

12
Zej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**



**INFECCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES
DE RATA CON VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

P R E S E N T A :

VICTOR HUGO CASASOLA MENDOZA

DIRECTOR DE TESIS :

DR. JESUS CASASOLA FLORES

COASESOR DE TESIS :

MVZ. GERARDO CRUZ JIMENEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1992



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 está 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.

I N D I C E

Contenido	Página
Resumen	
Abreviaturas	
Introducción	1
Antecedentes	5
Planteamiento del problema	12
Objetivos	13
Hipótesis	14
Materiales y Métodos	15
Resultados	26
Tablas y Figuras	30
Discusión	44
Conclusiones	47
Referencias	48

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1	Inmunofluorescencia Indirecta	30
Fig. 1	Inmunofluorescencia Indirecta Pba Positiva (VSR)....	31
Fig. 2	Inmunofluorescencia Indirecta Pba Negativa (VSR)....	32
Fig. 3	Inmunofluorescencia Indirecta Pba Positiva (Sendai). 33	
Tabla 2	Capacidad Bactericida	34
Fig. 4	Capacidad Bactericida	35
Tabla 3	Quimioluminiscencia	36
Tabla 4	Quimioluminiscencia	37
Fig. 5	Quimioluminiscencia	38
Fig. 6	Quimioluminiscencia	39
Tabla 5	Replicación del virus	40
Fig. 7	Macrófago alveolar (Wright).....	41
Fig. 8	Prueba de Esterasa Inespecifica Positiva	42
Fig. 9	Prueba de Esterasa Inespecifica Negativa	43

RESUMEN

Las infecciones del tracto respiratorio bajo se encuentran entre las primeras causas de morbilidad en infantes; por lo que representan uno de los principales problemas de salud en el mundo.

La etiología de estas infecciones involucra como principales agentes causales a virus y bacterias. Entre los agentes virales el Virus Respiratorio Sincicial (VSR) es el principal responsable de las infecciones respiratorias en los infantes. Siendo los cuadros más frecuentes los de bronquiolitis y neumonía. En cuanto a los agentes bacterianos estos se encuentran principalmente asociados a la infección viral causada por VSR produciendo superinfecciones aislando con más frecuencia al Streptococcus pneumoniae y Haemophilus influenzae.

En el presente trabajo se detectaron alteraciones funcionales de los macrófagos alveolares de rata infectados por el Virus Respiratorio Sincicial mediante los métodos de capacidad bactericida y quimioluminiscencia, utilizando como referencia macrófagos alveolares normales y macrófagos alveolares infectados con Virus Sendai como control positivo. También se determinó el antígeno viral en las células mediante el método de Inmunofluorescencia Indirecta Anticomplemento así como la replicación del virus en estas células fagocíticas.

La capacidad bactericida para los macrófagos alveolares infectados con VSR fué de $\bar{x} = 6.72$, $s = 2.98$ siendo esta menor a la respuesta observada con los macrófagos alveolares infectados con Virus Sendai: $\bar{x} = 14.166$, $s = 2.357$ y a la de los macrófagos normales $\bar{x} = 14.44$, $s = 5.393$. Con respecto a la quimioluminiscencia se encontró una menor actividad para las células infectadas con VSR en comparación con la respuesta que presentaron las células de los otros dos lotes. También se pudo observar la presencia del antígeno del VSR en la superficie del macrófago así como su replicación en esta célula.

La funcionalidad del macrófago alveolar se ve disminuida por la infección del VSR por lo que es necesario profundizar en estos estudios para conocer el grado de afección que se presenta en la respuesta inmune en el curso de esta infección.

A B R E V I A T U R A S

Solución Balanceada de Fosfatos	PBS
Mielo Peroxidasa	MPO
Iones Cloruro	Cl
Formol Mistirato Acetato	PMA
Suero Fetal de Ternera	SFT
Virus Respiratorio Sincicial	VSR
Unidades Formadoras de Colonia	UFC
Unidades Formadoras de Placa	UFP
Nitroazul de Tetrazolio	NTB
Efecto Citopático	ECP
Acido Ribonucleico	RNA
Leucocitos Polimorfonucleares	PMN
Revoluciones Por Minuto	RPM
Inmunoglobulina G	IgG
Solución Balanceada de HanRs	SBH
Etilen Diamino Tetracetico	EDTA
Micro litro	ul
Mililitro	ml
Adsorbido	AD
Miligramos	mg
Microgramos	ug
Lavados Broquialveolares	BAL
Milivots	mv

I N T R O D U C C I O N

Los padecimientos de las vías respiratorias constituyen una causa importante de morbilidad en todo el mundo, representando las infecciones de vías respiratorias bajas causa frecuente de mortalidad, sobre todo en países en vías de desarrollo. Así, se ha estimado que entre 2 a 5 millones de niños mueren cada año por neumonías y bronquiolitis tanto de origen bacteriano o viral [1, 2]. En México las enfermedades respiratorias ocupan uno de los primeros lugares en cuanto a la tasa de morbimortalidad, siendo las causantes de aproximadamente el 10% de las muertes registradas bajo el rubro de influenza y neumonías [3]. La etiología viral es la causa más frecuente de infecciones respiratorias, sobre todo en población infantil, y en este aspecto hasta el 94% de los casos son causados por 4 tipos de virus: el Virus Respiratorio Sincicial (VSR), Adenovirus, Virus Parainfluenza y Virus Influenza [4].

