rivera-Toledo, *et al.* 2017).

Los cultivos celulares de macrófagos se mantuvieron y se propagaron en medio RPMI 1640 (GIBCO/BRL, Grand Island, NY), con Suero Fetal Bovino (Biowest, Veracruz, México) al 5% v/v, suplementado con penicilina (100 UI/mL) y estreptomina (100 mg/mL) (In vitro S.A., México), y 1×10^{-6} M de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO, USA).

La línea celular epitelial HEP-2, se propagó en medio DMEM (GIBCO/BRL Grand Island, NY), con Suero Fetal Bovino (Biowest, Veracruz, México) al 5% v/v y suplementado con penicilina (100 UI/mL) y estreptomina (100 mg/mL) (Invitro S.A., México), 0.2 % de NaHCO₃ y 10 mM de HEPES (Sigma, St. Louis, MO, USA). Las células HEP-2 se utilizaron para propagar y titular el virus por el método de dilución limitante y determinar la dosis infecciosa que afecta al 50% del cultivo (TCID₅₀).

7.2 Virus e infección aguda

El virus sincicial respiratorio de la cepa Long (ATCC, VR-26) utilizado en este trabajo, fue una donación del Dr. Michael Trudel (Institute Armand-Frappier, Montreal, Canadá).

La infección aguda (MφA) se logró al adicionar $10^{6.3}$ TCID₅₀/0.25 mL de virus a 1×10^6 MφN durante 2 horas (37°C, 5% de CO₂). Después de la adsorción viral, se eliminó el inóculo y se añadió RPMI suplementado y se permitió el progreso de la infección durante diferentes tiempos.

7.3 Microscopía de contraste de fases

Se realizó el seguimiento de los cultivos celulares mediante microscopía de luz, con la finalidad de evaluar cambios morfológicos y el efecto citopático generado por la infección del VSRh. Las células se observaron a través de un microscopio invertido de contraste de fases (Nikon, Kogaku, Japón) con un aumento de 10X y se obtuvieron imágenes con la cámara digital Canon EOS Rebel T3 (Canon, USA) a 12, 24, 48 y 72 horas de cultivo.

7.4 Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó por el método de exclusión con el reactivo 7-amino-actinomicina D (7-AAD, Sigma, St. Louis, MO, USA) mediante citometría de flujo. Las células provenientes de cultivos de 24, 48 y 72 horas se resuspendieron en PBS y se

centrifugaron a 1,500 rpm/3 minutos a 4°C, posteriormente, las células se resuspendieron en 500 µl de PBS frío y se adicionó el reactivo 7-AAD a una concentración final de 0.5µg/mL. Las muestras se incubaron a 4°C durante 15 minutos y posteriormente se realizó la adquisición de fluorescencia en un citómetro FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA), utilizando el canal de detección FL3-H.

Como control positivo a la incorporación de 7-AAD, se utilizaron células permeabilizadas con acetona/metanol (1:1) por 5 minutos en hielo, posteriormente se lavaron e incubaron con 7-AAD durante 15 minutos. Los resultados se analizaron con el software CellQuest pro (Becton Dickinson, Biosciences, San Jose, CA, USA) y se presentan como porcentaje de células viables por cada tiempo de incubación.

7.5 Detección de antígeno viral

La expresión de antígeno viral del VSRh se determinó mediante citometría de flujo. 5×10^5 células, se colocaron en tubos Eppendorf de 0.6mL y se fijaron con 100 µL de una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm durante 3 minutos y se lavaron con 200 µL de PBS. Las células se resuspendieron en 100 µL de una solución de saponina al 1% en PBS y se incubaron a 37°C durante 15 minutos, posteriormente, se realizó un lavado con PBS y las células se resuspendieron en solución de bloqueo (PBS al 5% de suero de neonato bovino), en la cual se mantuvieron durante 30 minutos a 4°C. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 50 µL de una solución 1:10 del anticuerpo

policlonal contra RSV conjugado con FITC (IMAGEN Respiratory Syncytial Virus, OXOID K610211-2A), manteniéndolas por 45 minutos a 4°C, protegidas de la luz. Después se centrifugaron y se lavaron en dos ocasiones sucesivas con PBS y finalmente las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Los resultados se analizaron con el software WinMDI 2.8 y se representaron gráficamente como porcentaje de células que expresan antígeno viral e intensidad media de fluorescencia.

7.6 Cuantificación 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 (Sigma, St. Louis, MO, USA). La reacción se hizo en una placa de fondo plano de 96 pozos, en cada pozo de la placa se incubaron 50 µL de sobrenadantes provenientes de cultivos de MφN, MφA, y MφP, se adicionaron 50 µL de una solución de sulfanilamida (1% en una solución al 5% de ácido fosfórico) y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Posteriormente se agregaron 50 µL de la solución NED (naftil-etilen-diamina dihidrocloruro al 0.1%) a cada uno de los pozos y se incubaron nuevamente por 5 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente; la reacción de Griess generó un producto de color púrpura/magenta, que se analizó en un lector de placas (Benchmark Plus, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a una longitud de onda de 535nm.

Cada determinación se realizó por triplicado y la concentración de nitritos totales de las muestras se calculó utilizando una curva estándar de nitrito de sodio que se analizó simultáneamente al momento de cuantificar las muestras.

7.7 Determinación de NO

La síntesis de óxido nítrico se realizó mediante citometría de flujo, empleando el reactivo Diaminofluoresceína-2/Diacetato (DAF-2/DA) (Sigma, St. Louis, MO, USA). El DAF-2/DA entra a las células por difusión pasiva y cuando las esterasas citoplásmicas lo procesan, reacciona con el óxido nítrico, generando una emisión de fluorescencia en longitud de onda de 515 nm. La determinación se realizó con 5×10^5 células distribuidas en placas de 12 pozos fondo plano con una solución de DAF-2/DA $10 \mu\text{M}$, diluido en medio RPMI suplementado con 5% de SFB. Las placas se protegieron de la luz y se incubaron por diferentes tiempos a 37°C y 5% de CO_2 . Posteriormente las células se despegaron por pipeteo y se centrifugaron en tubos de citometría a 1000 rpm por 3 minutos, posteriormente se hicieron dos lavados con PBS para eliminar el exceso de DAF-2/DA y se adquirieron en un citometro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). El análisis de estas determinaciones se realizó con el software WinMDI 2.8 y los resultados obtenidos se expresaron como veces de incremento respecto al cultivo de $\text{M}\phi\text{N}$.

7.8 Western blot

Los ensayos de inmunodetección se realizaron con extractos de proteína total de MφN, MφA y MφP, la extracción de proteína se llevo a cabo con Buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, Desoxicolato de sodio 0.5%, Dodecilsulfato sódico SDS 0.1%) al cual se le adicionó 10 µl del cocktail de inhibidor de proteasas Complete (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) por cada mililitro de Buffer. De los extractos obtenidos, se cargaron 40µg de proteína por carril en geles de poliacrilamida de gradiente de concentración (NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel, Invitrogen) y se aplico una corriente eléctrica de 200 voltios por 60 minutos. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore Corporation) en una cámara de transferencia húmeda durante 60 minutos con una corriente de 30 voltios.

Una vez confirmada la transferencia, la membrana se sumergió en solución de bloqueo (PBS al 5% de leche descremada, libre de grasa) y se agitó durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se lavó en agitación constante (3X) con solución de lavado (TBS al 0.1% de Tween-20) y se incubó con alguno de los siguientes anticuerpos primarios: anti-NOS II (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) o anti Arg-1 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) durante toda la noche a 4°C en agitación constante diluidos en la solución de lavado al 2.5% de leche libre de grasa. Al día siguiente la membrana se lavó tres veces y se incubó por dos horas con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con peroxidasa (Jackson Immuno

Research; West Grove, PA, USA) a una dilución de 1:25,000 en la solución de lavado al 2.5% de leche libre de grasa, finalmente la membrana se lavó (3X) y se reveló por quimioluminiscencia con método manual con el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Posteriormente la membrana se trató para desprender los anticuerpos y se repitió el proceso de detección con el anticuerpo contra β -Tubulina (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) como control de carga. Las imágenes de las membranas se adquirieron en un trans iluminador ChemiDoc XRS (Bio-Rad®) y se analizaron con el software Quantity One (Bio-Rad®). Los valores de densitometría se normalizaron con respecto a β -Tubulina.

7.9 RT-PCR tiempo real

La extracción de ARN total, se realizó con el kit Hybrid-R MiniPrep kit (GeneAll, Seoul, Korea) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El DNAc, se sintetizó en un tubo Eppendorf de 0.6 mL con 2 μ g de RNA total al que se le adicionó Oligo (dT) 12-18 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y la enzima Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la reacción de amplificación de los genes NOS II, Arg-1 y GAPDH se emplearon sondas TaqMan® (Assay on Demand 20X mix Applied Biosystems), se utilizó la universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La reacción de amplificación se llevó a cabo en placas de polipropileno de 96 pozos en un equipo de PCR Tiempo Real StepOne plus (Applied Biosystems), bajo las condiciones establecidas por el fabricante.

Los resultados obtenidos se analizaron con el software v2.2.2 Relative Quantitation (Applied Biosystems) y la cantidad relativa del RNAm para cada gene se calculó por el método $2^{\Delta\Delta Ct}$, al normalizar respecto al gen endógeno (GAPDH). Los resultados se graficaron como el promedio de tres experimentos independientes.

7.10 Cuantificación del genoma viral

La extracción de RNA se realizó por el método descrito previamente. El ensayo de número de copias del genoma viral se llevó a cabo empleando el kit Nucleocapsid gene Genesig Standard kit for Respiratory Syncytial Virus type A (Primer Design Ltd, Chandler's Ford, UK). Cada muestra fue ajustada para adicionar 100ng de RNA total por reacción y el número de copias se calculó mediante una curva estándar de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La reacción de amplificación se llevó a cabo en el equipo StepOne plus (Applied Biosystems), bajo las condiciones establecidas por el proveedor. Los resultados obtenidos se analizaron con el software v2.2.2 (Applied Biosystems) y se graficaron como número de copias del genoma viral.

7.11 Ensayo de la actividad de arginasa

Se sembraron 1×10^6 células de M ϕ N, M ϕ A y M ϕ P en placas de fondo plano de 12 pozos y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante toda la noche. Al día siguiente, el medio de cultivo se reemplazó y los cultivos se mantuvieron durante 12, 24, 48 y 72 h. Al término de cada tiempo, se extrajo la proteína total en 150 μ L de

solución de lisis (0.1% Tritón X-100 en agua bidestilada), y se añadió un volumen equivalente de Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, seguido de 25µL de cloruro de manganeso 10 mM por muestra. Los lisados celulares se almacenaron a -70 °C hasta que se realizó la determinación de la actividad de arginasa. Un volumen de 50 µL de cada muestra se incubó a 56 °C durante 10 min, posteriormente se añadieron 50 µL de L-arginina 0.5 M (pH 9.7) y la muestra se incubó a 37 ° C durante 60 min. Al término del tiempo indicado, se detuvo la reacción por la adición de 400 µl de una mezcla de ácido fosfórico y ácido sulfúrico y 20 µl de una solución de alfa-isonitrosopropiofenona (α-ISPP) al 6%, finalmente la absorbancia fue cuantificada en una microplaca con el espectrofotómetro Benchmark Plus. (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) A una longitud de onda de 540 nm. Las determinaciones se realizaron en triplicado, y la actividad arginasa en cada muestra se calculó de acuerdo a una curva estándar hecha con urea y se expresó como U/mL de producto.

7.12 Inhibición de la actividad de arginasa

Se sembraron 1×10^6 MφP en placas de 12 pozos de fondo plano y se agregó el inhibidor de arginasa nor-NOHA (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) a una concentración de 100 µM, posteriormente las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 12, 24, 48 y 72 horas, terminado el tiempo establecido, se colectaron los sobrenadantes para cuantificar la concentración de nitritos y las células se lisaron como se describió previamente para evaluar la actividad de arginasa.

7.13 Determinación de L-arginina

La cuantificación de L-arginina se realizó en los sobrenadantes de cultivos de MφP control y tratados con el inhibidor de arginasa nor-NOHA, mediante cromatografía líquida, acoplada a espectrometría de masas en tándem de ionización por electro pulverización (LC-ESI-MS/MS), en un equipo Quattro micro API espectrómetro con un kit comercial (NeoBase no derivatizado MSMS Kit; Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.). La concentración de metabolitos se realizó mediante el uso de estándares internos como referencias. El análisis estadístico se realizó con el software MetaboAnalyst.22 y se utilizó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLSDA) e importancia variable en la proyección (VIP).

7.14 Análisis estadístico

Los resultados graficados representan el promedio de tres experimentos independientes, con sus correspondientes desviaciones estándar y las diferencias entre tratamientos se consideraron significativas cuando se obtuvo una $p < 0.05$ al realizar la prueba estadística t de Student. Las gráficas y las pruebas estadísticas se realizaron con el software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

VIII. RESULTADOS

8.1 Cultivo celular y detección de antígeno viral

Inicialmente se realizó un seguimiento de M ϕ N, M ϕ A y M ϕ P y se documentó mediante microscopía de contraste de fases, la morfología celular, el estado de confluencia y el desprendimiento de la monocapa durante 72 horas de incubación. Los M ϕ N no mostraron cambios observables en su morfología durante el estudio, la monocapa alcanzó confluencia del 100% a las 48 horas de cultivo y a pesar de mantener el cultivo hasta las 72 horas, no se observó desprendimiento celular (Figura 8). Por otra parte los macrófagos infectados de forma aguda mostraron una confluencia celular máxima de un 80% aproximadamente a las 48 horas post infección (hpi), y a partir de este tiempo se empezaron a observar cambios en la morfología celular, se presentó alargamiento en un 40% de la población, aproximadamente y redondeo en el 60% restante. A las 72 hpi se observó una confluencia celular disminuida de 60% aproximadamente, debido a que las células redondeadas comenzaron a desprenderse, lo que evidenció un claro efecto citopático. A pesar de los cambios descritos, no se evidenció la formación de sincicios que son característicos por la infección aguda de este virus en células epiteliales.

Es importante tomar en cuenta que los macrófagos son una estirpe celular que soportan todo el ciclo de infección por el VSRh y se ha reportado una infección productiva donde es posible obtener virus infecciosos (Panuska, *et al.* 1990). En los

macrófagos infectados persistentemente se detectó una confluencia celular de 50% a las 24 horas de cultivo, que se incrementó a un 70% aproximadamente a las 72 horas y no se detectó desprendimiento de la monocapa durante el estudio. La morfología celular observada en este cultivo fue esférica predominantemente y a medida que transcurrió el tiempo de incubación se observó un ligero cambio hacia una forma estrellada en un pequeño porcentaje de la población.

En cuanto a la determinación de antígeno viral, los M ϕ N presentaron un porcentaje menor al 1% de células positivas a isotiocianato de fluoresceína (FITC), debido quizá a cierta inespecificidad del anticuerpo o por falta de eficacia en el lavado de la muestra, ya que estas células no estuvieron en contacto con el virus o algún producto de este. Los M ϕ A expresaron antígeno viral en el 22% de la población a las 24 hpi y conforme progresó el estudio, el porcentaje de células positivas al antígeno se incremento de manera paulatina hasta alcanzar un máximo de 56% a las 72 hpi. Por otra parte, los M ϕ P expresaron antígeno viral en más del 95% de las células durante todo el estudio (Figura 9a).

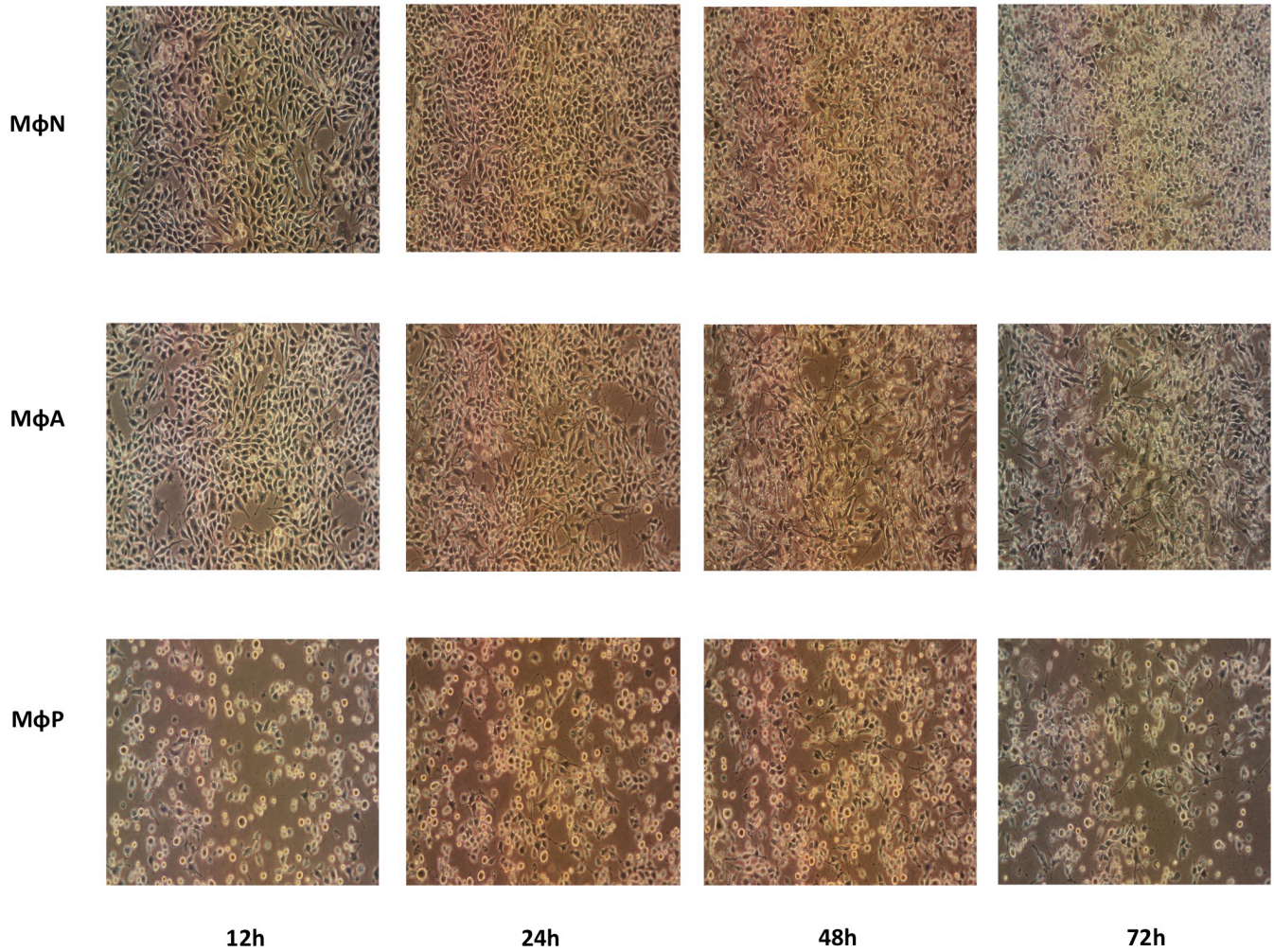


Figura 8. Monitoreo de la infección viral durante el estudio. Progresión y seguimiento de los cultivos mediante microscopía de contraste de fases durante 72 horas, con un aumento 10X, se observa la confluencia celular y cambios morfológicos en macrófagos infectados en forma aguda (MφA) y macrófagos infectados persistentemente con el VSRh (MφP), respecto a macrófagos no infectados MφN.