Descrito como patógeno humano en 1956, el VSR constituye el agente viral más frecuente de las infecciones de las vías respiratorias bajas en niños [4], causando hasta el 43% de las mismas en niños menores de 4 años y aumentando la frecuencia en los menores de dos años de edad. La infección por VSR se adquiere en las características epidémicas que se presentan a finales de otoño y principios de primavera, con picos de incidencia en los meses de Enero y Febrero [5, 6, 7]. Siendo la principal causa de bronquiolitis y neumonía en los infantes de pocos meses de edad [7, 8, 9].

El VSR es clasificado en el subgrupo de los pneumovirus de la familia paramixoviridae, son viriones pleomórficos, su genoma es lineal con una tira sencilla de RNA y su replicación ocurre en el citoplasma. El pneumovirus difiere del paramixovirus por la ausencia de neuraminidasa. El VSR contiene hemaglutinina, el virión tiene un diámetro de 80 a 400 nm y es inactivado con éter, cloroformo, tripsina al 0.25%, desoxicolato de sodio al 0.1%, a pH= 3 es inactivado pero a pH= 4 es estable, es un virus termolábil, y su genoma codifica para 8-9 polipéptidos el VSR es adsorbido (AD) del 60-90% en 30 minutos a 37 grados centígrados y el virus adsorbido penetra a la célula en 45 minutos. A las 12-16 hrs es producido el virus de progenie y de 36 a 48 hrs se producen 45-150 unidades formadoras de placa por mililitro de medio (UFP/ml). Este virus no produce inhibición del metabolismo celular, pero si produce efecto citopático (CPE) [8, 10].

Desde principios de este siglo, las enfermedades virales han sido relacionadas a inmunosupresión y como predisponentes a sobre infecciones bacterianas. A partir de observaciones y experimentos "in vitro", algunos mecanismos han sido identificados por los cuales los virus pueden suprimir la inmunidad, encontrando pocos casos en los cuales los virus pueden causar inmunosupresión: la investigación de estos mecanismos resulta necesaria ya que conociéndolos se puede conducir a intervenciones dirigidas para evitar la inmunosupresión inducida por el virus [11].

Uno de los mecanismos por el cual los virus causan inmunosupresión, es cuando estos dañan células que participan en la fagocitosis, en la presentación de antígeno y en los mecanismos efectores inespecíficos de la inmunidad mediada por células. Los virus que infectan macrófagos son la determinante crítica de la susceptibilidad del hospedero en la infección por algún virus. La habilidad que tienen algunos virus para replicarse o retener la infección en los macrófagos es determinante importante de la virulencia, ya que los macrófagos activados son las principales células efectoras involucradas en la defensa del hospedero contra agentes infecciosos y neoplasias [12,13]. Sin embargo; la susceptibilidad de la infección varía en relación a varios factores, entre ellos están las diferencias metabólicas y funcionales de los macrófagos de una especie animal a otra y aún en diferentes sitios corporales [14].

Los macrófagos alveolares son leucocitos que tienen mayor probabilidad de contacto inicial con patógenos de vías respiratorias. En este aspecto además de que fagocitan partículas virales los macrófagos lisan células infectadas por virus y son mediadores de citotoxicidad dependiente de anticuerpo [11]. Sin embargo; la influencia que los virus tienen sobre las funciones de las células fagocíticas han recibido poca atención.

En este contexto se reporta que los macrófagos infectados por virus influenza y por virus herpes simple presentan respuesta disminuida a estímulos quimiotácticos [15,16]

Igualmente la infección de macrófagos por el Virus Sendai [17] produce disminución en la fagocitosis, así mismo; macrófagos alveolares infectados por el virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina mostraron una disminución en la fagocitosis [18].

Existen pocos datos con respecto a la respuesta inmune y el VSR. En un estudio de pacientes con bronquiolitis producida por VSR la respuesta inmune mediada por células fué mayor los primeros 10 días de la enfermedad en relación a los pacientes con neumonía por el mismo microorganismo [19], este hallazgo se puede correlacionar con estudios de autopsia de pacientes con bronquiolitis y neumonía por VSR donde se observó una cantidad escasa o nula de virus en los casos de bronquiolitis y muy abundante en los casos de neumonía [20]. Los pocos reportes sobre patogenia e inmunidad para el VSR pueden ser debidos a que ha sido muy difícil tener un modelo animal experimental para este virus [21]. Sin embargo; Prince y cols. [22] han utilizado ratas *Sigmondon hispidus* como modelo animal de infección para VSR con éxito y en la actualidad este modelo es utilizado para el estudio del proceso neumónico causado por el VSR [23].

ANTECEDENTES

La flora de un organismo humano es el resultado de una delicada interacción balanceada entre los microorganismos y su medio ambiente. La microflora representa una importante defensa contra los microbios principalmente patógenos de los cuales algunos se incluyen en la flora normal. Si este balance es perturbado puede haber un sobre crecimiento y colonización de especies potencialmente patógenas las cuales pueden causar enfermedad. Las infecciones virales son un factor común por el cual se puede presentar este desequilibrio [24,25].

Las infecciones del tracto respiratorio bajo son frecuentemente seguidas de superinfecciones bacterianas. Muchas especies de bacterias como: Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae y Haemophilus influenzae se encuentran involucradas. Todas estas bacterias forman parte de la flora normal residente de la mayoría de los individuos. Pero los principales agentes bacterianos asociados con la infección del Virus Respiratorio Sincicial son Haemophilus influenzae y Streptococcus pneumoniae [26,27,28,29,30].

Las infecciones dobles del tracto respiratorio bajo con agentes bacterianos y virales se asocian con un incremento de morbilidad y mortalidad comparado con la infección producida por un solo microorganismo.