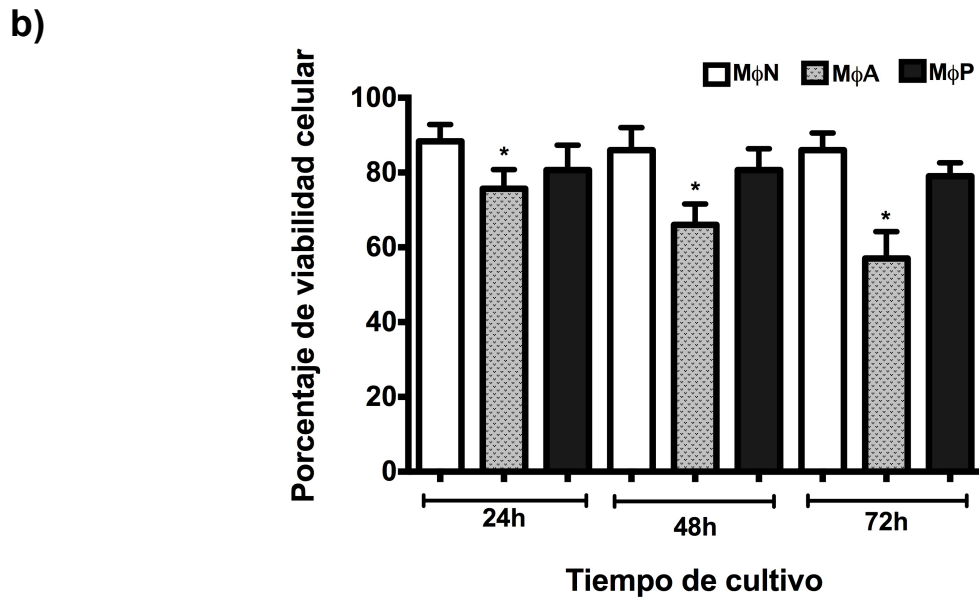
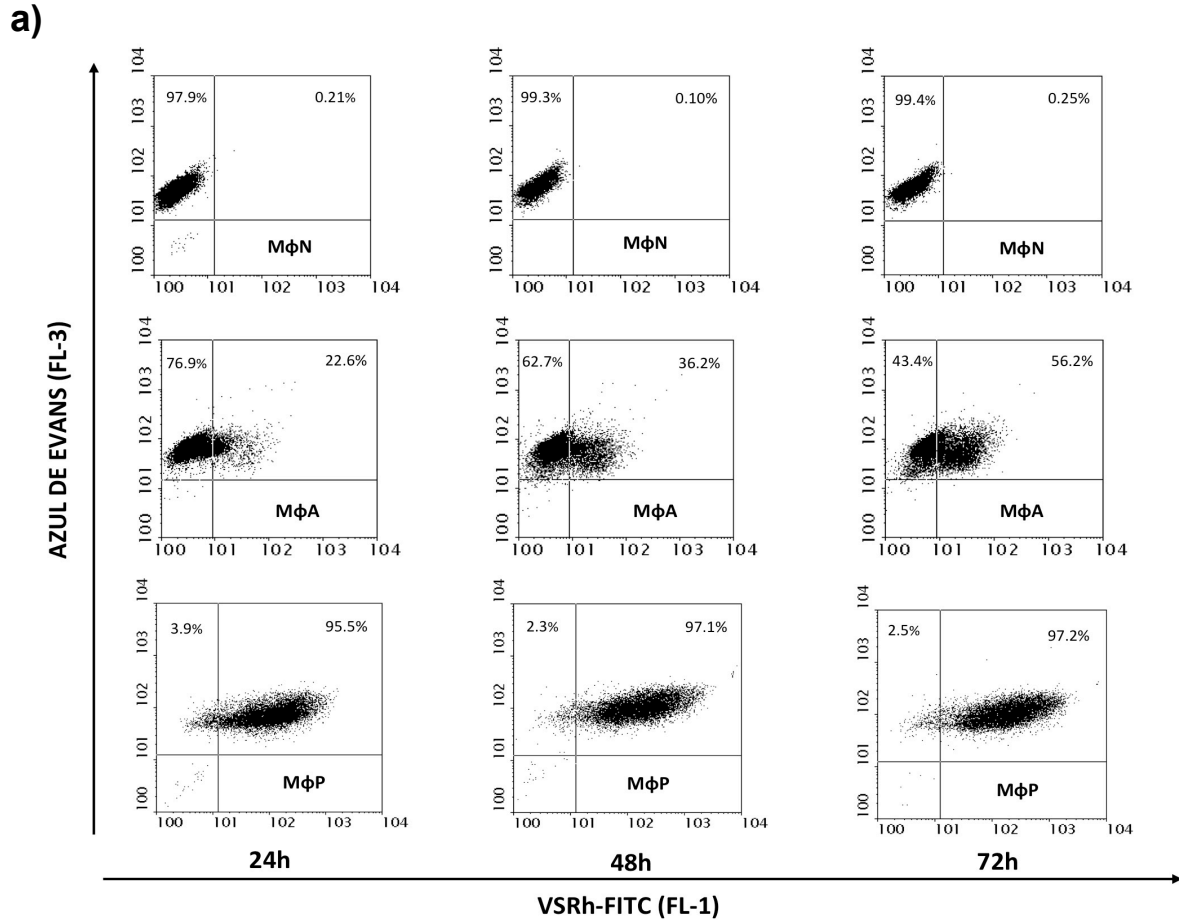


Figura 9. Evaluación de la infección viral. a) Expresión de antígeno viral del VSRh determinado por citometría de flujo en MφN, MφA y MφP. b) Determinación de viabilidad por ensayo de exclusión con 7AAD, mediante citometría de flujo. Se gráfica el promedio de tres determinaciones independientes. Las diferencias significativas respecto MφN se denotan por (*) $p < 0.05$.

Un detalle que es importante señalar es que las células que expresaron antígeno viral en la infección aguda conformaron una subpoblación homogénea en cuanto a intensidad de fluorescencia menor a 100 unidades, indicando una baja expresión de proteínas virales, en contraste los MφP presentaron una marcada heterogeneidad en la intensidad de fluorescencia, con un valor mínimo de 10 y un valor máximo de 1,000 unidades de fluorescencia, lo que indica que existen células en el cultivo persistente que tienen disminuida la síntesis de proteínas virales y otras que tienen alta expresión de estas proteínas, como lo demuestra la dispersión en la población de MφP en la figura 9a, donde la intensidad de fluorescencia varía considerablemente.

8.2 Viabilidad celular.

La viabilidad celular en MφP se conservó alta durante todo el experimento, con casi el 80% de células viables después de 72 h (Fig. 9b). En contraste, la infección aguda produjo un importante efecto citopático y disminuyó significativamente la viabilidad celular a partir de las 24 hpi respecto al cultivo no infectado, la afectación del cultivo se incrementó con el tiempo de infección obteniendo únicamente un 58% de células viables en promedio después de 72 hpi.

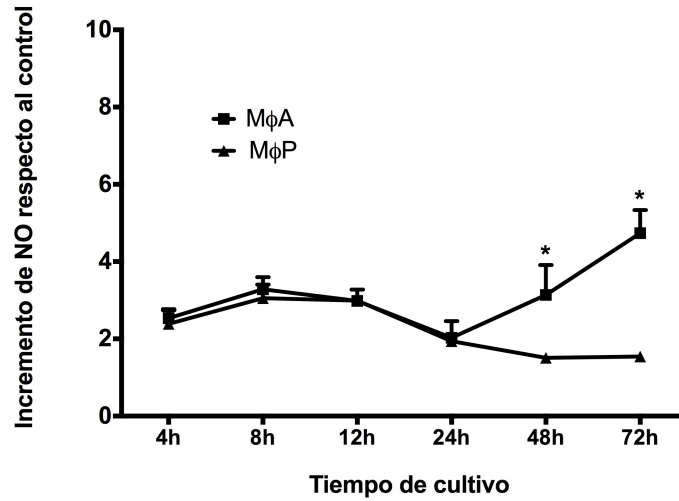
8.3 Concentración de NO y número de copias del genoma viral.

El NO se detectó con el reactivo DAF-2/DA mediante citometría de flujo, la infección persistente indujo un incremento del doble en la concentración de NO respecto al

cultivo no infectado a partir de las 4 horas, y hasta las 24 horas de cultivo. A 48 y 72 horas de cultivo, el incremento fue de 1.50 y 1.54 respectivamente, por lo que se mantuvo hasta el final del estudio (Figura 10a). Por otra parte la infección aguda provocó un aumento en la producción de NO respecto a MφN, similar a la observada en MφP durante las primeras 24 hpi, mientras que a las 48 y 72 horas aumentó a un factor de 3.1 y 4.7 respectivamente. Justo a 48 y 72 hpi, los MφA presentaron diferencia significativa también respecto a los MφP, lo que indica una diferencia en la regulación de la síntesis de NO dependiente del tipo de infección. La dinámica de la replicación del genoma del VSRh se determinó en ambos cultivos infectados mediante RT-PCR tiempo real, estimando el incremento con respecto al nivel del genoma en MφA a 4 hpi (calibrador). El cultivo de MφA mostró un aumento progresivo en los niveles del genoma viral durante las primeras 24 hpi (178 veces), seguido de una disminución del 50% a 48 hpi (Fig. 10b). En contraste, después de 4 h de cultivo, los MφP mostraron niveles muy altos de RNA genómico viral y se observó un aumento constante dependiente del tiempo de 374 veces al comienzo del ensayo (4h) hasta 4273 veces a las 72 h de cultivo.

Es interesante notar que la síntesis de NO en la infección aguda mantiene una correlación negativa con respecto al número de copias del virus, ya que conforme progresa la infección, se incrementa la síntesis de NO y la cantidad del virus se ve disminuía, lo cual sugiere un control parcial de la multiplicación viral en MφA. Por otro lado, en la infección persistente, la cantidad de genoma viral no se redujo respecto al tiempo, en cambio se observa un incremento indicando una multiplicación activa.

a)



b)

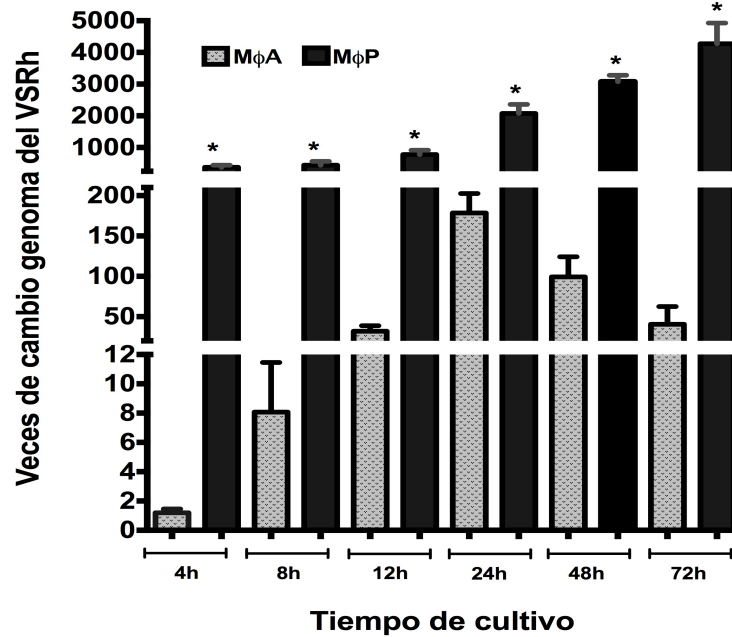


Figura 10. Producción de NO y cuantificación del genoma viral. a) Determinación de óxido nítrico con diacetato de diamofluoresceína (DAF-2/DA) mediante citometría de flujo en MφN, MφA y MφP a diferentes tiempos. Las diferencias significativas respecto a MφN se notan por (*) y Las diferencias entre MφA y MφP se denotan por (**) $p < 0.05$. b) Número de copias del genoma viral durante la infección aguda y persistente determinado mediante RT-qPCR. Las diferencias significativas entre MφA y MφP se denotan por (*) $p < 0.05$.

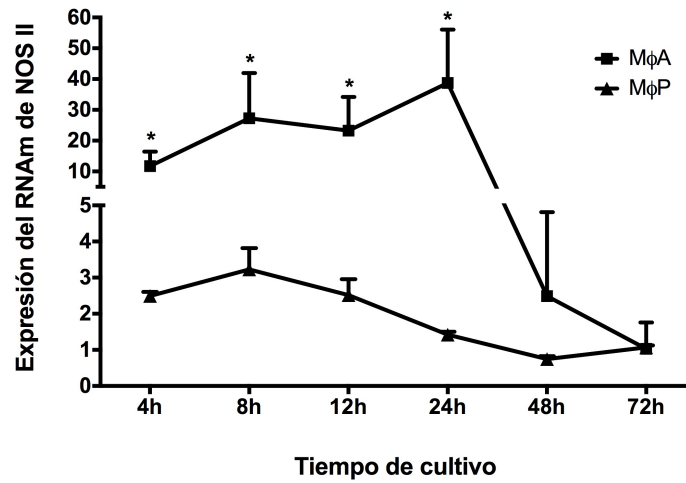
8.4 NOS II, determinación de RNAm y proteína.

En función de los resultados previos decidimos evaluar la expresión de NOS II, que es la principal enzima que sintetiza NO como parte de la respuesta antiviral en macrófagos, por lo tanto se determinó la cinética de expresión del RNAm por medio de RT-PCR tiempo real. El cultivo de M ϕ N se utilizó como muestra calibrador y la estimación de la expresión relativa de M ϕ A y M ϕ P se calculó para cada uno de los tiempos reportados, mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Observamos que la infección persistente indujo un incremento significativo en la expresión del RNAm de NOS II durante las primeras 24 horas del ensayo respecto a M ϕ N, sin embargo a partir de las 48 horas la expresión fue similar en ambos cultivos (Figura 11a). Por otra parte, la infección aguda provocó un incremento significativo del RNAm de NOS II respecto a M ϕ N y M ϕ P durante las primeras 24 hpi, tiempo justo donde se registro el máximo nivel de expresión. Posterior a este tiempo el RNAm de M ϕ A disminuyó considerablemente hasta alcanzar una expresión similar a la observada en M ϕ N y M ϕ P a las 72 hpi. Es importante señalar que el factor de incremento en M ϕ A respecto a M ϕ N en las primeras 24 horas fue del orden de 10 (4 hpi) a 40 (24 hpi) veces; por otra parte el máximo factor de incremento de M ϕ P respecto a M ϕ N fue de 3 y ocurrió las 8 horas de cultivo, lo que indica una diferente magnitud de inducción del NO dependiendo del tipo de infección.

La proteína NOS II se determinó mediante Western blot y se observó muy poco abundante en M ϕ N durante las primeras 12 horas del cultivo; a partir de las 24 horas se detectó un incremento y esta se mantuvo constante hasta el final del estudio.

En concordancia con los resultados del RNAm, la infección aguda indujo un incremento gradual en la abundancia de la proteína NOS II respecto a MφN, alcanzando su máximo nivel a las 24 hpi. Posterior a este tiempo, la abundancia disminuyó considerablemente hasta desaparecer prácticamente a las 72 hpi (Figura 11b). La infección persistente presentó una cinética de inducción de NOS II similar a la descrita en MφA, donde la máxima abundancia de la proteína se obtuvo también a las 24 horas y posteriormente disminuyó de manera importante a las 72 horas.

a)



b)

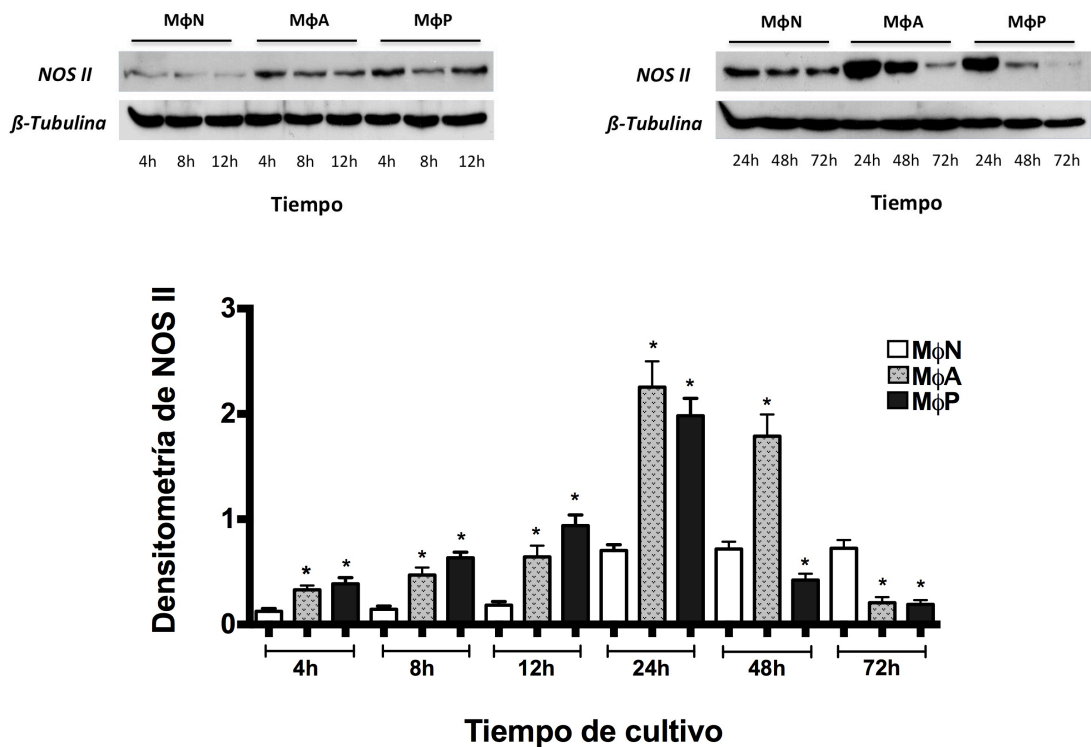


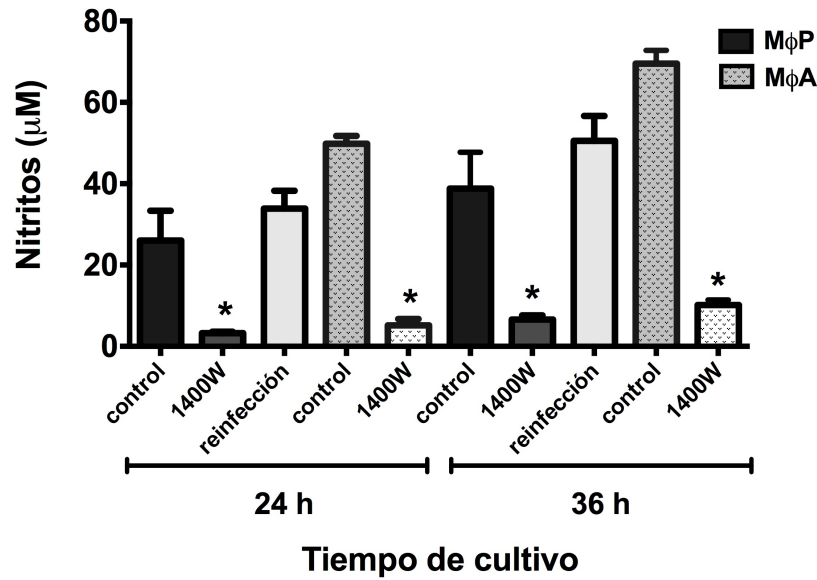
Figura 11. Expresión del RNAm y proteína de NOS II. a) La determinación se hizo mediante RT-PCR y se analizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se presenta el promedio de tres experimentos independientes y las diferencias significativas entre cultivos se denotan por (*) $p < 0.05$. b) Determinación de la abundancia de la proteína mediante Western blot a diferentes tiempos de cultivo, el análisis densitométrico se realizó tomando en cuenta tres experimentos independientes y las diferencias significativas respecto a MφN se denotan por (*) $p < 0.05$.

8.5 Inhibición de la actividad de NOS II y su impacto en la multiplicación viral.

Tomando en cuenta los resultados previos, donde la producción de NO en M ϕ P se encuentra disminuida respecto a M ϕ A a pesar de tener una abundancia de la proteína NOS II equivalente (excepto a las 48h), se propuso evaluar la actividad enzimática de manera indirecta a través de cuantificar la concentración de nitritos en sobrenadantes de los cultivos. Como un control, utilizamos al reactivo 1400W, el cual es un análogo de L-arginina que inhibe de manera selectiva la actividad enzimática de NOS II. Adicionalmente re infectamos una muestra de M ϕ P a una m.o.i. de 1, con la finalidad de evaluar si el cultivo persistente es capaz de incrementar la producción de NO ante el estímulo del virus silvestre.

Los resultados muestran un incremento en la concentración de nitritos respecto al tiempo en los cultivos de M ϕ P y M ϕ A, sugiriendo que la NOS II se encuentra activa en ambos casos (Figura 12a). Cuando inhibimos la actividad de NOS II, logramos reducir la concentración de nitritos en el sobrenadante de M ϕ P de 26 μ M a 3.2 μ M después de 24 horas y de 38.7 μ M a 5.9 μ M al cabo de 36 horas. En la infección aguda, se detectó mayor concentración de nitritos respecto a la infección persistente en concordancia con los resultados reportados en la determinación de NO por citometría de flujo, así como una reducción de 49.8 μ M a 5.1 μ M (24 hpi) y de 69.5 μ M a 10.1 μ M (36 hpi) al incubar con el inhibidor 1400W. Estos resultados implican que la NOS II fue inhibida de manera efectiva y esto provocó una disminución en la síntesis de NO en ambos cultivos.

a)



b)

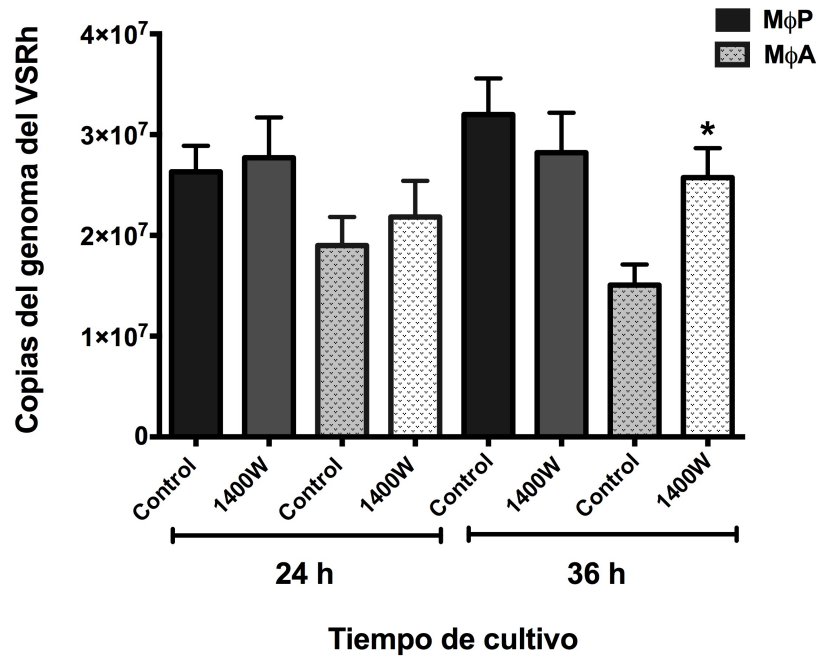


Figura 12. Inhibición de la actividad de NOS II. a) Determinación de la concentración de nitritos a través de la reacción de Griess en sobrenadantes de cultivos de MφA y MφP con y sin el inhibidor 1400W, así como MφP reinfecidos con el virus silvestre a una m.o.i. de 1. b) Cuantificación del genoma viral mediante RT-qPCR. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes y una diferencia significativa respecto a su control correspondiente se indican con (*) $p < 0.05$.

Con respecto al número de copias del VSRh durante la infección aguda, observamos que la inhibición de la actividad de NOS II se asoció a un incremento en el número de copias del genoma viral, el cual fue estadísticamente significativo a las 36 hpi (Figura 12b), lo que sugiere que el NO generado durante la infección aguda participa en el control de la multiplicación viral como se ha descrito en múltiples trabajos (Bi, *et al.* 1995; Lin, *et al.* 1997; Rimmelzwaan, *et al.* 1999; Saura, *et al.* 1999; Ali-Ahmad, *et al.* 2003; Akerstrom, *et al.* 2005; Wei, *et al.* 2009; Abdul-Cader, *et al.* 2016). Por otra parte, en el cultivo de infección persistente, no se observó cambio estadísticamente significativo en el número de copias del genoma viral a las 24 h y 36 h con el inhibidor 1400W. Estos resultados nos sugieren que durante la infección persistente, la síntesis “basal” de NO es incapaz de interferir la multiplicación del genoma viral, lo que favorece la permanencia del virus en forma crónica.

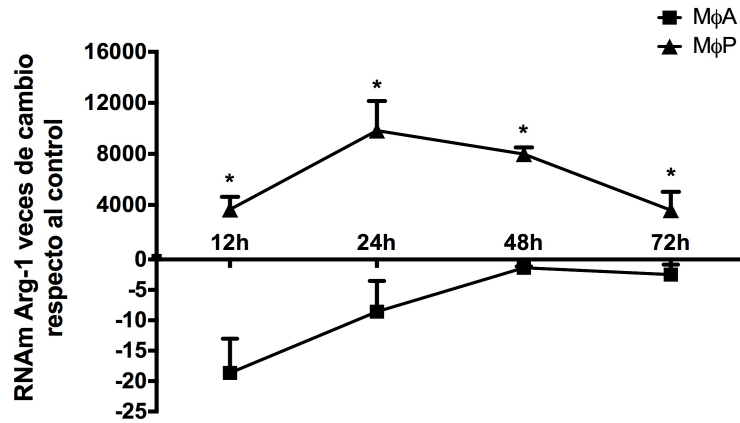
8.6 Expresión de Arg-1 y su actividad.

Debido a que comprobamos que NOS II se encuentra activa en M ϕ P y que los niveles de NO producido en este cultivo son menores a los observados en M ϕ A no obstante una abundancia equivalente de NOS II en ambos cultivos infectados, decidimos explorar la posibilidad de una probable regulación postraduccional debida a una limitada disponibilidad del sustrato de la enzima NOS II en M ϕ P. De manera inicial, evaluamos la expresión del RNAm de la enzima Arg-1, la cual utiliza al aminoácido L-arginina como sustrato al igual que NOS II. Los resultados mostraron una expresión baja y constante en M ϕ N que no varía de manera significativa a lo largo del estudio. Por otra parte se

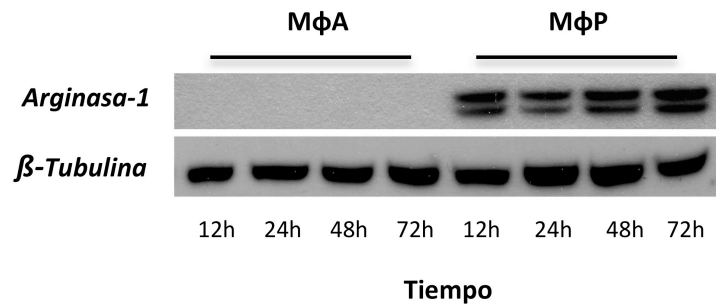
observa que durante la infección aguda, la expresión de Arg-1 parece disminuir, ya que los valores relativos de su expresión fueron menores a 1. En el caso de la infección persistente, observamos sorprendentemente que Arg-1 se expresa miles de veces más en comparación con M ϕ A (Figura 13a). Cuando evaluamos la abundancia de la enzima Arg-1 mediante Western blot, únicamente pudimos detectarla en el cultivo de M ϕ P durante todo el estudio, lo que sugiere una expresión constitutiva en el modelo de persistencia viral (Figura 13b). Finalmente determinamos la actividad enzimática de arginasa en M ϕ A y M ϕ P mediante un ensayo bioquímico a 12, 24, 48 y 72 h de cultivo y detectamos un aumento significativo de la actividad de arginasa en el cultivo de M ϕ P como era de esperarse (Figura 13c).

Estos resultados nos sugirieron que el incremento en la expresión de Arg-1 y de la actividad enzimática en el cultivo persistente, pudiera afectar de manera indirecta la producción de NO debido a una competencia por el sustrato en común: L-arginina.

a)



b)



c)

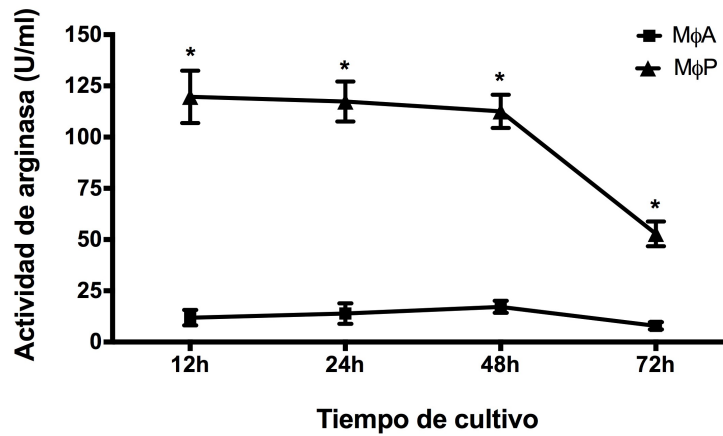


Figura 13. Determinación de Arg-1 y actividad enzimática. a) Expresión del RNAm de Arg-1 mediante RT-PCR, los resultados se analizaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando como calibrador al cultivo de macrófagos no infectados. b) Evaluación de abundancia de la proteína mediante Western blot a diferentes tiempos de cultivo en MφA y MφP. c) La actividad de la arginasa se determinó a través de un método bioquímico con fundamento en la reacción de Archibald. Las diferencias significativas entre MφA y MφP se denotan por (*) $p < 0.05$.

8.7 Inhibición de Arginasa en M ϕ P.

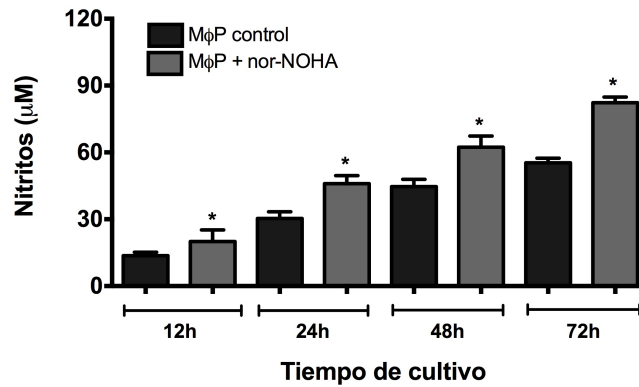
Con el objetivo de evaluar la consecuencia biológica del aumento de la actividad de Arg-1 en M ϕ P, realizamos ensayos de inhibición de arginasa con el compuesto nor-NOHA; los resultados muestran que la inhibición de la actividad se logró de manera parcial (50% aproximadamente) y se detectó a partir de las 12h de cultivo (Tabla 1). En cuanto al efecto, se observa que la inhibición de arginasa se asocia a un incremento significativo en la concentración de nitritos a partir de las 12h y se mantiene hasta las 72h de cultivo (Figura 14a). Estos resultados sugieren que en la infección persistente la síntesis de NO se encuentra limitada al menos de manera parcial debido a una competencia por el sustrato, lo cual se relaciona de manera directa con el incremento en la actividad de Arg-1. Para comprobar esto, se realizó la determinación de la concentración de L-arginina mediante cromatografía líquida a alta presión acoplada a espectrometría de masas en sobrenadantes de M ϕ P control y con inhibición de arginasa (Figura 14b). El medio de cultivo por formulación, tiene una concentración inicial de 267 $\mu\text{g/mL}$ de L-arginina y observamos que en el cultivo control, esta concentración disminuyó en más del 50% después de 12h de cultivo ($118.9 \pm 30 \mu\text{g/mL}$) y a las 24h prácticamente toda la L-arginina fue consumida por las células ($2.1 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$). En contraste, la inhibición de arginasa con nor-NOHA se asoció a un retraso en el consumo de L-arginina, ya que a las 12h de cultivo la concentración promedio fue de $199 \pm 28 \mu\text{g/mL}$ y a 24h de $105 \pm 30 \mu\text{g/mL}$, lo que demuestra una disminución en la tasa de consumo de L-arginina y sustenta nuestra hipótesis de que la actividad constitutiva de Arg-1 en M ϕ P, afecta la disponibilidad de L-arginina para la síntesis de NO (Figura 14b).

Finalmente, para determinar si la replicación del genoma viral en MφP se modifica por el aumento de los niveles de nitritos causados por inhibición de arginasa, se determinaron los niveles de RNA genómico del VSRh mediante RT-PCR tiempo real a las 24, 48 y 72h con y sin tratamiento de nor-NOHA. En estas condiciones, detectamos una reducción de 20% y 40% en los niveles de ARN genómico viral a las 48 h y 72h, respectivamente en los cultivos donde se inhibió la actividad de arginasa, lo que sugiere que un restablecimiento de la síntesis de NO contribuye a inhibir la replicación del genoma del VSRh al menos de manera parcial en las células persistentemente infectadas (Figura 14c).

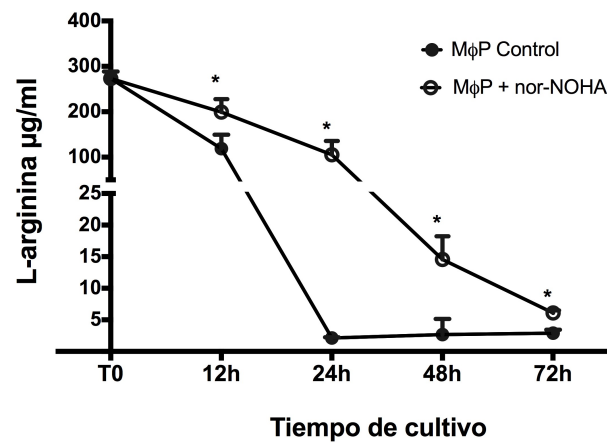
Tiempo	MφP (U/mL)	MφP + nor-NOHA (U/mL)
12h	119.6 ± 12.7	49.8 ± 4.6
24h	117.3 ± 9.7	60.3 ± 4.4
48h	112.5 ± 9.7	50.1 ± 2.6
72h	52.8 ± 6.0	25.4 ± 2.9

Tabla 1. Determinación de la actividad de arginasa en MφP control e incubados con el inhibidor nor-NOHA a diferentes tiempos de cultivo. Los valores son el promedio de tres experimentos independientes y en todos los casos hubo diferencia significativa respecto al control $p < 0.05$.

a)



b)



c)

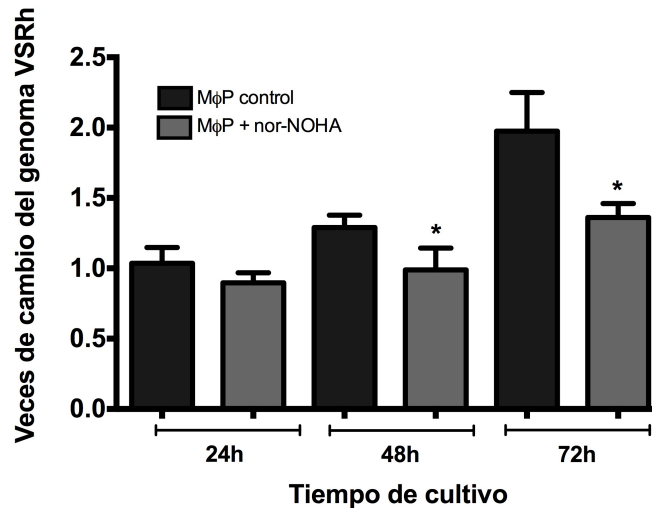


Figura 14. Efecto de la inhibición de arginasa. a) Cuantificación de nitritos por medio de la reacción de Griess en los sobrenadantes de MφP control e incubados con el inhibidor nor-NOHA a distintos tiempos. b) Determinación de la concentración de L-arginina en sobrenadantes de los cultivos mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas. c) Cambio en el número de copias del genoma viral determinado mediante RT-PCR tiempo real. Las diferencias significativas respecto a su control correspondiente se denotan con (*) $p < 0.05$.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El modelo de persistencia viral *in vitro* del VSRh en macrófagos murinos representa un sistema que permite estudiar las alteraciones en procesos celulares involucrados en la actividad antiviral de la célula hospedera como es la producción de NO y síntesis de IFN β .

Mediante este modelo, se han detectado diferencias con respecto al cultivo no infectado, por ejemplo el cultivo de M ϕ N presenta morfología celular estrellada todo el tiempo, mientras que casi la totalidad de los M ϕ P tuvieron una forma esférica y solo un pequeño porcentaje presentó una forma alargada hacia el final de los ensayos, a pesar de esto, no se evidenció formación de sincicios lo que es característico en la infección aguda de células epiteliales por este virus. Con respecto a la expresión de proteínas virales, en los M ϕ P observamos por lo menos un 95% de células positivas al antígeno viral, con una alta heterogeneidad en los niveles de abundancia de las proteínas, lo que sugiere que existen células en la población con baja síntesis de antígeno viral y otras con alta síntesis, por lo anterior creemos que el 5% de M ϕ P que resulta negativo para la tinción con el anticuerpo contra el VSRh, expresa niveles tan bajos de proteínas virales que no es posible detectarlos debido a la sensibilidad de la técnica empleada.