Al parecer no hay interacción directa entre virus y bacteria que incremente la virulencia de ambos agentes. La interacción está mediada por factores del hospedero, principalmente por factores que son parte del sistema normal de defensa. La infección viral puede alterar la función de estos factores (TABLA 1). Normalmente las regiones distales de los pulmones son estériles. Pequeñas partículas, incluyendo bacterias depositadas en vías aéreas son rápidamente inactivadas o removidas de los pulmones. En las infecciones virales la eficiencia de estos sistemas de eliminación se inhiben y como resultado se observa un incremento en el número de bacterias en el pulmón.

La bacteria viable depositada en los pulmones es rápidamente inactivada. El mecanismo de esta actividad bactericida no está completamente claro pero se cree que los macrófagos alveolares son de primera importancia y que los leucocitos polimorfonucleares son secundariamente importantes [24,31,32].

TABLA 1. Factores del Hospedador afectados por la infección viral.

Edema pulmonar
Movimiento Mucociliar Ondulatorio disminuido
Actividad bactericida disminuido
Adherencia y Penetración de la bacteria a células aumenta
Respuesta Inmune Humoral y Celular
Interferón e Inmunomoduladores

Las células fagocíticas principalmente los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y los macrófagos actúan sobre los microorganismos y otras partículas extrañas para destruirlos y removerlos del hospedador. El proceso de la fagocitosis es la principal defensa antimicrobiana por lo que es muy importante el estudio de la infección de los macrófagos alveolares por el Virus Respiratorio Sincicial (VSR) ya que estas células del tracto respiratorio bajo están íntimamente relacionadas con la respuesta inmune del hospedero en los procesos infecciosos de estas vías.

Los macrófagos son generados en médula ósea por diferenciación de células precursoras pluripotenciales. Estas células se desarrollan y maduran en la secuencia de precursores de macrófago y luego en macrófago.

Esta célula fagocítica es parte fundamental de la respuesta inmune ya que además de eliminar la partícula extraña promueve la activación de otras células que forman parte de la respuesta celular y humoral. Para ello el macrófago requiere de varias funciones integradas. Dichas funciones se resumen en la tabla 2 y se muestran en la figura 1.

Tabla 2. Funciones de Macrófago.

Función	Mediadores
Inflamación y Fiebre	FNT, IL-1, PRG y C ³
Activación Linfocitaria.	Presentación de antígeno y secreción de Interleucinas.
Reorganización de Tejido.	Secreción de factores: Elastasa, colagenasa, hialuronidasa, FEF.
Daño al tejido	Secreción de peróxido de hidrógeno, hidrolasas ácidas.
Actividad microbicida	Dependientes de oxígeno: Peróxido de hidrógeno, anión superóxido, singulete de oxígeno, ión hidroxilo, hipoclorito. Independientes de oxígeno: Lisozima, hidrolasas, proteínas cationicas.
Actividad Tumoricida.	Acción citotóxica, Proteasas, arginasas, FNT.

Bellanti. Inmunología 3a Ed. 1986 Interamericana

FNT: Factor de Necrosis Tumoral, IL-1: Interleucina 1, PRG: Prostaglandinas, C³: Complemento, FEF: Factor Estimulante de Fibroblastos.

Observando la importancia que tiene el macrófago dentro de la inmunidad es necesario conocer los aspectos que se modifican en esta célula cuando es infectada por el VSF. Tomando en cuenta que son las principales células efectoras involucradas en las defensas del hospedador contra agentes infecciosos y neoplasias [12,13].

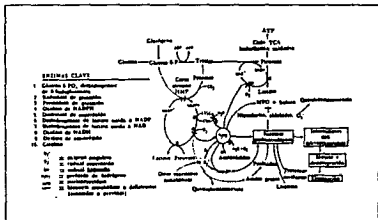
En algunos estudios realizados por Ketelsen [15] y Kleirman [16] los macrófagos infectados con el Virus Herpes y Virus Sendai muestran una disminución en la fagocitosis, resultados similares fueron obtenidos por Forman [18] con el Virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina.

En una investigación de Gordon y cols [33] encontraron que los leucocitos polimorfonucleares de niños con infección viral muestran una capacidad bactericida disminuida además de una baja reducción de nitroazul de tetrazolio (NTB).

Domourat y cols [34] demostraron la expresión del antígeno del virus respiratorio sincicial por inmunofluorescencia indirecta en linfocitos y monocitos de sangre periférica de niños infectados con VSR sugiriendo que puede presentarse la infección de células inmunocompetentes.

Con estos antecedentes en este trabajo se evalúan las modificaciones que se presentan en la capacidad funcional de los macrófagos alveolares obtenidos de ratas Lewis infectadas con el VSR. El efecto de la infección viral se encaminó al estudio de la capacidad bactericida, quimioluminiscencia, la expresión del antígeno viral así como la replicación del virus en estas células fagocíticas.

Actividad Microbicida.



Procesamiento de Antígeno

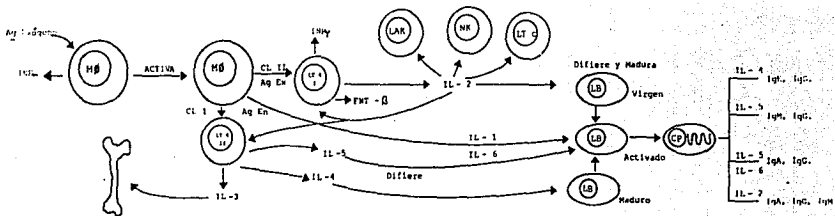
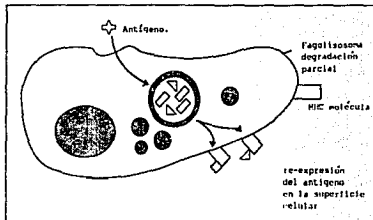


Fig I: Funciones del Macrófago en la respuesta Inmune

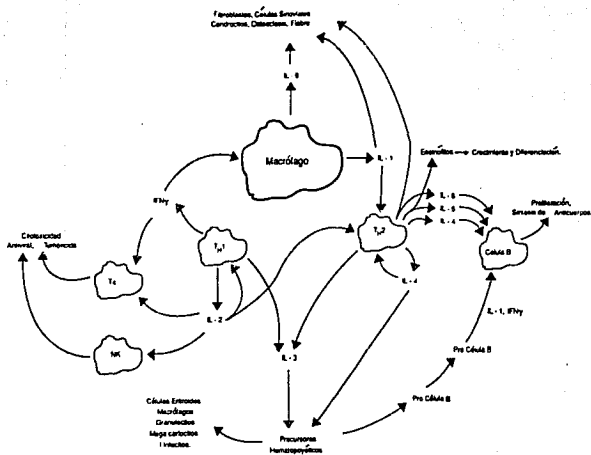


Fig II: La comunicación en cadena de las Interleucinas en la respuesta inmune.

Miguel, S.B. The interleukins. F ASEB J. 3: 2388: 1989.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Virus Respiratorio Sincicial (VSR) es un patógeno de las vías respiratorias bajas que causa severas infecciones en infantes. Los macrófagos alveolares constituyen la primera línea de defensa de este tracto, por lo que su infección por el VSR puede alterar su función y la de otras células involucradas en la respuesta inmune provocando una mayor susceptibilidad a la infección viral y a otras infecciones asociadas causadas principalmente por bacterias como Streptococcus pneumoniae y Haemophilus influenzae.

OBJETIVOS

- 1.- Determinar si los macrófagos alveolares obtenidos de ratas infectadas con virus respiratorio sincicial (VSR) son capaces de replicar el virus.
- 2.- Estudiar los efectos producidos por la infección con Virus Respiratorio Sincicial en las funciones de los macrófagos alveolares obtenidos de ratas infectadas experimentalmente.

H I P O T E S I S

Los macrófagos alveolares son infectados por VSR en un modelo experimental "in vitro" e "in vivo".

Los macrófagos alveolares infectados con VSR presentan alteraciones en sus funciones fagocíticas y microbicidas.

MATERIALES Y METODOS

6.1.- Animales. Se utilizaron ratas Lewis hembras adultas y con un peso de 250 a 300 gr.

6.2.- Modelo de Infección. Se trabajó con 3 lotes de 5 ratas cada uno, los cuales fueron infectados con Virus Respiratorio Sicicial (VSR), otros 3 lotes también con 5 animales por cada uno se infectaron con Virus Sendai y otros 5 lotes de ratas fueron utilizados como controles. Las ratas se inocularon por vía intranasal con 10⁶ Unidades Formadoras de Placa (UFP) del virus Sendai o VSR en 100 ul de medio RPMI-1640. El tiempo de infección fué de 5 días, después del cual se procedió a extraer los macrófagos alveolares de las ratas [22,35,36].

6.3.- Células. En esta investigación se utilizó células Hep-2 las cuales se cultivaron en 15 ml de medio M-199 (Microlab) suplementado con 10% de suero fetal de ternera (SFT) (Biocell), 100 mg/ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomycin. El cultivo se realizó en botellas de plástico de 250 ml (Costar) y se incubaron durante 72 hrs a 37 C, en atmósfera de 5% de CO₂ y con humedad de 80%.

6.4.- Virus. Virus Respiratorio Sinicial cepa Long (VSR-Long) y Virus Sendai donados por el Doctor Víctor Pena C. del Children's Hospital Medical Center. Boston Mass. USA. Los virus se replicaron en monocapas de células Hep-2. Estas monocapas antes de la infección tenían un 100% de confluencia, fueron lavadas con solución balanceada de fosfatos 0.15 M (PBS), estas células se inocularon con 500 ul de la suspensión viral, el virus se dejó adsorber (AD) durante 60 minutos a 31 C bañando la monocapa por inclinación de la botella cada 5 minutos, después de la adsorción se agregaron 15 ml de medio de mantenimiento Leibovitz L-15 (Microlab) suplementado con 2% de SFT (Biocell) y se incubaron a 31 C hasta observar el efecto de la replicación del virus que causa en las células Hep-2 (3 a 5 días post-infección), cuando esto sucedió se centrifugó la suspensión a 3000 Revoluciones por Minuto (RPM) durante 10 minutos para separar restos celulares. El sobrenadante se fraccionó en volúmenes de 1 ml y se congeló inmediatamente a -85 C. La titulación de los virus se realizó mediante el método de dilución latente en tubo:

En tubos de vidrio para cultivo se colocan 2 ml de una suspensión de células Hep-2 en medio M-199 (Microlab) las cuales fueron previamente cultivadas en botellas hasta alcanzar una confluencia del 100%, posteriormente se lavaron con PBS y se tripsinizaron durante 3 minutos, se desprendieron y homogenizaron. Estas células se adherieron

al tubo durante 24 horas y luego se lavaron con PBS y se les adicionó 1-3 ml de medio de mantenimiento L-15. Se hicieron diluciones seriadas del virus en medio L-15 (10^{-1} 10^{-9}). Se inocularon 200 ul de la dilución del virus en los tubos con células. Por cada dilución del virus se inocularon 5 tubos y se dejó un control (sin inocular). Los tubos se incubaron a 31°C durante 10 días, observandolos diariamente hasta notar algún efecto sobre las células en comparación con las células del tubo control. El título del virus se determinó con la mayor dilución del virus que produce el efecto citopático (CPE) [22,23,34,37,38,39].