Algunos estudios han reportado que el VSRh es capaz de afectar el ciclo celular (Gibbs, *et al.* 2009), en este sentido, nosotros observamos la proliferación celular se encuentra disminuida en M ϕ P respecto a M ϕ N; en relación a esto, un estudio realizado

previamente en nuestro laboratorio sugiere una aparente retención en el ciclo celular (Sosa 2016). En concordancia con esto, se ha reportado que las infecciones virales persistentes pueden afectar el ciclo celular para favorecer su persistencia, como se observa para el virus del sarampión, el cual puede mantener su RNA genómico constante en células sometidas a un ciclo celular lento durante la infección (Doi *et al.* 2016). Es importante mencionar que en nuestro modelo persistente, los niveles del genoma viral no solo se mantienen, incluso se incrementan significativamente respecto al tiempo de cultivo (Fig 10b). En nuestro modelo de infección persistente, se ha reportado títulos bajos de partículas virales infecciosas (2.6×10^2 TCID₅₀/mL) (Rivera T. *et al.* 2017), a pesar de tener niveles altos de expresión de proteínas virales y de genoma viral (Figura 9a y 10b), por lo que suponemos la existencia de partículas virales defectuosas, las cuales no son infectivas, como se ha reportado en otras infecciones virales persistentes.

La actividad antiviral del NO es ampliamente reconocida (Abdul-Cader, *et al.* 2016; Liu, *et al.* 2007), por lo que alteraciones en su síntesis puede comprometer la eliminación eficiente del virus. En nuestro modelo demostramos que existe una modulación en la producción de NO, lo cual afecta la actividad antiviral, permitiendo altas tasas de multiplicación del genoma viral, al respecto se ha descrito que en algunas infecciones persistentes la producción de NO es limitada, debido a la acción de proteínas virales que ejercen un control transcripcional de NOS II, lo cual parece favorecer la persistencia del virus (Higashimoto, *et al.* 2006) sin embargo, en nuestro modelo de persistencia observamos un aumento en la expresión del RNAm de NOS II, así como en la abundancia de la enzima, por lo que la principal regulación en la síntesis

de NO en los M ϕ P parece ser a nivel postraducciona. Se sabe que la síntesis de NO, depende de la presencia de múltiples moléculas, principalmente los cofactores tetrahidrobiopetina y NADPH, así como la disponibilidad del sustrato de la enzima: L-arginina, por lo anterior decidimos dirigir el trabajo hacia evaluar una posible afectación en la disponibilidad del sustrato. Arg-1, es una enzima que utiliza el mismo sustrato que NOS II y se ha reportado que su expresión puede inducirse para controlar la inflamación prolongada en respuesta a concentraciones altas de NO, así como también por la señalización de citocinas antiinflamatorias específicamente IL-4, IL-10 y TGF- β (Rath, *et al.* 2014). Nuestros resultados muestran que los M ϕ P mantienen una inducción constante de Arg-1, detectable desde las 12 de cultivo y sostenida a lo largo del ensayo, previamente en nuestro laboratorio se ha evaluado la presencia de las citocinas inductoras de Arg-1 en M ϕ P, sin embargo resultaron indetectables en medios condicionados colectados a las 6 y 24 horas de cultivo (Rivera-Toledo, *et al.* 2017). Se ha reportado que otra forma a través de la cual se induce Arg-1, es mediante la infección por patógenos intracelulares; esta inducción es dependiente de la molécula MyD88 que promueve la activación de C/EBP β , el cual se une al promotor de Arg-1 e induce su transcripción (El Kasmi, *et al.* 2008). Debido a que los virus también son patógenos intracelulares y que pueden ser censados por receptores de la respuesta inmune como TLR7 que a su vez activa a MyD88 (Kim, *et al.* 2014), es probable que la inducción de Arg-1 esté mediada por la estimulación permanente del genoma viral persistente y aunque pocos estudios han evaluado la función de la Arg-1 durante la infección crónica por virus, se ha descrito que su inducción en macrófagos infiltrantes de ratones infectados con Chikungunya y el virus Ross River se asocia con dificultades

para eliminar del virus y la resolución de la enfermedad (Stoermer, *et al.* 2012). Por otra parte se demostró que el silenciamiento de Arg-1 en células mieloides favorece el control de la multiplicación viral en los tejidos musculares infectados. En estudios de infección persistente con el virus de la hepatitis C (VHC), se ha demostrado que las células supresoras derivadas de células mieloides (MDSCs) en los pacientes con infección crónica, suprimen la función de las células T a través de un mecanismo dependiente de Arg-1 (Cai, *et al.* 2013), lo cual evita la eliminación del virus y favorece su persistencia.

Finalmente, para conocer el efecto de la sobreexpresión de Arg-1 en nuestro modelo, decidimos inhibir la actividad de Arg total en M ϕ P y observamos que la concentración de nitritos se incrementa de manera significativa a partir de las 12h de inhibición. Durante los mismos ensayos adicionalmente evaluamos el número de copias del genoma viral mediante ensayos de RT-PCR tiempo real y observamos una disminución significativa de la carga viral a partir de las 48h de inhibición, estos resultados sugieren que la inducción de Arg-1 en el modelo de infección persistente es parte de una estrategia viral para favorecer la permanencia del virus en el hospedero, al controlar la síntesis de NO de tal forma que no dañe a la célula ni afecte su viabilidad y se favorezca la multiplicación del genoma viral (Figura 15). Sin duda son necesarios más estudios acerca del mecanismo implicado en la inducción de Arg-1 en M ϕ P y su papel en este y otros modelos de infección crónica, por lo que resulta interesante evaluar su participación en los padecimientos asociados a la propia persistencia viral para tratar de entender los procesos celulares y moleculares involucrados, que nos

permita proponer alternativas que contrarresten los efectos negativos de la inducción permanente de Arg-1.

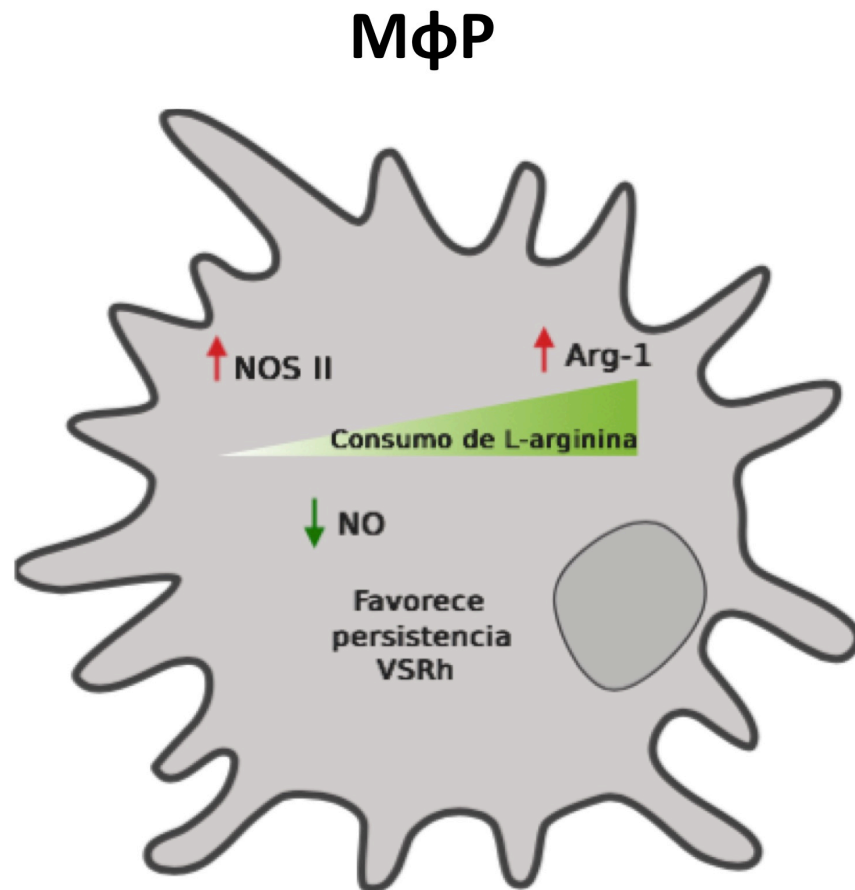


Figura 15. Modelo propuesto para la regulación de NO en MφP. La infección persistente por el VSRh induce la sobreexpresión de NOS II y Arg-1. Se ha reportado que la afinidad de NOS II por L-arginina es mayor que Arg-1, sin embargo la actividad de Arg-1 es mayor que NOS II, por lo tanto la L-arginina disponible en el medio de cultivo es consumida principalmente por Arg-1, lo que compromete la disponibilidad del sustrato para NOS II, afectando la síntesis de NO de manera indirecta, esta condición favorece la multiplicación viral y la permanencia del virus en la célula hospedera.

X. CONCLUSIONES

- La infección persistente con el VSRh, induce un incremento en la síntesis de NO en macrófagos murinos, sin embargo este incremento es menor al observado durante una infección aguda.
- El incremento en la producción de NO debido a la infección viral, se asocia a una sobre expresión de la enzima inducible NOS II.
- La concentración de NO producido durante la infección persistente no afectan la multiplicación del genoma viral.
- La infección persistente de macrófagos por el VSRh, induce una sobreexpresión constitutiva de Arg-1.
- La inhibición parcial de la actividad de arginasa, se asocia a un incremento en la producción de NO y a una disminución en la replicación del genoma viral.

XI. PERSPECTIVAS

- Silenciar la expresión de Arg-1 en M ϕ P y evaluar su efecto en la síntesis de NO y el mantenimiento del genoma viral en la célula hospedera.
- Determinar la vía de señalización involucrada en la sobreexpresión de Arg-1 en M ϕ P, al evaluar la participación de los diferentes factores de transcripción implicados en su inducción.
- Estudiar la regulación observada en un modelo de infección persistente *in vivo*.

XII. LITERATURA CITADA

- Abdul-Cader, M.S., Amarasinghe, A., Abdul-Careem, M.F., 2016. Activation of toll-like receptor signaling pathways leading to nitric oxide-mediated antiviral responses. *Arch. Virol.* 161, 2075-2086. doi:10.1007/s00705-016-2904-x
- Akerström, S., Mousavi-Jazi, M., Klingström, J., Leijon, M., Lundkvist, A., Mirazimi, A., 2005. Nitric oxide inhibits the replication cycle of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 3, 1966-1969. doi:10.1128/JVI.79.3.1966-1969.2005
- Aktan, F., 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* 75, 639–653. doi:10.1016/j.lfs.2003.10.042
- Ali-Ahmad, D., Bonville, C., Rosenberg, H., Domachowske, J., 2003. Replication of respiratory syncytial virus is inhibited in target cells generating nitric oxide in situ. *Front Biosci.* 8, 48-53. doi:10.2741/986
- Arrebillaga, G., Gaona, J., Sanchez, C., Rosales, V., Gomez, B., 2012. Respiratory syncytial virus persistence in macrophages downregulates intercellular adhesion molecule-1 expression and reduces adhesion of non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Intervirology.* 6, 442–50. doi:10.1159/000335548
- Behera, A.K., Matsuse, H., Kumar, M., Kong, X., Lockey, R.F., Mohapatra, S.S., 2001. Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 188–95. doi:10.1006/bbrc.2000.4093
- Bi, Z., Reiss, C. 1995. Inhibition of vesicular stomatitis virus infection by nitric oxide. *J. Virol.* 4, 2208-2213.
- Bogdan, C., 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2, 907–16. doi:10.1038/ni1001-907
- Bohmwald, K., Espinoza, J.A., Rey-Jurado, E., Gómez, R.S., González, P.A., Bueno, S.M., Riedel, C.A., Kalergis, A.M., 2016. Human Respiratory Syncytial Virus: Infection and Pathology. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 37, 522–537. doi:10.1055/s-0036-1584799
- Borchers, A.T., Chang, C., Gershwin, M.E., Gershwin, L.J., 2013. Respiratory syncytial virus - A comprehensive review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 45, 331–379. doi:10.1007/s12016-013-8368-9
- Braciale, T.J., Sun, J., Kim, T.S., 2012. Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 295–305. doi:10.1038/nri3166
- Brandenburg, A.H., Groen, J., van Steensel-Moll, H.A., Claas, E.C., Rothbarth, P.H., Neijens, H.J., Osterhaus, A.D., 1997. Respiratory syncytial virus specific serum antibodies in infants under six months of age: limited serological response upon infection. *J. Med. Virol.* 52, 97–104. doi:10.1002/(SICI)1096-9071(199705)52:1<97::AID-JMV16>3.0.CO;2-Y
- Cai, W., Qin, A., Guo, P., Yan, D., Hu, F., Yang, Q., Xu, M., Fu, Y., Zhou, J., Tang, X., 2013. Clinical significance and functional studies of myeloid-derived suppressor cells in chronic hepatitis C patients. *J. Clin. Immunol.* 4, 798-808. doi:10.1007/s10875-012-9861-2
- Carbonell-Estrany, X., Bont, L., Doering, G., Gouyon, J.B., Lanari, M., 2008. Clinical relevance of prevention of respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection in preterm infants born between 33 and 35 weeks gestational age. *Eur. J. Clin.*

- Microbiol. Infect. Dis. 27, 891–899. doi:10.1007/s10096-008-0520-8
- Cheung, M., Sampayo-Escobar, V., Ryan, G., Moore, M., Mohapatra, S., 2016. Respiratory syncytial virus-infected mesenchymal stem cells regulate immunity via interferon beta and indoleamine-2,3-dioxygenase. *PLOS One*. 11, 1-27. doi:10.1371/journal.pone.0163709
- Collins, P.L., Graham, B.S., 2008. Viral and Host Factors in Human Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis. *J. Virol.* 82, 2040–2055. doi:10.1128/JVI.01625-07
- Cowton, V.M., McGivern, D.R., Fearn, R., 2006. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *J. Gen. Virol.* 87, 1805–1821. doi:10.1099/vir.0.81786-0
- Cubie, H., Duncan, L., Marshall, L., Smith, N., 1997. Detection of respiratory syncytial virus nucleic acid in archival postmortem tissue from infants. *Pediatr Pathol Lab Med.* 6, 927-938. doi:10.1080/15513819709168756
- Culley, F.J., Pollott, J., Openshaw, P.J.M., 2002. Age at First Viral Infection Determines the Pattern of T Cell-mediated Disease during Reinfection in Adulthood. *J Exp Med* 196, 1381–1386. doi:10.1084/jem.20020943
- Currier, M.G., Lee, S., Stobart, C.C., Hotard, A.L., Villenave, R., Meng, J., Pretto, C.D., Shields, M.D., Nguyen, M.T., Todd, S.O., Chi, M.H., Hammonds, J., Krumm, S.A., Spearman, P., Plemper, R.K., Sakamoto, K., Peebles, R.S., Power, U.F., Moore, M.L., 2016. EGFR Interacts with the Fusion Protein of Respiratory Syncytial Virus Strain 2-20 and Mediates Infection and Mucin Expression. *PLoS Pathog.* 12, 1-22. doi:10.1371/journal.ppat.1005622
- Dawe, C.J., Potter, M., 1957. Morphologic and biologic progression of a lymphoid neoplasm of the mouse in vivo and in vitro. *Am J Pathology* 33: 603.
- Del Moral-Hernández, O., Santiago-Olivares, C., Rivera-Toledo, E., Gaona, J., Castillo-Villanueva, E., Gómez, B. 2018. RSV infection in a macrophage-cell line activates the non-canonical NF-κB pathway and induces pro-inflammatory cytokine expression. *Acta virologica.* 62, 129-136. doi:10.4149/av_2018_202
- Díez-Domingo, J., Pérez-Yarza, E.G., Melero, J. a, Sánchez-Luna, M., Aguilar, M.D., Blasco, A.J., Alfaro, N., Lázaro, P., 2014. Social, economic, and health impact of the respiratory syncytial virus: a systematic search. *BMC Infect. Dis.* 14, 544. doi:10.1186/s12879-014-0544-x
- Doi, T., Kwon, H., Honda, T., Sato, H., Yoneda, M., Kai, C., 2016. Measles virus induces persistent infection by autoregulation of viral replication. *Sci. Rep.* 6, 37163. doi: 10.1038/srep37163
- Doria G, Adorini L, Sabbadini E, Mancini C, Frasca D. 1988. Immunoregulation in aging. *Ann N Y Acad Sci* 521:182–188. [https://doi.org/ 10.1111/j.1749-6632.1988.tb35277.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb35277.x).
- El Kasmi, K., Qualls, J., Pesce, J., Smith, A., Thompson, R., Henao-Tamayo, M., Basaraba, R., König, T., Schleicher, U., Koo, M., Kaplan, G., Fitzgerald, K., Tuomanen, E., Orme, I., Kanneganti, T., Bogdan, C., Wynn, T., Murray P., 2008. Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat Immunol.* 12, 1399-1406. doi:10.1038/ni.1671
- Falsey, A.R., Singh, H.K., Walsh, E.E., 2006. Serum antibody decay in adults following natural respiratory syncytial virus infection. *J. Med. Virol.* 78, 1493–1497. doi:10.1002/jmv.20724
- Fearn, R., Collins, P.L., Peeples, M.E., 2000. Functional analysis of the genomic and