6.5.- Antisueros contra VSR y Virus Sendai. Se utilizaron sueros de ratas infectadas con estos virus las cuales fueron inoculadas con 10^6 UFP del virus correspondiente por vía nasal cada 5 días durante 30 días, después de este tiempo se sangraron a blanco, separado el suero, el cual fue tratado con solución de sulfato de amonio saturada agregando lentamente y en agitación hasta completar volumen/volumen, se continuó la agitación por 2 hrs en frío, al término de este periodo se centrifugó a 2000 RPM por 20 min para separar las gammaglobulinas, se dió un segundo tratamiento con sulfato de amonio. Las gammaglobulinas obtenidas se inocularon en cobayos con el mismo esquema de inoculación, después del sangrado se separó el suero y se precipitó de la misma forma con sulfato de amonio, las anti-gammaglobulinas obtenidas se

pasaron por columna de DAE cefarosa para purificar las IgG las cuales fueron conjugadas con isotiocianato de fluoresceína, la cual se realizó en buffer de boratos pH= 9.8 se agregaron 10 mg de anticuerpos con 20 ug de Isotiocianato de Fluoresceína "Sigma" se mezclan en 2 ml de buffer de carbonatos cuidando que no varíe el pH, se coloca en agitación durante 3 hrs cubriendo con papel aluminio el recipiente y en frío, después de la conjugación se pasa a membrana de diálisis de 12 000 y se pone en diálisis en buffer de boratos pH= 8.5 durante 3 días con tres cambios de buffer por día, al cabo de este tiempo se proce a titular el conjugado haciendo diluciones dobles hasta una dilución de 1:1024 y cada dilución se confronta con células Hep-2 infectadas con el VSR o Virus Sendai según sea el caso. El título encontrado para el conjugado anti-VSR fué de 1:128 y para el de anti-Sendai fué de 1:64.

6.6.- Colección y Separación de Macrófagos Alveolares. Las ratas se anestesiaron con éter (Baker) en cámara cerrada y se exanguinaron a blanco de plexo braquial y después se se sacrificaron con éter y se procedió a la disección. Se hizo corte de piel de cuello y tórax en forma longitudinal con insición roma, se retiró la glándula tiroides y músculos esteromastoideos quedando al descubierto la traquea, misma que se refiere con seda 000 en la parte distal al pulmón, enseguida se provocó neumotórax abriendo mediante un corte con tijera la caja torácica. Ya expuestos

los pulmones se disecan cuidadosamente por medio de disección roma, se separa el corazón y los pulmones se lavan en solución helada de PBS hasta observar la mínima presencia de eritrocitos. Inmediatamente se canula la tráquea con una aguja de calibre 18G x 1 1/2" y con punta roma y se practican lavados bronquioalveolares (BAL) instilando 25 ml de una solución de PBS-EDTA (1:2000) estéril, recuperando aproximadamente 20 ml de suspensión celular, esta suspensión se centrifugó por 10 min a 3000 RPM separando el sobrenadante, el paquete celular se resuspendió en 10 ml de solución salina balanceada de Hank's libre de rojo de fenol (SBH) y se adicionaron lenta y cuidadosamente a un tubo que contenía 4.5 ml de Ficoll-Hypaque (Pharmacia) se centrifugó a 2000 RPM por 10 min con el fin de separar a los eritrocitos de los globulos blancos. Ya separadas las células blancas se lavarón 3 veces con 30 ml de SBH c/u, y finalmente se resuspenden en 1 ml de SBH [12,23,40,41].

6.7.- Evaluación Celular.

a) El número de macrófagos viables se determinó mediante la exclusión del colorante azul de tripano por medio de la cuenta de células en cámara de Neubauer al microscópio óptico a 40x por medio de la siguiente técnica:

100 ul de suspensión celular.

100 ul de Azul Tripano (Sigma) al 0.3 % en solución NaCl 0.85%

800 ul de solución balanceada de fosfatos (PBS).

b) El promedio de los macrófagos viable fue de 98% para los tres grupos.

c) Caracterización de los macrófagos alveolares. Se utilizó la técnica de esterasa inespecífica:

Se adhirieron los macrófagos alveolares durante 1 hora en laminillas de vidrio de 9 mm de diámetro previamente desengrasadas con etanol durante 4 hrs y esterilizadas, posteriormente se retiran las células no adherentes lavando las laminillas cuidadosamente con PBS.

Se fijan las células con acetona (Baker) fría durante 10 min.

Alfa naftilacetato 0.05 gr se mezclan con 5 ml de (2.5 ml de acetona y 2.5 ml de agua dest.).

De la mezcla anterior se adicionan 795 ul a una mezcla de 15 ml de agua destilada y 15 ml de PBS.

A esta solución se adicionaron 0.01 g de Fast-red (Sigma) y se filtró en papel filtro de poro mediano.

Se colocó la mezcla anterior sobre las laminillas con células durante 45 min, se lavaron con agua corriente y se secaron al aire, se montan con glicerol gelatina y se observan al microscópio óptico (Zeiss) a 100x.

En las figuras 8 y 9 se muestran las reacciones positivas y negativas de la prueba de esterasa positiva y negativa. En la prueba positiva (Fig. 8) se observa el citoplasma de la

célula de un color rojo-café, mientras que en la prueba negativa (Fig. 9) el citoplasma de la célula no se tife de color rojo quedando incoloro o tomando el color del colorante de contraste (verde).

6.8.- Determinación de la capacidad funcional de los macrófagos alveolares.

6.8.1.- Quimioluminiscencia (Peróxidasa). Este método opsonofagocítico se basa en la emisión de fotones durante la activación de los caminos oxidativos de los macrófagos dando como resultado la formación de moléculas excitadas electrónicamente y radicales libres: anión superóxido, singulete de oxígeno, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, hipoclorito. La interacción de estos con una hidrazina cíclica (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona: Luminol) por un proceso oxidativo produce aminoftalato (un anión electrónicamente excitado). Este es un intermediario inestable el cual pasa a un nivel de mayor energía emitiendo espontáneamente fotones, que amplifican eficientemente la quimioluminiscencia de las reacciones oxidativas que ocurren cuando son estimulados los macrófagos, los cuales involucran dos etapas principales: el primer requerimiento es la interacción de partículas y membranas dando como resultado la activación de metabolitos de oxígeno, y la segunda etapa involucra la interacción de estos radicales libres con la

mieloperoxidasa (MPO) y iones cloruros (Cl^-) produciendo:
 Cl^+ , Cl^- , y/o OCl^- [42,43,44].
 2

Método: Se colocó en una cubeta para el luminómetro una laminilla de vidrio de 9 mm de diámetro con células adheridas y se le adicionaron 700 ul de solución de Kreb's, 100 ul de peroxidasa (Sigma), 100 ul de luminol (Sigma) y al momento de comenzar las lecturas se le adicionan 100 ul de PMA (Formol-Mistirato-Acetato). El experimento se realizó para los macrófagos alveolares normales, infectados con Virus Sendai y para los macrófagos alveolares inefctados con Virus Respiratorio Sincicial. El luminómetro (LKB, Wallac, Luminometer) se programó a 20 ciclos de 120 segundos cada uno de modo continuo y a una temperatura de 36°C [44,45].

6.8.2.-Capacidad Bactericida.

Se obtienen los macrófagos alveolares de las ratas, en la forma anteriormente descrita y se ajustan estas células a una concentración de 5×10^6 cel/ml.

Las bacterias Staphylococcus aureus se crecieron 36°C durante 18 hrs en caldo soya tripticasa (Bioxon), se le hicieron dos lavados a las bacterias con solución de Hank's libre de rojo de fenol por 10 min a 6000 RPM y se ajustan en solución de Hank's a una absorbancia de 0.65 nm a una longitud de onda de 540 nm en espectrofotómetro (Sequoia-

Turner) lo que equivale al tubo 3 del Mac Farland teniendo una concentración de 9×10^8 bacteria/ml.

Posteriormente estas bacterias se opsonizaron con suero de rata normal durante 30 min a 37°C con agitación constante en las siguientes proporciones: En un vial estéril de 1 ml (Costar) se agregaron 200 ul de suero de rata normal, 100 ul de la suspensión bacteriana, 800 ul de solución de Hank's. Al término del periodo de opsonización la bacteria se lava 3 veces con solución de Hank's y se resuspendió en el volúmen inicial.

I.- Se prepararon 5 tubos con tapón rosca estériles a los cuales se les agregó 9.99 ml de agua destilada estéril.

II.- A un segundo juego de tubos de les agregó 900 ul de agua destilada estéril.

III.- Otro juego de tubos enumerados (1..5) se prepararon de la siguiente manera:

Tubo:

1 y 2: 160 ul de Bact. Opso. + 160 ul de Hank's.

3 y 4: 160 ul de Bact. Opso. + 160 ul de Macrófagos.

5 : 160 ul de Macrófagos + 160 ul de Hank's.

A partir de estos tubos se hicieron las diluciones correspondientes: Se agregaron 10 ul de las mezclas macrófagos-bacterias (juego de tubos III) a los tubos correspondientes del juego de tubos I y se agitaron, y se tomaron de estos tubos 100 ul y se agregaron a los tubos correspondientes del juego II, se agitaron y se tomaron 100 ul de estos tubos para plaquear por triplicado en cajas de

agar soya tripticasa (Bioxon) y se incubaron por 12 hrs a 37^o C (Tiempo 0).

Se dejaron incubar a 37^o C y con agitación el juego de tubos III durante 90 min, al término de este tiempo se adicionó el estímulo lisante Lysostaphin (Sigma) 10 ul, y se incubó en las mismas condiciones por 30 min más. Se realizaron las mismas diluciones que en el tiempo cero, y se plaquéó e incubó de la misma manera [46,47].

- 6.9.- Determinación de la expresión del antígeno viral En los macrófagos alveolares mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta anticomplemento. Se adhieren los macrófagos en laminillas de vidrio y se secan al aire, posteriormente se fijaron con acetona (Baker) durante 10 minutos y ya una vez secas se les adiciona el antisuero de rata y se incuban por 45 min/37^o C/5% CO₂/humedad. Al termino se lavaron con PBS por 10 min se secaron y se les adicionó el complemento de cobayo (Cappel) y se repitió el proceso de incubación y lavado con PBS, posteriormente se le adicionó el conjugado IgG fluoresceinado anti-C3 de cobayo (Cappel) y se incubó 45 min en las condiciones ya mencionadas. Se lava la laminilla con PBS por 10 min y con agua destilada por 10 min. Se seca la laminilla al aire y se monta con glicerina. Se observó al microscópio de epifluorescencia (Seizz) [34,36,37,39,48,49].

6.10- Determinación de la replicación viral en los macrófagos alveolares. Esta determinación se realizó para los macrófagos alveolares obtenidos de las ratas infectadas con VSR y para los obtenidos de las ratas normales e infectadas con Virus Sendai. Los macrófagos se adherieron en una botella para cultivo (Costar) durante 1 hora se lavaron y se incubaron con 15 ml de medio RPMI-1649 (Hazleton) suplementado con 20% de SFT y 2% de l-Glutamina (Hazleton) durante 24 hrs. cumplido este periodo se rompieron las células por congelación-descongelación rápida y con el sobrenadante se infectaron monocapas de células Hep-2 con medio L-15 y se incuban por un periodo de 7 días a 31^o C o hasta observar el efecto citopático [8].