- antigenomic promoters of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 74, 6006–14. doi:10.1128/JVI.74.13.6006-6014.2000
- Frasca D, Pucci S, Goso C, Barattini P, Barile S, Pioli C, Doria G., 1997. Regulation of cytokine production in aging: use of recombinant cytokines to upregulate mitogen-stimulated spleen cells. *Mech Ageing Dev* **93**:157–169. doi:10.1016/S0047-6374(96)01825-8.
- Geevarghese, B., Weinberg, A., 2014. Cell-mediated immune responses to respiratory syncytial virus infection: Magnitude, kinetics, and correlates with morbidity and age. *Hum. Vaccines Immunother.* 10, 1047–1056. doi:10.4161/hv.27908
- Gibbs, J., Ornoff, D., Igo, H., Zeng, J., Imani, F., 2009. Cell cycle arrest by transforming growth factor beta1 enhances replication of respiratory syncytial virus in lung epithelial cells. *J. Virol.* 23, 12424–12431. doi:10.1128/JVI.00806-09
- Gomez, R., Marsollier, I., Bohmwald, K., Bueno, S., Kalergis, A., 2014. Respiratory Syncytial Virus: Pathology, therapeutic drugs and prophylaxis. *Immunol Lett.* 162, 237–247. doi: 10.1016/j.imlet.2014.09.006
- Goritzka, M., Makris, S., Kausar, F., Durant, L., Pereira, C., Kumagai, Y., Culley, F., Mack, M., Akira, S., Johansson, C., 2015. Alveolar macrophage-derived type I interferons orchestrate innate immunity to RSV through recruitment of antiviral monocytes. *J. Exp. Med.* 5, 699–714. doi:10.1084/jem.20140825
- Griffiths, C., Drews, S.J., Marchant, D.J., 2017. Respiratory syncytial virus: Infection, detection, and new options for prevention and treatment. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 277–319. doi:10.1128/CMR.00010-16
- Guerrero-Plata, A., Ortega, E., Gomez, B., 2001. Persistence of respiratory syncytial virus in macrophages alters phagocytosis and pro-inflammatory cytokine production. *Viral Immunol.* doi:10.1089/08828240151061347
- Guerrero-Plata, A., Ortega, E., Ortíz-Navarrete, V., Gómez, B., 2004. Antigen presentation by a macrophage-like cell line persistently infected with respiratory syncytial virus. *Virus Res.* doi:10.1016/j.virusres.2003.10.005
- Habibi, M., Jozwik, A., Makris, S., Dunning, J., Paras, A., De Vincenzo, J., De Haan, C., Wrammert, J., Openshaw, P., Chiu, C., 2015. Impaired antibody-mediated protection and defective IgA B-cell memory in experimental infection of adults with respiratory syncytial virus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191, 1040–1049. doi:10.1164/rccm.201412-2256OC
- Haerberle, 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-kappaB in the lung involves alveolar macrophages and toll-like receptor 4-dependent pathways. *J Infect Dis* 186, 1199–1206. doi:10.1086/344644
- Hall, C., Sim, E., Anderson, L., 2013. Challenges and Opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccines 372, 39–57. doi:10.1007/978-3-642-38919-1
- Hemrich, K., Kröncke, K., Suschek, C., Kolb-Bachofen, V., 2005. What sense lies in antisense inhibition of inducible nitric oxide synthase expression? *Nitric oxide.* 12, 183–199. doi:10.1016/j.niox.2005.04.003
- Hernansanz-Agustin, P., Izquierdo-Álvarez, A., García-Ortiz, A., Ibiza, S., Serrador, J., Martínez-Ruiz, A., 2013. Nitrosothiols in the Immune System: Signaling and Protection. *Antioxid. Redox Signal.* 3, 288–309. doi:10.1089/ars.2012.4765
- Higashimoto, Y., Yamagata, Y., Itoh, H., 2006. Complex effect of adenovirus early region proteins on innate immune system. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 4, 229–

237. doi:10.2174/187152806779010927
- Hobson, L., Everard, M., 2007. Persistent of respiratory syncytial virus in human dendritic cells and influence of nitric oxide. *Clin Exp Immunol.* 151, 359-366. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03560.x
- Holguera, J., Villar, E., Muñoz-Barroso, I., 2014. Identification of cellular proteins that interact with Newcastle Disease Virus and human Respiratory Syncytial Virus by a two-dimensional virus overlay protein binding assay (VOPBA). *Virus Res.* 191, 138–142. doi:10.1016/j.virusres.2014.07.031
- Ischiropoulos, H., 2003. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 776–783. doi:10.1016/S0006-291X(03)00814-3
- Jha, A., Jarvis, H., Fraser, C., J.M. Openshaw, P., 2016. Respiratory syncytial virus. *SARS, MERS other Viral Lung Infect.* 84–109. doi:10.1183/2312508X.10010315
- Johansson, C., 2016. Respiratory syncytial virus infection: an innate perspective. *F1000 Research* 5, 2898. doi:10.12688/f1000research.9637.1
- Johnson, S., McNally, B., Ioannidis, I., Flano, E., Teng, M., Oomens, A., Walsh, E., Peeples, M., 2015. Respiratory Syncytial Virus Uses CX3CR1 as a Receptor on Primary Human Airway Epithelial Cultures. *PLoS Pathog.* 11. doi:10.1371/journal.ppat.1005318
- Kallal, L., Hartigan, A., Hogaboam, C., Schaller, M., Lukacs, N., 2010. Inefficient Lymph Node Sensitization during Respiratory Viral Infection Promotes IL-17-Mediated Lung Pathology. *J. Immunol.* 185, 4137–4147. doi:10.4049/jimmunol.1000677
- Kao, Y., Piedra, P., Larsen, G., Colasurdo, G., 2001. Induction and Regulation of Nitric Oxide Synthase in Airway Epithelial Cells by Respiratory Syncytial Virus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 532–539. doi:10.1164/ajrccm.163.2.9912068
- Karron, R., Luongo, C., Thumar, B., Loehr K., Englund, J., Collins, P., Buchholz, U., 2015. A gene deletion that up-regulates viral gene expression yields an attenuated RSV vaccine with improved antibody responses in children. *Infec. Dis.* 312, 312ra175. doi:10.1126/scitranslmed.aac8463
- Kasel, J., Walsh, E., Frank, A., Baxter, B., Taber, L., Glezen, W., 1987. Relation of serum antibody to glycoproteins of respiratory syncytial virus with immunity to infection in children. *Viral Immunol.* 1, 199–205.
- Kilani, M., Mohammed, K., Nasreen, N., Tepper, R., Antony, V., 2004. RSV causes HIF-1 stabilization via NO release in primary bronchial epithelial cells. *Inflammation* 28, 245–251. doi:10.1007/s10753-004-6047-y
- Kim, Y., Son, K., Hong, S., Green, A., Chen, J., Tzeng, E., Hierholzer, C., Billiar, T., 1998. Inhibition of protein synthesis by nitric oxide correlates with cytostatic activity: nitric oxide induces phosphorylation of initiation factor eIF-2 alpha. *Mol. Med.* 4, 179–190. doi:10.1007/BF03401915
- Kim, T., Lee, H., 2014. Innate immune recognition of respiratory syncytial virus infection. *BMB Rep.* 47, 184-191. doi:10.5483/BMBRep.2014.47.4.050
- Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K., Schwarz, P., 2004. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 255–266. doi:10.1016/j.ejphar.2004.07.030
- Koren, H., Handwerker, B., Wunderlich, J., 1975. Identification of Macrophage-Like Characteristics in a Cultured Murine Tumor Line. *J Immunol* 1975; 114:894-897.
- Krishnan, S., Halonen, M., 2004. Innate Immune Responses in Respiratory Syncytial

- Virus Infections 17, 220–233. doi: 10.1089/0882824041310612
- Krusat, T., Streckert, H., 1997. Heparin-dependent attachment of respiratory syncytial virus (RSV) to host cells. *Arch. Virol.* 142, 1247–1254. doi:10.1007/s007050050156
- Krzyzaniak, M., Zumstein, M., Gerez, J., Picotti, P., Helenius, A., 2013. Host Cell Entry of Respiratory Syncytial Virus Involves Macropinocytosis Followed by Proteolytic Activation of the F Protein. *PLoS Pathog.* 9. doi:10.1371/journal.ppat.1003309
- 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. *Nat Immunol* 1, 398–401. doi:10.1038/80833
- Kusel, M., de Klerk, N., Keadze, T., Vohma, V., Holt, P., Johnston, S., Sly, P., 2007. Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 1105–1110. doi:10.1016/j.jaci.2006.12.669
- Kutty, R., Kutty, G., Hooks, J., Wigert, B., Nagineni, C., 1995. Transforming growth factor- β inhibits the cytokine-mediated expression of the inducible nitric oxide synthase mRNA in human retinal pigment epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 386–393. doi:10.1006/bbrc.1995.2477
- Lay, M., González, P., León, M., Céspedes, P., Bueno, S., Riedel, C., Kalergis, A., 2013. Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response. *Microbes and Infection.* 15, 230–242. doi:10.1016/j.micinf.2012.11.012
- Lee, J., Ryu, H., Ferrante, R., Morris, S., Ratan R., 2003. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *PNAS.* 8, 4843–4848. doi:10.1073_pnas.0735876100
- Lepoivre, M., Fieschi, F., Coves, J., Thelander, L., Fontecave, M., Cnrs, U.R.A., Paris-sud, U., 1991. Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 442–448. doi:10.1016/0006-291X(91)91390-X
- Lin, Y., Ma, Y., Yeh, S., Chiou, C., Chen, S., Liao, L., 1997. Inhibition of Japanese Encephalitis Virus Infection by Nitric Oxide: Antiviral Effect of Nitric Oxide on RNA Virus Replication. *J. Virol.* 7, 5227–5235 doi:
- Liu, P., Jamaluddin, M., Li, K., Garofalo, R., Casola, A., Brasier, A., 2007. Retinoic acid-inducible gene 1 mediates early antiviral response and Toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells. *J. Virol.* 81, 1401–11. doi:10.1128/JVI.01740-06
- Liu, T., Castro, S., Brasier, A.R., Jamaluddin, M., Garofalo, R.P., Casola, A., 2004. Reactive oxygen species mediate virus-induced STAT activation: Role of tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.* 279, 2461–2469. doi:10.1074/jbc.M307251200
- Low, K., Tan, T., Ng, K., Tan, B., Sugrue, R., 2008. The RSV F and G glycoproteins interact to form a complex on the surface of infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 308–313. doi:10.1016/j.bbrc.2007.11.042
- Lukacs, N., Smit, J., Mukherjee, S., Morris, S., Nunez, G., Lindell, D., 2010. Respiratory virus-induced TLR7 activation controls IL-17-associated increased mucus via IL-23 regulation. *J Immunol* 185, 2231–2239. doi:10.4049/jimmunol.1000733
- Malhotra, R., Ward, M., Bright, H., Priest, R., Foster, M., Hurle, M., Blair, E., Bird, M., 2003. Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptors on epithelial cells. *Microbes Infect.* 5, 123–133. doi:10.1016/S1286-4579(02)00079-

- Marchant, D., Singhera, G., Utokaparch, S., Hackett, T., Boyd, J., Luo, Z., Si, X., Dorscheid, D., McManus, B., Hegele, R., 2010. Toll-like receptor 4-mediated activation of p38 mitogen-activated protein kinase is a determinant of respiratory virus entry and tropism. *J. Virol.* 84, 11359–73. doi:10.1128/JVI.00804-10
- 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. *Environ. Health Perspect.* 105 Suppl, 1301–1307. doi:10.2307/3433986
- McGivern, D., Collins, P., Fearn, R., 2005. Identification of internal sequences in the 3' leader region of human respiratory syncytial virus that enhance transcription and confer replication processivity. *J. Virol.* 79, 2449–2460. doi:10.1128/JVI.79.4.2449-2460.2005
- McNamara, P., Ritson, P., Selby, A., Hart, C., Smyth, R., 2003. Bronchoalveolar lavage cellularity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Arch. Dis. Child.* 88, 922–926. doi:10.1136/adc.88.10.922
- Moraes, T., 2010. Arginase and Respiratory Viral Infections. *The Open Nitric Oxide Journal.* 2, 64-68. doi:10.2174/18750427010020200064
- Mukherjee, S., Lindell, D., Berlin, A., Morris, S., Shanley, T., Hershenson, M., Lukacs, N., 2011. IL-17 Induced pulmonary pathogenesis during respiratory viral infection and exacerbation of allergic disease. *Am. J. Pathol.* 179, 248–258. doi:10.1016/j.ajpath.2011.03.003
- Murphy, B., Alling, D., Snyder, M., Walsh, E., Prince, G., Chanock, R., Hemming, V., Rodriguez, W., Kim, H., Graham, B., 1986. Effect of age and preexisting antibody on serum antibody response of infants and children to the F and G glycoproteins during respiratory syncytial virus infection. *J. Clin. Microbiol.* 24, 894–898. doi:0095-1137/86/110894-05\$02.00/0
- Nair, H., Nokes, D., Gessner, B., Dherani, M., Madhi, S., Singleton, R., O'Brien, K., Roca, A., Wright, P., Bruce, N., Chandran, A., Theodoratou, E., Sutanto, A., Sedyaningsih, E., Ngama, M., Munywoki, P., Kartasasmita, C., Simões, E., Rudan, I., Weber, M., Campbell, H., 2010. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 375, 1545–1555. doi:10.1016/S0140-6736(10)60206-1
- Nakamura-López, Y., Villegas-Sepúlveda, N., Sarmiento-Silva, R., Gómez, B. 2011. *Virus Res.* 158, 98-107. doi: 10.1016/j.virusres.2011.03.016
- Nam, H., Ison, M., 2019. Respiratory syncytial virus infection in adults. *BMJ.* 366,15021. doi: 10.1136/bmj.l5021
- Nathanson, N., 2007. *Viral Pathogenesis and Immunity.* Academic Press. 220-228. 9780080471051.
- Panuska, J., Cirino, N., Midulla, F., Despot, J., McFadden, E., Huang, Y., 1990. Productive infection of isolated human alveolar macrophages by respiratory syncytial virus. *J. Clin. Invest.* 86, 113–9. doi:10.1172/JCI114672
- Panuska, J., Merolla, R., Rebert, N., Hoffmann, S., Tsivitse, P., Cirino, N., Silverman, R., Rankin, J., 1995. Respiratory syncytial virus induces interleukin-10 by human alveolar macrophages. Suppression of early cytokine production and implications for incomplete immunity. *J. Clin. Invest.* 96, 2445–2453. doi:10.1172/jci118302
- Persichini, T., Colasanti, M., Fraziano, M., Colizzi, V., Medana, C., Polticelli, F.,

- Venturini, G., Ascenzi, P., 1999. Nitric oxide inhibits the HIV-1 reverse transcriptase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 624–627. doi:10.1006/bbrc.1999.0581
- Phipps, S., Lam, C., Mahalingam, S., Newhouse, M., Ramirez, R., Rosenberg, H., Foster, P., Matthaei, K., 2007. Eosinophils contribute to innate antiviral immunity and promote clearance of respiratory syncytial virus. *Immunobiology*. 5, 1578-1586. doi:10.1182/blood-2007-01-071340.An
- Piedimonte, G., 2015. RSV infections: State of the art. *Cleve. Clin. J. Med.* 82, S13–S18. doi:10.3949/ccjm.82.s1.03
- Qin, L., Hu, C., Feng, J., Xia, Q., 2011. Activation of lymphocytes induced by bronchial epithelial cells with prolonged RSV infection. *PLOS One*. 12, e27113. doi:10.1371/journal.pone.0027113
- Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E., Munder, M., 2014. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. *Front Immunol.* 10, 1-10. doi:10.3389/fimmu.2014.00532
- Rezaee, F., Gibson, L., Piktel, D., Othumpangat, S., Piedimonte, G., 2011. Respiratory syncytial virus infection in human bone marrow stromal cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2, 277-286. doi:10.1165/rcmb.2010-0121OC
- Rimmelzwaan, G., Baars, M., De Lijster, P., Fouchier, R., Osterhaus, A., 1999. Inhibition of influenza virus replication by nitric oxide. *J. Virol.* 10, 8880-8883.
- Rivera-Toledo, E., Salido-Guadarrama, I., Rodríguez-Dorantes, M., Torres-González, L., Santiago-Olivares, C., Gómez, B., 2017. Conditioned medium from persistently RSV-infected macrophages alters transcriptional profile and inflammatory response of non-infected macrophages. *Virus Res.* 230, 29–37. doi:10.1016/j.virusres.2017.01.001
- Rudd, B., Burstein, E., Duckett, C., Li, X., Lukacs, N., 2005. Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression. *J. Virol.* 79, 3350–3357. doi:10.1128/JVI.79.6.3350-3357.2005
- Russell, C., Unger, S., Walton, M., 2017. The Human Immune Response to Respiratory Syncytial Virus Infection 30, 481–502. doi:10.1128/CMR.00090-16
- San-Juan-Vergara, H., V., Sampayo, E., Reyes, N., Cha, B., Pacheco, L., Wong, T., Peeples, M., Collins, P., Castano, M., Mohapatra, S., 2012. Cholesterol-rich microdomains as docking platforms for respiratory syncytial virus in normal human bronchial epithelial cells. *J Virol.* 86, 1832–1843. doi:10.1128/jvi.06274-11
- San-Juan-Vergara, H., Peeples M., 2019. Importance of Virus Characteristics in Respiratory Syncytial Virus-Induced Disease. *Immunol Allergy Clin N Am.* 39, 321–334. doi:10.1016/j.iac.2019.04.001
- Saravia, J., You, D., Shrestha, B., Jalgama, S., Siefker, D., Lee, G., Harding, J., Jones, T., Rovnaghi, C., Bagga, B., DeVincenzo, J., Cormier, S., 2015. Respiratory Syncytial Virus Disease Is Mediated by Age-Variable IL-33. *PLoS Pathog.* 11, 1–17. doi:10.1371/journal.ppat.1005217
- Sarmiento, R., Tirado, R., Gómez, B., 2002. Characteristics of a respiratory syncytial virus persistently infected macrophage-like culture. *Virus Res.* 84, 45–58. doi:10.1016/S0168-1702(01)00420-8
- Sarmiento, R., Arias, C., Méndez, E., Gómez, B., 2009. Characterization of a persistent respiratory syncytial virus showing a low-fusogenic activity associated to an impaired F protein. *Virus Res.* 139, 39-47. doi:10.1016/j.virusres.2008.10.007

- Saura, M., Zaragoza, C., McMillan, A., Quick, R., Hohenadl, C., Lowenstein, J., Lowenstein, C., 1999. An antiviral mechanism of nitric oxide: Inhibition of a viral protease. *Immunity* 10, 21–28. doi:10.1016/S1074-7613(00)80003-5
- Schwarze, J., O'Donnell, D., Rohwedder, A., Openshaw, P., 2004. Latency and persistence of respiratory syncytial virus despite T cell immunity. *Am J Respir Crit Care Med.* 7, 801-805. doi:10.1164/rccm.200308-1203OC
- Sekkaï, D., Aillet, F., Israe, N., Lepoivre, M., 1998. Inhibition of NF- κ B and HIV-1 Long Terminal Repeat Transcriptional Activation by Inducible Nitric Oxide Synthase 2 Activity. 273, 3895–3900. doi: 10.1074/jbc.273.7.3895
- Sigurs, N., Gustafsson, P., Bjarnason, R., Lundberg, F., Schmidt, S., Sigurbergsson, F., Kjellman, B., 2005. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171, 137–141. doi:10.1164/rccm.200406-730OC
- Sigurs, N., Aljassim, F., Kjellman, B., Robinson, P., Sigurbergsson, F., Bjarnason, R., Gustafsson, P., 2010. Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life. *Thorax* 65, 1045–52. doi:10.1136/thx.2009.121582
- Singleton, R., Bulkow L., Miernyk, K., DeByle, K., Pruitt, L., Hummel K., Bruden, D., Englund, J., Anderson, L., Lucher, L., Holman, R., Hennessy, T., 2010. Viral respiratory infections in hospitalized and community control children in Alaska. *J Med Virol.* 7, 1282-1290. doi: 10.1002/jmv.21790
- Song, W., Liu, G., Bosworth, C., Walker, J., Megaw, G., Lazrak, A., Abraham, E., Sullender, W., Matalon, S., 2009. Respiratory syncytial virus inhibits lung epithelial Na⁺ channels by up-regulating inducible nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 284, 7294–7306. doi:10.1074/jbc.M806816200
- Sosa A. 2016. Evaluación del progreso del ciclo celular de macrófagos murinos infectados persistentemente con el virus sincitial respiratorio (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autonoma de México, Ciudad de México.
- 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 *James. J. Infect. Dis.* 191, 387-395. doi:10.1086/427241
- Stoermer, K., Burrack, A., Oko, L., Montgomery, S., Borst, L., Gill, R., Morrison, T., 2012. Genetic ablation of arginase 1 in macrophages and neutrophils enhances clearance of an arthritogenic alphavirus. 189, 4047-4059. doi: 10.4049/jimmunol.1201240
- Taleb, S., Al Thani, A., Ansari, K., Yassine, H., 2018. Human respiratory syncytial virus: pathogenesis, immune responses, and current vaccine approaches. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 37:1817–1827. doi:10.1007/s10096-018-3289-4
- Tayyari, F., Marchant, D., Moraes, T., Duan, W., Mastrangelo, P., Hegele, R., 2011. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nat. Med.* 17, 1132–1135. doi:10.1038/nm.2444
- Toshifumi, M., Terashima, M., Yoshimura, H., Nariai, Y., Tanigawa, Y., 2005. TGF- β 1 enhances degradation of IFN- γ -induced iNOS protein via proteasomes in RAW 264.7 cells. *Nitric oxide.* 13, 78-87. doi:10.1016/j.niox.2005.05.001
- Tripathi, P., Kashyap, L., Singh, V., 2007. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51, 443–452. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00329.x