6.11- Tratamiento Estadístico La prueba estadística que se realizó para observar la confiabilidad de los resultados fué la prueba de comparación de medias [Daniels W. Bioestadística].

RESULTADOS

Determinación del antígeno del Virus Respiratorio Sincicial (VSR) y del Virus Sendai. Se evaluó la capacidad de estos virus para infectar a los macrófagos alveolares de rata. En la tabla I se muestran los resultados de la Inmunofluorescencia Indirecta Anticomplemento, se puede observar que los macrófagos alveolares normales no presentan fluorescencia al enfrentarlos con los sueros de rata anti-VSR y al anti-Virus Sendai, mientras que los macrófagos alveolares obtenidos de las ratas infectadas con VSR por vía nasal sí presentaron fluorescencia cuando se enfrentaron al antisuero contra VSR y teniendo una reacción negativa cuando se enfrentó al anti suero contra el Virus Sendai. En cuanto a los macrófagos alveolares infectados con el Virus Sendai mostraron presencia de fluorescencia cuando fueron enfrentados al suero anti-Virus Sendai mientras que con el suero anti-VSR no presentaron fluorescencia [Figs. 1,2,3].

Capacidad Bactericida. Se determinó la capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares: Normales, Infectados con VSR e Infectados con Virus Sendai por medio de la cuenta de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) que corresponden al número de bacterias que fagocitaron los macrófagos a los 120 minutos de incubación con el S. aureus, las bacterias no fagocitadas se lizaron a los 90 minutos de la incubación con Lysostaphin.

Los resultados se muestran en la tabla 2 en el que se observa que el número de UFC que se presentó en el tiempo 0 de incubación para el control de bacterias y para los grupos de macrófagos alveolares son muy similares, no habiendo diferencias significativas entre ellos. En cambio las diferencias que se presentan en el número de UFC a los 120 minutos de incubación son muy notorias ya que para el control de bacterias se obtuvo una media aritmética de $x = 2.11$ ($s = 2.61$), mientras que para los macrófagos alveolares normales fué de $x = 14.44$ ($s = 5.39$). En los macrófagos alveolares infectados con el VSR observaron una media de $x = 6.72$ ($s = 2.986$), la cual fue muy inferior a la media presentada por los macrófagos alveolares infectados con el Virus Sendai en los cuales se vió un valor promedio de $x = 14.16$ ($s = 2.35$). En esta tabla 2 y en la figura 4 y se aprecia que la capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares infectados con VSR se encuentra disminuida en comparación con la respuesta que presentan los macrófagos alveolares normales y la de los macrófagos alveolares infectados con el Virus Sendai.

Quimioluminiscencia. Se evaluó la capacidad de activación de los caminos oxidativos de los macrófagos alveolares durante el estallido respiratorio. Los resultados se expresan en milivolt (mv) en un periodo de tiempo (ciclo). Las tablas 3 y 4 presentan los valores promedio y las Desviaciones Standar obtenidas en cada ciclo y para cada grupo de macrófagos alveolares. Se puede observar que los macrófagos normales

comienzan a presentar un mayor aumento de la actividad en el ciclo 7 teniendo un valor promedio de $x = 10.642$ ($s = 2.903$), en el grupo de macrófagos infectados con VSR este aumento se comienza a presentar en el ciclo 8 con una media aritmética de $x = 13.263$ ($s = 0.784$), mientras que para los macrófagos infectados con el Virus Sendai este incremento se presentó en el ciclo 5 con un valor promedio de $x = 17.039$ ($s = 3.31$). Ahora bien cabe notar que el máximo de la actividad y el ciclo en el que se presentó para cada grupo de células fué el siguiente: para los macrófagos normales fué de $x = 37.909$ ($s = 4.731$) y se presentó en ciclo 13, los macrófagos alveolares infectados con VSR tuvieron un máximo de actividad de $x = 29.579$ ($s = 2.154$) presentándose en ciclo 14 y para los macrófagos infectados con el Virus Sendai su máxima actividad se presentó en el ciclo 11 y fué de $x = 53.455$ ($s = 3.83$). En este cuadro y en las figuras 5 y 6 se observa una mayor actividad para los macrófagos alveolares obtenidos de ratas infectadas con el Virus Sendai en comparación con los macrófagos alveolares de ratas normales, a su vez la respuesta de estos dos grupos son mayores tanto en magnitud como en el tiempo requerido para alcanzar el máximo de actividad comparado con la respuesta que presentan los macrófagos alveolares obtenidos de ratas infectadas con el VSR.

Replicación de los Virus. En este experimento se evaluó la capacidad que tienen los virus Sendai y VSR para replicarse en los macrófagos alveolares de rata. En

la tabla 5 se muestran los resultados y en él se puede observar que el VSR tiene la capacidad de replicarse en estas células fagocíticas, mientras que el virus Sendai infecta al macrófago pero no se replica en él.

Tabla 1

Inmunofluorescencia Indirecta Anticomplemento de macrófagos alveolares obtenidos de ratas Lewis normales e infectadas por vía nasal con los virus VSR y Sendai (10 exp 6 UFP/100 ul).