- Tripp, R., Jones, L., Haynes, L., Zheng, H., Murphy, P., Anderson, L., 2001. CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat. Immunol.* 2, 732–738. doi:10.1038/90675
- 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. *J. Leukoc. Biol.* 66, 99–104. doi:org/10.1002/jlb.66.1.99
- Varga, S., Braciale, T., 2013. Challenges and Opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccines 372, 155–171. doi:10.1007/978-3-642-38919-1
- Vila del Sol, V., Díaz, M., Fresno, M., 2007. Requirement of tumor necrosis factor alpha and nuclear factor-kappaB in the induction by IFN-gamma of inducible nitric oxide synthase in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 81, 272–83. doi:10.1189/jlb.0905529
- Vodovotz, Y., Bogdan, C., Paik, J., Xie, Q., Nathan, C., 1993. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* 178, 605–13. doi:10.1084/jem.178.2.605
- Vuolteenaho, K., Moilanen, T., Jalonen, U., Lahti, A., Nieminen, R., Van Beuningen, H., Moilanen., 2005. TGFb inhibits IL-1 -induced iNOS expression and NO production in immortalized chondrocytes. *Infl amm. res.* 54, 420–427. doi:10.1007/s00011-005-1373-6
- Walsh, E., Falsey, A., 2004. Humoral and mucosal immunity in protection from natural respiratory syncytial virus infection in adults. *J. Infect. Dis.* 190, 373–378. doi:10.1086/421524
- Wei, Z., Wang, X., Ning, X., Wang, X., Ning., Wang, Y., Zhang, H., Wang, D., Chen, H., Cui, B., 2009. Nitric oxide inhibits the replication cycle of porcine parvovirus in vitro. *Arch Virol.* 6, 999-1003. doi:10.1007/s00705-009-0392-y
- Wiertsema, S., Chidlow, G., Kirkham, L., Corscadden, K., Mowe, E., Vijayasekaran, S., Coates, H., Harnett, G., Richmond, P., 2011. High detection rates of nucleic acids of a wide range of respiratory viruses in the nasopharynx and the middle ear of children with a history of recurrent acute otitis media. *J Med Virol.* 11, 2008-2017. 10.1002/jmv.22221
- Wink, D., Hines, H., Cheng, R., Switzer, C., Flores, S., Vitek, M., Ridnour, L., Colton, C., 2011. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J. Leukoc. Biol.* 89, 873–891. doi:10.1189/jlb.1010550

XIII. APÉNDICE



Nitric oxide production is downregulated during respiratory syncytial virus persistence by constitutive expression of arginase 1

Carlos Santiago-Olivares^{1,2} · Evelyn Rivera-Toledo¹ · Beatriz Gómez¹

Received: 12 November 2018 / Accepted: 24 March 2019 / Published online: 8 June 2019
© Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2019

Abstract

Viral persistence alters cellular antiviral activities. Nitric oxide (NO), a highly reactive free radical and a potent antiviral molecule, can inhibit replication of RNA and DNA viruses, but its production and effect during viral persistence are largely unknown. NO synthesis is stimulated in epithelial cells during acute infection with respiratory syncytial virus (RSV) and interferes with viral replication. In this study, we compared the levels of production of NO and expression of its regulatory enzymes, inducible nitric oxide synthase (NOS II) and arginase 1 (Arg-1), during acute and persistent RSV infection in a macrophage cell line to investigate their role in the control and maintenance of viral infection. We observed that NO and NOS II mRNA were induced at higher levels in acutely infected macrophages than in persistently infected macrophages, while the kinetics of NOS II protein expression were similar in both types of infected cultures, except that its disappearance was delayed during acute infection. Thus, NOS II was inducible and expressed at high levels during persistent infection, but production of NO was low relative to acute infection. This was not associated with a lack of enzymatic activity but instead was due to constitutive expression of the Arg-1 enzyme at the mRNA and protein levels, suggesting that arginase restricts availability of L-arginine as a substrate for NOS II to synthesize NO. This hypothesis was supported by showing that arginase enzymatic activity was inhibited in persistently RSV-infected cells by N ω -hydroxy-nor-L-arginine, increasing L-arginine availability in conditioned medium and producing increased levels of nitrites, concurrently with a significant reduction in virus genome replication, implying that Arg-1 overexpression contributes to the maintenance of the RSV genome in the host in persistent infection.

Handling Editor: Zhenhai Chen.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00705-019-04259-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Beatriz Gómez
begomez@unam.mx

Carlos Santiago-Olivares
santiagoolivares@unam.mx

Evelyn Rivera-Toledo
evelynmicro@gmail.com

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, Mexico City C.P. 04510, Mexico

² Posgrado en Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado, Ciudad Universitaria, Edificio D, 1 Piso, Circuito de Posgrados, Coyoacán, Mexico City C.P. 04510, México

Introduction

Human respiratory syncytial virus (RSV) is an enveloped, negative-sense, single-stranded RNA virus that belongs to the family *Pneumoviridae*, genus *Orthopneumovirus* [1], and is the most common pathogen responsible for severe respiratory tract infections among infants worldwide [2]. It is also an important cause of bronchitis and pneumonia in the elderly population [3]. It is estimated that RSV globally causes 33 million lower-respiratory-tract infections yearly in children younger than five years [4], with 66,000–199,000 fatal cases annually. Severe RSV infection in infants is associated with recurrent wheezing and asthma-like symptoms, which might be related to persistence of the virus. Viral persistence has not been demonstrated in humans, although circumstantial evidence suggests that RSV establishes persistent infections in respiratory and non-respiratory human tissues [5]. However, the mouse model has provided extensive evidence of persistence of the RSV-genome in lungs for prolonged periods (up to 3 months), with possible production of infectious viral

particles [6]. Currently, there are no vaccines or effective treatments against this pathogen [7].

RSV mainly infects epithelial cells of the respiratory tract, but dendritic cells, lymphocytes, and macrophages are also susceptible to productive infection [8–10]. During the course of infection, cells produce cytokines, chemokines, and other immune mediators that contribute to the elimination of the virus, but this can also cause an exacerbated inflammatory response leading to severe disease [11].

Nitric oxide (NO) is an early immune mediator that is synthesized in response to pathogen challenge, and it is produced by immune cells through the activity of the inducible nitric oxide synthase (NOS II) [12, 13]. L-arginine and molecular oxygen are substrates for NOS II and are processed into the final products citrulline and NO [14]. NOS II gene transcription may be enhanced as a response to direct cellular infection or in a paracrine fashion by pro-inflammatory cytokines released by inflammatory cells [15].

Cellular NO production is tightly regulated at the level of synthesis by modulation of NOS II expression and by substrate availability. In the first case, high levels of NO activate a negative feedback loop to downregulate NOS II gene transcription, preventing further NO synthesis [16]. In the second case, the intracellular availability of L-arginine, which is used as a substrate by NOS II, can be reduced by expression of competing enzymes such as arginase, which converts arginine into ornithine and urea [17]. Arginases are classified according to their cellular localization as cytosolic or mitochondrial. Arginase 1 (Arg-1) is the cytoplasmic form and is mainly expressed in liver cells, although it can also be expressed in M2 macrophages in response to cytokines (e.g., interleukin IL-4 and IL-13) [17]. In fact, Arg-1 expression is considered a distinguishing feature of this subset of macrophages [18]. Mitochondrial arginase, on the other hand, appears to be involved in promoting cell division and deposition of collagen during ontogeny and wound repair [19].

During acute RSV infection in epithelial cells, an increase in NOS II and nitrite levels results in partial control of virus replication [12, 13]. However, it has not been determined whether NO synthesis is altered during RSV persistence. In the current study, we evaluated the expression of NO and its regulatory enzymes during acute and persistent RSV infection, using a previously described *in vitro* model based on RSV-infected murine macrophages [20].

Material and methods

Cell lines and virus

P388D1 macrophages persistently infected with the RSV strain Long (ATCC, VR-26) were characterized in our

laboratory as described previously [20]. As reported previously [21], the percentage of persistently RSV-infected macrophages (M ϕ P) varies between 90% and 97%, and the average amount of infectious virus in supernatants is $2.7 \times 10^2 \pm 205$ TCID₅₀/ml.

M ϕ P and the original P388D1 cell line, used as non infected macrophage control (M ϕ N), were maintained in supplemented RPMI cell culture medium (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA) containing 5% fetal bovine serum (Biowest, Veracruz, Mexico), 100 IU of penicillin (Invitro S.A., Mexico City, Mexico) per ml, 100 mg of streptomycin (Invitro S.A., Mexico City, Mexico) per ml, and 1 μ M 2-mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, MO, USA). Cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere in the presence of 5% CO₂. In this study, M ϕ P from passages 95 to 112 were used to perform the experiments.

The human epithelial cell line HEP-2 was cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 5% fetal bovine serum (Biowest, Veracruz, México), 100 IU of penicillin (Invitro S.A., Mexico City, Mexico) per ml, 100 mg of streptomycin (Invitro S.A., Mexico City, Mexico) per ml, 0.2% NaHCO₃, 10 mM HEPES, and 2 mM glutamine (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA). HEP-2 cells were used for propagation and for titration of RSV (wtRSV) by 50% endpoint dilution assay (TCID₅₀); the virus titer was calculated according to the Reed and Muench formula. The wtRSV propagated in HEP-2 cells was used to infect P388D1 macrophages as described in the next paragraphs.

Acute RSV infection

Acute infection of the P388D1 cell line (M ϕ A) was achieved by adding wtRSV at $10^{6.3}$ TCID₅₀/0.25 ml to M ϕ N (1×10^6 cells) in serum-free RPMI for 2 h (37 °C, 5% CO₂). After adsorption of the virus, the inoculum was removed, supplemented RPMI was added, and the infection was allowed to progress for the indicated times. The percentage of acutely infected cells was determined by direct immunofluorescence and flow cytometry (FACScan; Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) by using a FITC-labeled (525 nm emission peak) polyclonal anti-RSV antibody specifically directed against the N and F proteins (Oxoid, Hampshire, UK) as described previously [22]. Because this commercial antibody is also used for fluorescence microscopy, it includes Evans blue dye as counterstain (emission peak at 680 nm), which can be detected in the FL3-H channel of the flow cytometer. The results were analyzed using WinMDI 2.8 software (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA), and are presented in dot plots.

Cell viability

The viability of M ϕ A and M ϕ P was determined by measuring exclusion of 7-amino-actinomycin D (7-AAD, Sigma, St. Louis, MO, USA), by flow cytometry. After culturing for 24, 48 and 72 h, the supernatants were removed, and the monolayers were recovered in 500 μ l of cold PBS. Thus, the analysis was performed on cells that remained attached to the plate after removal of the supernatant. The cells were centrifuged at 300 \times *g* for 3 min at 4 °C and resuspended in 500 μ l of cold PBS, and 7-AAD was immediately added to a final concentration of 0.5 μ g/ml. During treatment, the cells were protected from light, and they were kept on ice for 15 min before analysis in a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA), using the FL3-H detection channel. As a positive control for 7-AAD incorporation, cells were permeabilized with acetone/methanol (1:1) for 5 min on ice and then washed and treated with 7-AAD for 15 min. Results were analyzed with the software CellQuest pro (Becton Dickinson, Biosciences, San Jose, CA, USA) and presented in graphs expressed as the percentage of cells that were viable.

NO determination

Intracellular levels of NO were determined by flow cytometry with the fluorescent indicator diaminofluorescein-2/diacetate (DAF-2/DA, Sigma, St. Louis, MO, USA). Briefly, 1×10^6 M ϕ P or M ϕ N were plated in 12-well flat-bottom plates and incubated overnight to allow adherence. Then, DAF-2/DA was added at a concentration of 10 μ M in supplemented RPMI, and the plates were incubated during the indicated time of culture. Subsequently, cells were detached by pipetting, washed once with 1 ml of PBS, and analyzed by flow cytometry in the FL1-H channel. NO production in M ϕ A was evaluated by adding the DAF-2/DA immediately after viral adsorption, allowing progression of the acute infection for the indicated time in the presence of this reagent. Cell detachment and flow cytometry analysis were done as described above. The mean fluorescence intensity of DAF-2/DA⁺ cells was determined, and the values for each culture were expressed as the fold increase with respect to the macrophage control (M ϕ N).

Quantitation of nitrites

In experimental assays where cells were treated with enzyme inhibitors, levels of NO were evaluated indirectly in supernatants, using the Griess reaction, which allows quantitation of nitrites in biological samples, according to the instructions of the Griess Reagent System (Promega Corporation, Madison, WI, USA). The Griess reaction product was analyzed on a microplate spectrophotometer (Benchmark Plus, Bio-Rad,

Hercules, CA, USA) at a wavelength of 535 nm. Determinations were performed in triplicate, and the concentration of nitrites in each sample was calculated from a sodium nitrite standard curve.

Western blot analysis

NOS II protein expression was evaluated by immunoblotting using total protein extracts from M ϕ N, M ϕ P, and M ϕ A. Protein extraction was carried out as described previously [23]. Forty micrograms of total protein was separated by electrophoresis on a Bis-Tris acrylamide gradient gel (4% to 12%) and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P Millipore Corporation, Temecula, CA, USA). NOS II and Arg-1 were detected using the appropriate antibodies at a dilution of 1:750 and 1:1000, respectively (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), with overnight incubation at 4 °C. Goat anti-rabbit peroxidase-conjugated antibody and goat anti-mouse peroxidase-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA, USA) were used at a 1:25,000 dilution as the secondary antibody. Membranes were stripped and incubated with anti- β -tubulin antibody (Santa Cruz Biotechnology CA, USA) at a dilution of 1:2,500 as a loading control. Relative expression was measured by chemiluminescence, using a SuperSignal West Pico Chemiluminescent Kit (Thermo Scientific, Hanover Park, IL, USA). Densitometry analysis was performed to determine the relative amounts of the NOS II and arginase 1 proteins as a ratio of the signal intensity relative to the signal intensity of the loading control. Western blot films were scanned with ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and the bands were analyzed using QuantityOne software (BioRad, Hercules, CA, USA).

Real-time quantitative polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from M ϕ N, M ϕ P, and M ϕ A for the indicated times using a Hybrid-R MiniPrep Kit (GeneAll, Seoul, Korea) according to the manufacturer's instructions. Then, cDNA was synthesized from 2 μ g of total RNA using Superscript II and oligo(dT) 12-18 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed with primers and probes (Assay on Demand 20 \times mix) for murine NOS II, Arg-1, and GAPDH (as an endogenous control), using the TaqMan assay reagent Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Cycling parameters were established according to the manufacturer's protocol in a StepOne Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The baseline and threshold were set using the auto-baseline and threshold feature, respectively, in StepOne Software v2.2.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Triplicates of cycle thresholds (Ct) were analyzed by the

comparative Ct (Δ Ct) method. Thus, the relative expression of each gene was determined by normalization to the amount of mRNA of cellular GAPDH as an endogenous reference gene.

NOS II inhibition activity

M ϕ P and M ϕ A were cultured in 6-well plates (1.5×10^6) for 24 and 36 h in the presence of the NOS-II-specific inhibitor 1400W (Sigma, St. Louis, MO, USA) at a concentration of 10 μ M, and a reinfection of M ϕ P was included as control by adding wtRSV in supplemented RPMI. After incubation, the supernatants were collected for quantitation of nitrites.

Arginase activity assay

Macrophages were seeded in 12-well plates (1×10^6 cells per well) and incubated overnight to allow adherence, after which the medium was replaced with fresh supplemented RPMI, and the cultures were allowed to grow for 12, 24, 48, and 72 h. Total protein was then extracted in lysis solution (0.1% Triton X-100 in ddH₂O), and one volume of 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, was added, followed by 80 μ l of 10 mM MnCl₂ for each ml of sample. The sample was stored at -70 °C until it was used for determination of activity. A 50- μ l portion of the sample was incubated at 56 °C for 10 min, 50 μ l of 0.5 M L-arginine (pH 9.7) was immediately added, and the sample was incubated at 37 °C for 60 min. The reaction was then stopped by addition of 400 μ l of an acid mixture (H₃PO₄ and H₂SO₄), and 20 μ l of α -ISPP (6% alpha-isonitrosopropiophenone) was added to each sample. The absorbance was read on a microplate spectrophotometer (Benchmark Plus, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at a wavelength of 540 nm. Determinations were performed in triplicate, and arginase activity was calculated according to a standard curve made with urea and was expressed as U/ml of product.

Inhibition of arginase activity

Macrophages were grown overnight in 12-well plates (1×10^6 cells per well) and then treated with the arginase inhibitor nor-NOHA (Santa Cruz Biotechnology CA, USA) at a concentration of 100 μ M for 12, 24, 48, and 72 h, in supplemented RPMI. Supernatants were collected, and nitrite production was determined by the Griess reaction, while total protein was obtained from monolayers to determine the arginase activity by the method described above. The effect of arginase inhibition on virus genome replication was evaluated by RT-qPCR with total RNA obtained from M ϕ P cultures treated with nor-NOHA for 24, 48 and 72 h.

L-arginine determination

The analysis of L-arginine was performed in supernatants of cultures of M ϕ N, M ϕ A and M ϕ P by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS), using a Quattro micro API tandem mass spectrometer with a commercial kit (NeoBase Non-derivatized MSMS Kit; PerkinElmer, Waltham, MA, USA), according to the previously described method [24]. Quantification of metabolites was achieved by using appropriate internal standards as references. Statistical analysis was performed using MetaboAnalyst.22. Partial least squares discriminant analysis (PLSDA) and variable importance in projection (VIP) scores was used.

Relative quantitation of the RSV genome

Quantitation of the RSV genome was performed with samples collected as described previously by RT-qPCR with the primer and probe mix from the Genesig Standard Kit for Respiratory Syncytial Virus type A (Primer Design Ltd, Chandler's Ford, UK). Triplicates of cycle thresholds (Ct) were analyzed by the comparative Ct ($\Delta\Delta$ Ct) method. Thus, relative expression of RSV was determined by normalization to the amount of mRNA of cellular GAPDH as an endogenous reference gene. The reactions were performed in a StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The baseline and threshold were set using the auto-baseline and threshold feature, respectively, from the StepOne Software v2.2.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Statistics

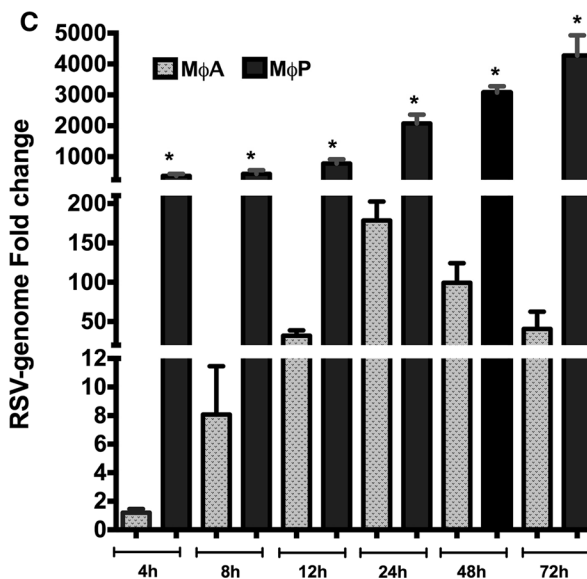
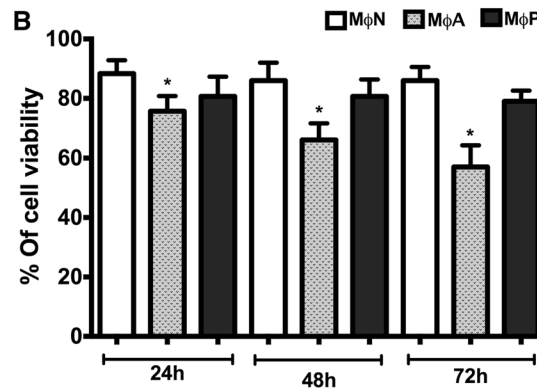
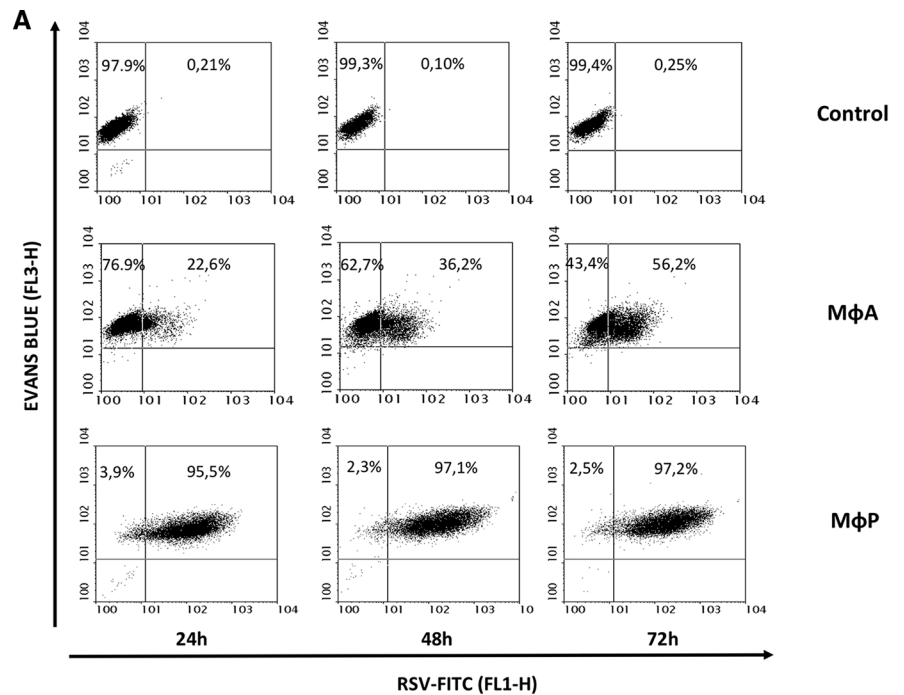
An unpaired Student's *t*-test was applied to evaluate differences between samples, and differences with *p*-values less than 0.05 were considered statistically significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Results

Kinetics of infection and viability

Acute and persistent RSV infections were evaluated in kinetic assays using direct immunofluorescence analyzed by flow cytometry to determine percentage of cells expressing viral proteins (Fig. 1a). M ϕ N, used as uninfected control cells, showed no RSV protein expression, whereas, as expected, M ϕ P cultures displayed a constant percentage of infected cells (95% to 97%) over time. In M ϕ A cultures, we observed a progressive increase in the percentage of infected

Fig. 1 Kinetics of acute and persistent RSV infection. a) The percentage of acutely (MφA) and persistently (MφP) RSV-infected macrophages was determined by direct immunofluorescence analyzed by flow cytometry. Uninfected macrophages (MφN) were included as control cells. The data are representative of three independent experiments. b) Viability of cell cultures was determined by the 7-amino-actinomycin D exclusion method, using flow cytometry. Significant differences with respect to MφN are indicated by (*) $p < 0.05$. c) RSV genome expression was determined in MφA and MφP at the indicated time points by RT-qPCR by the $\Delta\Delta C_t$ method, using GAPDH as an endogenous control. The data represent the average of three independent experiments. Significant differences between infected cultures at the corresponding time points are indicated by (*) $p < 0.05$



cells, from 22.6% at 24 h postinfection (hpi) to 56.2% at 72 hpi, associated with significant cell damage at 72 hpi ($43 \pm 7.2\%$ cell death), as evaluated by 7-AAD exclusion assay. Cell viability was preserved in M ϕ P throughout the experiment, with less than 23% cell death after 72 h (Fig. 1b). Thus, acute infection produced a significant cytopathic effect, in contrast with persistent infection (Supplementary Fig. S1). The dynamics of RSV genome replication were evaluated in both types of infected cultures by RT-qPCR by measuring relative expression with respect to genome levels at 4 hpi (calibrator). M ϕ A cultures showed a progressive increase in RSV genome levels during the first 24 hpi, up to 178-fold, followed by a 50% decrease (Fig. 1c) at 48 hpi. In contrast, after 4 h of growth, M ϕ P continued to display very high levels of viral genomic RNA when compared to acutely infected cells at the same time points, and a slight but constant increase was observed over time, from a 374-fold increase at the beginning of the assay to a 4273-fold increase at 72 h (Fig. 1c). A loss of cell viability and/or an antiviral response during acute RSV infection could be responsible of the drop in viral genome levels observed after 24 hpi.

Nitric oxide production in persistently RSV-infected macrophages is lower than in acute RSV-infected macrophages

NO production was evaluated in M ϕ N, M ϕ P, and M ϕ A, by using DAF-2/DA, a membrane-permeable compound that reacts with NO, forming an intracellular fluorescent product [25] that can be detected by flow cytometry to determine the percentage of NO-positive cells and the mean fluorescence intensity, which is directly associated to the NO level. As expected, during acute and persistent RSV infection, NO levels were significantly higher than those observed in M ϕ N, although they were similar during the first 24 h in both types of infected cultures (Fig. 2a). Subsequently, M ϕ A showed a significant 2 to 3-fold increase with respect to M ϕ P, with a tendency to rise progressively, whereas NO synthesis in M ϕ P decreased to levels close to those in M ϕ N, indicating a difference in the regulation of NO production during acute and persistent RSV infection. Because NO is a product of the enzymatic activity of NOS II, which uses L-arginine as a substrate, we investigated whether NOS II expression was altered, as a possible mechanism associated with the low NO synthesis in M ϕ P. First, we measured gene expression by RT-qPCR and observed in kinetic assays that NOS II mRNA was expressed at significantly higher levels in M ϕ A than in M ϕ P (up to 27-fold higher) during the first 24 h of culture (Fig. 2b), with maximal gene expression at 24 h and 8 h, respectively. Nevertheless, a drastic decrease in NOS II gene expression was detected at 48 h in both types of infected cells, reaching levels similar to those in M ϕ N.

Next, expression of NOS II at the protein level was examined by Western blot (Fig. 2c), and the results showed basal expression in control M ϕ N cultures, which was normally lower than that observed in M ϕ A and M ϕ P. The kinetics of enzyme expression, analyzed using densitometry, showed the highest level of NOS II in M ϕ A at 24 hpi, followed by a slight reduction at 48 hpi and a very low level at 72 hpi, in agreement with its corresponding mRNA expression pattern. Similar behavior was observed in M ϕ P, except that the major decrease in protein expression occurred after 48 h of culturing, corresponding to the earlier decrease in mRNA levels with respect to that in M ϕ A.

NOS II enzyme expressed in persistently RSV-infected macrophages preserves its capacity to synthesize NO

As the low levels of NO produced by M ϕ P could not be explained by a lack of expression of the NOS II enzyme, we then asked if the low level of NO synthesis during RSV persistence could be due to a loss of enzymatic activity. To address this question, we indirectly evaluated NOS II activity by treating M ϕ P with the commercial NOS II inhibitor 1400 W to determine whether the low level of NO production could be diminished even more, and this was compared to the effect of 1400 W on M ϕ A (Fig. 3). Additionally, M ϕ P cells were reinfected with wtRSV at an MOI of 2 to determine whether NO production could be increased even more. In this case, NO production was measured indirectly by the Griess reaction to quantify nitrites in conditioned medium in order to avoid treatment of cell cultures with more than one chemical compound. The results indicated that 1400 W reduced the level of nitrites in M ϕ P from $26 \pm 12.6 \mu\text{M}$ to $3.2 \pm 0.6 \mu\text{M}$ at 24 h, and from $38.7 \pm 15.5 \mu\text{M}$ to $5.9 \pm 0.7 \mu\text{M}$ at 36 h of treatment, whereas, in M ϕ A, nitrites were reduced from $49.8 \pm 3.3 \mu\text{M}$ to $5.1 \pm 2.6 \mu\text{M}$ at 24 h, and from $69.5 \pm 5.6 \mu\text{M}$ to $10.1 \pm 2.1 \mu\text{M}$ at 36 h, suggesting that the ability of NOS II to produce NO was preserved in both types of infected cultures. In the reinfected M ϕ P cultures, an increase in NO production was observed, although it was not statistically significant with respect to mock-infected M ϕ P, suggesting that NOS II had maintained its capability to synthesize NO in response to a new RSV challenge (Fig. 3).

Persistently RSV-infected macrophages display constitutive high-level expression of the arginase 1 mRNA that correlates with higher protein levels and enzymatic activity

Considering that the enzymatic activity of NOS II was preserved in M ϕ P, we hypothesized that the low level of NO synthesis could be a consequence of low NOS II substrate

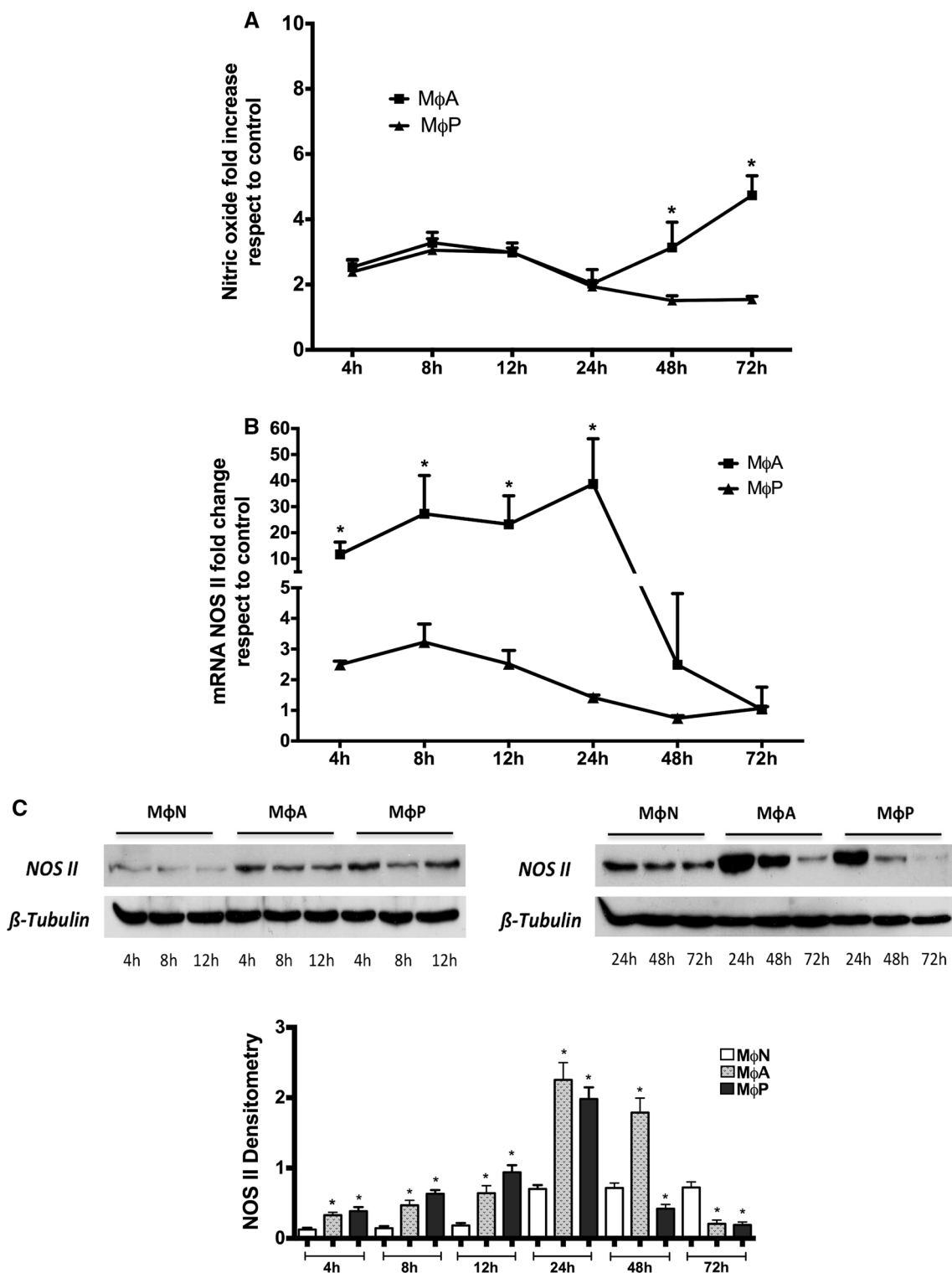


Fig. 2 Nitric oxide production and nitric oxide synthase II expression. a) Intracellular levels of NO were measured using diaminofluorescein-2/diacetate, which reacts with intracellular NO, forming a fluorescent product that can be detected by flow cytometry. Geometric mean fluorescence intensities at the indicated times were measured, and the fold increase relative to the control (MφN) was graphed. b) Kinetics of nitric oxide synthase II (NOS II) mRNA was evaluated

in MφA and MφP relative to MφN by RT-qPCR, using the $\Delta\Delta Ct$ method. c) Kinetics of NOS II protein expression was evaluated in MφN, MφA and MφP by Western blot; β -tubulin was used as a loading control. The data represent the average of three independent experiments. Significant differences with respect to the control are indicated by (*) $p < 0.05$

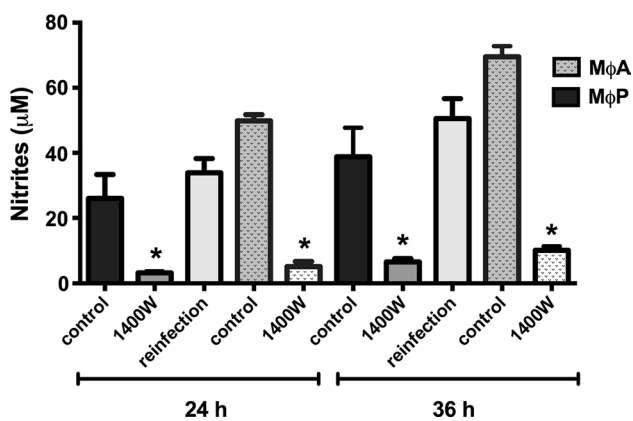


Fig. 3 Inhibition of nitric oxide synthase II. a) Nitric oxide synthase (NOS II) activity was inhibited by treatment of MφA and MφP with the chemical reagent 1400 W at a concentration of 10 µM for 24 or 36 h. The nitrite concentration was determined using the Griess reaction. Untreated cultures were used as a control. The effect of viral reinfection on nitric oxide production was also determined in MφP at 24 and 36 hpi. The data represent the average of three independent experiments. Significant differences between 1400 W-treated cells and untreated control cells are indicated by (*) $p < 0.05$

availability due to overexpression and activity of the arginase enzyme [17]. The kinetics of Arg-1 mRNA expression in MφA with respect to control MφN exhibited constant downregulation (Fig. 4a), whereas in MφP, this gene was expressed at very high levels, showing a 9800-fold increase at 24 h and a 3500-fold increase at 72 h with respect to MφN, indicating that the Arg-1 gene is constitutively expressed during RSV persistence. We then evaluated expression of the Arg-1 protein by Western blot, and it was clearly detected only in MφP, beginning at 12 h of culture, as two isoforms, one of 35 kDa and one of 38 kDa (Fig. 4b). In addition, arginase enzymatic activity was found to be evaluated in an *in vitro* assay and, as expected, significantly higher in MφP than in MφA. This increase was maintained from 12 to 72 h in MφP (Fig. 4c), suggesting that this enzyme could be processing L-arginine during persistent RSV infection, reducing its availability to be used by the NOS II enzyme to synthesize NO.

Inhibition of arginase increases production of nitrites and reduces persistent RSV genome replication

To evaluate our hypothesis, we inhibited the activity of the arginase enzyme in MφP using the selective inhibitor nor-NOHA at a concentration of 100 µM for 12, 24, 48, and 72 h and then measured nitrite levels. Arginase activity showed a significant decrease that was maintained over time even though the inhibitor was added at the beginning of the assay (Table 1). Under these conditions, we observed up to a fifty-percent increase in nitrite levels at

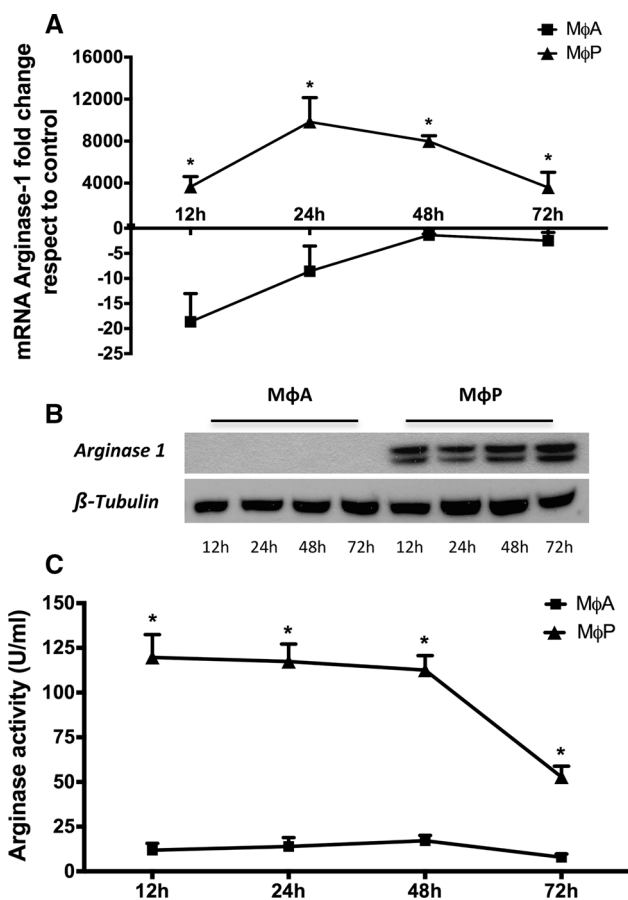


Fig. 4 Arginase 1 expression and enzymatic activity. a) Kinetics of arginase 1 (Arg-1) mRNA in MφA and MφP measured by RT-qPCR using $\Delta\Delta Ct$ analysis, relative to MφN, which was set to 1. b) Kinetics of Arg-1 at the protein level, evaluated in MφA and MφP by western blot; β -tubulin was used as a loading control. c) Arginase activity in whole-cell lysates of MφA and MφP cultured for 12, 24, 48 and 72 h. The amount of colored product generated in this assay was determined at 60 min. Arginase activity is represented as U/ml. The data represent the average of three independent experiments. Significant differences with respect to control are indicated by (*) $p < 0.05$

72 h of treatment (Fig. 5a), suggesting that inhibition of Arg-1 increases the amount of L-arginine available for use by NOS II as a substrate. We therefore measured the concentration of this amino acid in conditioned medium from MφP treated with nor-NOHA and from untreated MφP. The supplemented culture medium had an initial concentration of 267.0 ± 17.0 µg/ml of L-arginine per ml. After 12 h of enzyme inhibition, the L-arginine concentration decreased to 199.4 ± 28.2 µg/ml (a 1.3-fold decrease) and after 24 h, it decreased to 105.2 ± 30.4 µg/ml. Afterwards, a gradual and slow uptake over time was observed (Fig. 5b). In contrast, untreated MφP showed an abrupt 56-fold reduction of L-arginine levels between 12 and 24 h of culture, suggesting that active Arg-1 is expressed

Table 1 Arginase activity. MφP cells were incubated in the presence or absence of the arginase inhibitor nor-NOHA (100 μM) for 12, 24, 48 or 72 h. The mean values from three independent experiments are shown as U/ml

Time	MφP (U/ml)	MφP+nor-NOHA (U/ml)
12 h	119.6±12.7	49.8±4.6
24 h	117.3±9.7	60.3±4.4
48 h	112.5±9.7	50.1±2.6
72 h	52.8±6.0	25.4±2.9

constitutively in MφP, reducing L-arginine availability as a substrate for NOS II to produce NO (Fig 5a).

Finally, to determine whether viral genome replication in MφP was affected by the increased levels of nitrites caused by inhibition of arginase, RT-qPCR was used to measure the levels of RSV genomic RNA at 24, 48 and 72 h of nor-NOHA treatment. Under these conditions, we detected a 20% and 40% reduction in viral genomic RNA levels at 48 h and 72 h, respectively (Fig. 5b), suggesting that a partial recovery of NO production contributed to inhibit the replication of the RSV genome in persistently infected cells.

Discussion

NO is involved in a broad spectrum of physiological and antimicrobial activities, and its synthesis is tightly regulated at multiple levels to avoid immunopathogenesis [26]. During infection by DNA and RNA viruses, NO is an effector that participates in viral clearance, although some viruses have evolved mechanisms to evade its effects and avoid elimination [27]. In the current work, we observed that NO was differentially produced during acute and persistent RSV infection, with diminished synthesis in MφP that was not associated with the lack of NOS II enzymatic activity but instead to constitutive expression of the Arg-1 enzyme in its active form.

Acute RSV infection is a stimulus that induces NO synthesis in macrophages at increasing levels over time, although a significant increase in NO was only observed after the highest level of RSV genome replication was reached, after which viral replication decreased by half, suggesting that NO participated in the control of virus replication. Intriguingly, during RSV persistence, a progressive increase in RSV genomic RNA levels did not stimulate NO overproduction, and in fact, a significant decrease in NO levels was observed after 48 h, and the levels were close to those detected in uninfected cells, indicating that high-level production of NO was prevented in MφP, possibly as a mechanism to maintain virus persistence.

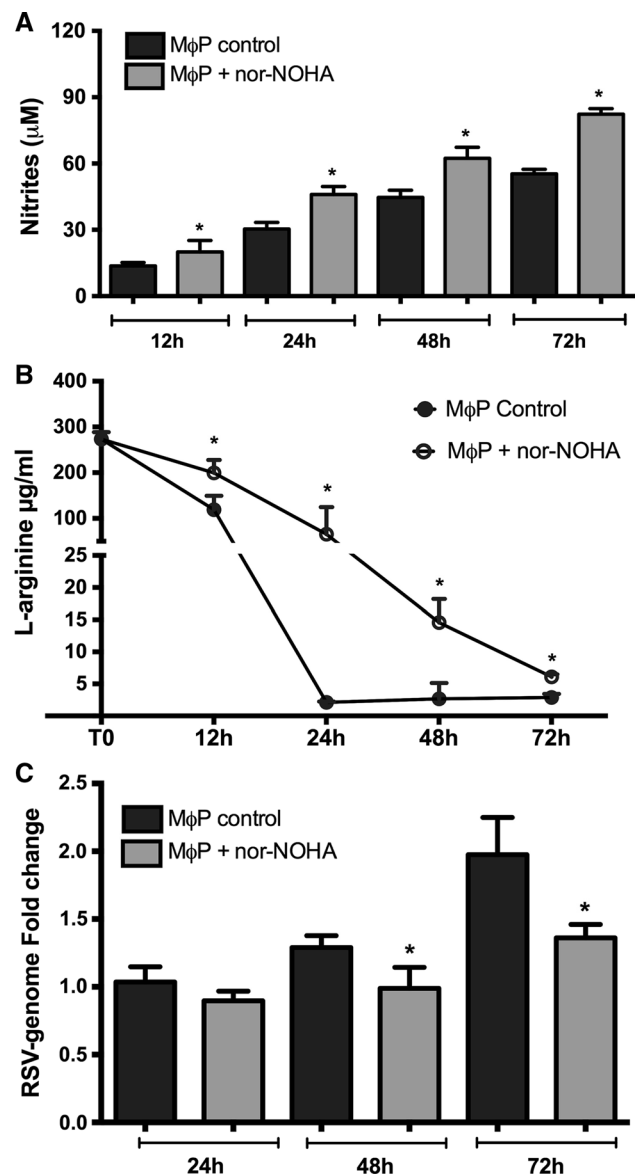


Fig. 5 Effect of arginase inhibition on nitrite synthesis and expression of the RSV genome. a) MφP cells were cultured in the presence or absence of the arginase-specific inhibitor nor-NOHA at 100 μM for 12, 24, 48 or 72 h, and nitrites in the supernatants were then quantified by the Griess reaction. b) The L-arginine concentration in conditioned medium from MφP treated with nor-NOHA or untreated MφP was determined by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry at the indicated times. c) Expression of the RSV genome was determined in MφP treated with nor-NOHA or untreated MφP using RT-qPCR by the $\Delta\Delta C_t$ method, using GAPDH as an endogenous control. The data represent the average of three independent experiments. Significant differences between nor-NOHA-treated and untreated cells are indicated by (*) $p < 0.05$ in each case

We observed that acute and persistent RSV infections progressed with different patterns of NOS II mRNA expression, as well as of NO production. When NO levels significantly increased in MφA, a drastic reduction of NOS II mRNA

occurred concurrently and, as expected, protein disappearance continued up to 72 h, possibly because the half-life of the protein is longer than that of its corresponding mRNA, suggesting that NO synthesis was possibly regulated during acute infection by a negative feedback loop that is dependent on the NO level [28]. In contrast, NO levels remained low in M ϕ P even though active viral genome replication continued and NOS II enzyme expression was maintained at levels similar to those in M ϕ A. Thus, Arg-1 overexpression in M ϕ P might be the principal mechanism associated with NO downregulation, since a lack of enzymatic activity was ruled out when RSV reinfection was observed to result in NO synthesis. It has been reported that arginase can inhibit NO synthesis by competing with NOS enzymes for the substrate L-arginine. Although the affinity of L-arginine is higher for NOS than for arginase, that activity of arginase is 1000-fold higher than that of NOS II, indicating enzymatic activity is the main biochemical factor associated with this competition [29]. Thus, constitutive expression of an active Arg-1 may be associated with the maintenance of persistent RSV infection, since its pharmacological inhibition resulted in a significant increase in nitrite levels along with a 40% reduction in viral genome copy number.

Arginase expression may be induced to control inflammation in response to high levels of NO or its prolonged production, as well as after signaling with anti-inflammatory cytokines such as IL-4, IL-10, and TGF- β [18]. However, we previously determined that these three cytokines were not expressed in our M ϕ P cultures [21]. Arginase is also induced by intracellular pathogen infection (e.g., *Mycobacterium tuberculosis*) of primary mouse macrophages to suppress NO production in a signaling pathway dependent on Toll-like receptors (TLRs) and MyD88 for activation of the transcription factor C/EBPB, which binds the Arg-1 enhancer [30]. Therefore, we hypothesize that the high level of expression of arginase in M ϕ P might have been induced by TLRs-mediated persistent stimuli together with the viral genome, resulting in synthesis of harmless levels of NO.

Although few studies have evaluated the function of arginase during chronic virus infection, induction of Arg-1 in musculoskeletal inflammatory lesions and infiltrating macrophages of Chikungunya and Ross River virus-infected mice has been reported to be associated with reduced virus clearance and disease resolution. It has also been shown that genetic deletion of Arg-1 in myeloid cells results in enhanced viral control in inflamed muscle tissue [31]. On the other hand, studies have demonstrated that impairment of T cell responses is the major cause of failure to clear hepatitis C virus (HCV) in infected individuals [32, 33]. In this sense, myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) from patients with chronic HCV infection have been reported to suppress T cell function via an Arg1-dependent mechanism [34]. During viral infection, Arg-1 is released from MDSCs [35, 36]

and is considered a major determinant of the suppression of CD8⁺ T cell function through L-arginine depletion, which results in downregulation of CD3 ζ and inhibition of T cell function [37]. Cai et al. showed that T cell proliferation and IFN- γ production, suppressed by the presence of MDSCs in MDSC-T cell co-cultures, was almost completely restored after administration of the arginase inhibitor NOHA or L-arginine supplement [34], suggesting an important role for Arg-1 expression in the chronic persistence of these viruses.

Therefore, we propose that maintenance of the viral genome is favored by overexpression of Arg-1 during RSV persistence. More studies are required to evaluate and elucidate the mechanisms associated with overexpression of Arg-1 and their role in this and other models of chronic infection.

Acknowledgements The authors thank Jorge Gaona Bernal and Juan Miranda Ríos for helpful discussions and constructive comments during the course of this work. Also, thanks to Arturo A. Wilkins Rodríguez and Laila Gutiérrez Kobeh of the Research Unit for Translational Medicine, UNAM, for technical assistance with arginase activity determinations, and Isabel Ibarra-González and Marcela Vela-Amieva of the Laboratory of Inborn Errors of Metabolism and Screening of the National Institute of Pediatrics for technical assistance in L-arginine determinations, and finally, to Ana Flisser for English editing and the facilities granted for the culmination of the paper. This paper is part of the fulfillment of the requirements for the PhD degree of CSO within the Posgrado en Ciencias Biológicas of Universidad Nacional Autónoma de México.

Funding This research was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (Grant 179838), by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (Grant PAPIIT IN218916), and by the School of Medicine, UNAM.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have not conflict of interest.

References

1. Vandini S, Biagi C, Lanari M (2017) Respiratory syncytial virus: the influence of serotype and genotype variability on clinical course of infection. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/ijms18081717>
2. Piedimonte G (2015) RSV infections: State of the art. *Cleve Clin J Med* 82:S13–S18. <https://doi.org/10.3949/ccjm.82.s1.03>
3. Falsey AR, McElhaney JE, Beran J et al (2014) Respiratory syncytial virus and other respiratory viral infections in older adults with moderate to severe influenza-like illness. *J Infect Dis* 209:1873–1881. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit839>
4. Díez-Domingo J, Pérez-Yarza EG, Melero JA et al (2014) Social, economic, and health impact of the respiratory syncytial virus: a systematic search. *BMC Infect Dis* 14:544. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0544-x>
5. Rezaee F, Gibson LF, Piktet D et al (2011) Respiratory syncytial virus infection in human bone marrow stromal cells. *Am J Respir*

- Cell Mol Biol 45:277–286. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0121OC>
6. Schwarze J, Schauer U (2004) Enhanced virulence, airway inflammation and impaired lung function induced by respiratory syncytial virus deficient in secreted G protein. *Thorax* 59:517–521. <https://doi.org/10.1136/thx.2003.017343>
 7. Jha A, Jarvis H, Fraser C, Openshaw PJM (2016) Respiratory syncytial virus. *SARS MERS Other Viral Lung Infect.* <https://doi.org/10.1183/2312508X.10010315>
 8. Cheung MB, Sampayo-Escobar V, Green R et al (2016) Respiratory syncytial virus-infected mesenchymal stem cells regulate immunity via interferon beta and indoleamine-2,3-dioxygenase. *PLoS One* 11:1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163709>
 9. Goritzka M, Makris S, Kausar F et al (2015) Alveolar macrophage-derived type I interferons orchestrate innate immunity to RSV through recruitment of antiviral monocytes. *J Exp Med* 212:jem.20140825. <https://doi.org/10.1084/jem.20140825>
 10. Qin L, Hu CP, Feng JT, Xia Q (2011) Activation of lymphocytes induced by bronchial epithelial cells with prolonged RSV infection. *PLoS One* 6:1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027113>
 11. Tabarani CM, Bonville CA, Suryadevara M et al (2013) Novel inflammatory markers, clinical risk factors, and virus type associated with severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 32:437–442. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3182a14407>
 12. Kao Y, Piedra P, Larsen G, Colasurdo G (2001) Induction and regulation of nitric oxide synthase in airway epithelial cells by respiratory syncytial virus. *Am J Respir Crit Care Med* 163:532–539
 13. Song W, Liu G, Bosworth CA et al (2009) Respiratory syncytial virus inhibits lung epithelial Na⁺ channels by up-regulating inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 284:7294–7306. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806816200>
 14. Schindler H, Bogdan C (2001) NO as a signaling molecule: effects on kinases. *Int Immunopharmacol* 1:1443–1455. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00089-3](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00089-3)
 15. Hiroyuki T, Ryoh T, Masaya O et al (1999) Respiratory syncytial virus infection of human respiratory epithelial cells enhances inducible nitric oxide synthase gene expression. *J Leukoc Biol* 66:99–104
 16. Aktan F (2004) iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 75:639–653. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.10.042>
 17. Caldwell RB, Toque HA, Narayanan SP, Caldwell RW (2015) Arginase: an old enzyme with new tricks. *Trends Pharmacol Sci* 36:395–405. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.03.006>
 18. Rath M, Müller I, Kropf P et al (2014) Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front Immunol* 5:1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>
 19. Dzik JM (2014) Evolutionary roots of arginase expression and regulation. *Front Immunol* 5:1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00544>
 20. Sarmiento RE, Tirado R, Gómez B (2002) Characteristics of a respiratory syncytial virus persistently infected macrophage-like culture. *Virus Res* 84:45–58. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(01\)00420-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(01)00420-8)
 21. Rivera-toledo E, Salido-guadarrama I, Rodríguez-dorantes M et al (2017) Conditioned medium from persistently RSV-infected macrophages alters transcriptional profile and inflammatory response of non-infected macrophages. *Virus Res* 230:29–37. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.001>
 22. Rivera-Toledo E, Torres-González L, Gómez B (2015) Respiratory syncytial virus persistence in murine macrophages impairs IFN- β response but not synthesis. *Viruses* 7:5361–5374. <https://doi.org/10.3390/v7102879>
 23. Gaona J, Santiago-Olivares C, Ortega E, Gómez B (2014) Respiratory syncytial virus persistence in macrophages upregulates fc γ receptors expression. *Viruses* 6:624–639. <https://doi.org/10.3390/v6020624>
 24. Ibarra-González I, Rodríguez-Valentín R, Lazcano-Ponce E, Vela-Amieva M (2017) Metabolic screening and metabolomics analysis in the intellectual developmental disorders Mexico study. *Salud Publica Mex* 59:423–428. <https://doi.org/10.21149/8668>
 25. Chowdhury KD, Sen G, Sarkar A, Biswas T (2011) Role of endothelial dysfunction in modulating the plasma redox homeostasis in visceral leishmaniasis. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1810:652–665. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.03.019>
 26. Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2:907–916. <https://doi.org/10.1038/ni1001-907>
 27. Majano PL (2003) Does nitric oxide play a pathogenic role in hepatitis C virus infection? *Cell Death Differentiation.* <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401115>
 28. Kopincová J, Púzserová A, Bernátová I (2011) Biochemical aspects of nitric oxide synthase feedback regulation by nitric oxide. *Interdiscip Toxicol* 4:63–68. <https://doi.org/10.2478/v10102-011-0012-z>
 29. Wu G, Morris SM (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336:1–17. <https://doi.org/10.1042/bj3360001>
 30. Kasmi KCEI, Qualls JE, Pesce JT et al (2008) Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat Immunol* 9:1399–1406. <https://doi.org/10.1038/ni.1671>
 31. Stoermer K, Burrack A, Oko L et al (2012) Genetic ablation of arginase 1 in macrophages and neutrophils enhances clearance of an arthritogenic alphavirus. *J Neuroimmunol* 189(8):4047–4059. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201240>
 32. Bowen DG, Walker CM (2005) Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 436:946–952. <https://doi.org/10.1038/nature04079>
 33. Thimme R, Oldach D, Chang K-M et al (2001) Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 194:1395–1406. <https://doi.org/10.1084/jem.194.10.1395>
 34. Cai W, Qin A, Guo P et al (2013) Clinical significance and functional studies of Myeloid-derived suppressor cells in chronic Hepatitis C patients. *J Clin Immunol* 33:798–808. <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9861-2>
 35. Das A, Hoare M, Davies N et al (2008) Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 205:2111–2124. <https://doi.org/10.1084/jem.20072076>
 36. Sandalova E, Laccabue D, Boni C et al (2012) Increased levels of arginase in patients with acute hepatitis B suppress antiviral T cells. *Gastroenterology* 143:78–87.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.03.041>
 37. Rodriguez PC, Ochoa AC (2008) Tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev* 222:180–191. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00608.x> Arginine

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.