Suero	Presencia de Fluorescencia		
	Normal	Anti-VSR	Anti-Sendai
Macrófagos Alveolares			
Normales	Negativo	Negativo	Negativo
VSR	Negativo	Positivo	Negativo
Sendai	Negativo	Negativo	Positivo

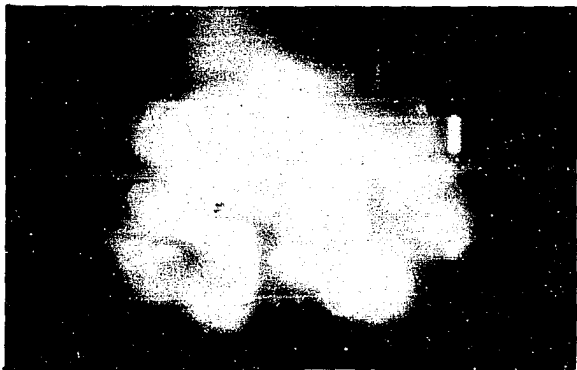


Fig. 1 Inmunofluorescencia Indirecta en macrófagos alveolares de ratas infectadas por vía nasal con VSR en la cual observamos la presencia de color verde en las células positivas.

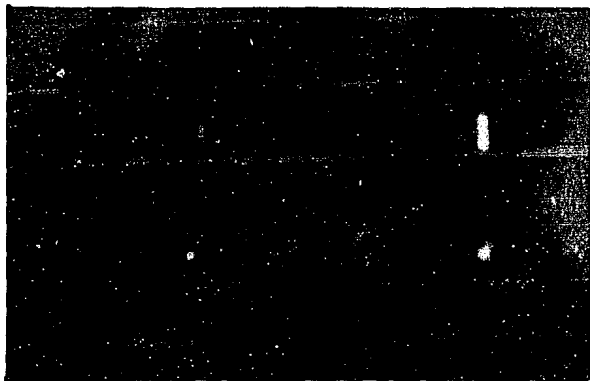


Fig. 2 Inmunofluorescencia Indirecta en Macrófagos alveolares de ratas normales en los cuales no se observa la presencia del conjugado fluorescente. Células negativas.

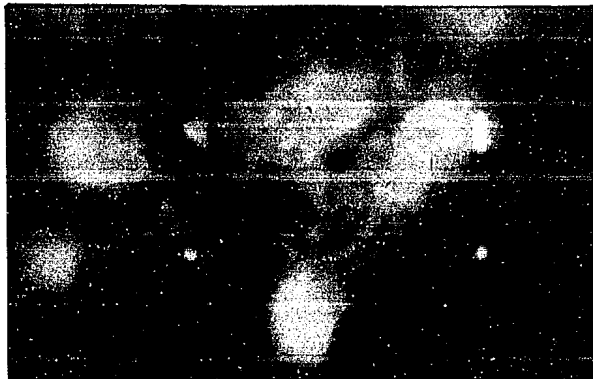


Fig. 3 Inmunofluorescencia Indirecta en Macrófagos alveolares de ratas infectadas con el Virus Sendai los cuales se observan impregnados de color verde en las células positivas.

Tabla 2

Capacidad Bactericida de Macrófagos Alveolares
de Ratas Lewis: normales, Infectadas con VSR e
Infectadas con Virus Sendai por Via Nasal con
10⁶ UFP en 100

Macrófagos Alveolares		U F C						
		Tiempo	Bacterias		Macrófagos Bacterias		Macrófagos	
			0'	120'	0'	120'	0'	120'
Normales	n	18	18	18	18	18	18	
	x	38.11	2.11	35	14.44	0	0	
	s	2.423	2.61	5.34	5.39	0	0	
Infectados VSR	n			18	18	18	18	
	x			36.94	6.72	0	0	
	s			4.15	2.986	0	0	
Infectados Sendai	x			36.72	14.16	0	0	
	s			4.09	2.35	0	0	

n= Número de Muestras, x= Media Aritmética s=Desviación Standar.

Bacterias 9×10 bac/ml.

Macrófagos Alveolares:

Normales 5.345×10 cel/ml.
VSR 5.773 " "
Sendai 5.008 " "

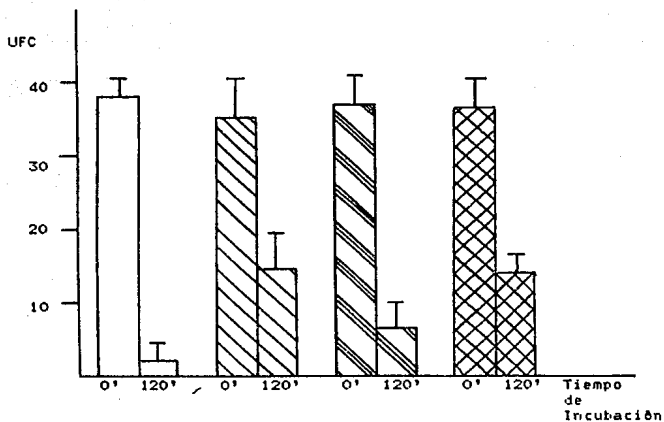


Figura 4

Figura 1 Capacidad Bactericida de Macrófagos alveolares obtenidos de ratas Lewis: Normales, Infectadas con VSR e Infectados con Virus Sendai.





-  Bacterias (*Staphylococcus aureus*)
 -  Macrófagos alveolares Normales.
 -  Macrófagos alveolares Infectados con VSR. ($Z_c=5.315d$)
 -  Macrófagos alveolares Infectados con Virus Sendai. ($Z_c=0.005$)
- $Z_t = -1.96$ a 1.96

Tabla 3

Quimioluminiscencia-Ensayo de fagocitosis por el método de peroxidasa de macrófagos alveolares de ratas Lewis Normales, Infectadas con VSR e infectadas con Virus Sendai por vía nasal con 10 ex 6 UFP en 100 ul.

Macrófagos Alveolares	Quimioluminiscencia (mv)					
	Normales		VSR		Sendai	
	x	s	x	s	x	s
0	1.023	0.010	0.019	0.034	1.279	0.0102
1	2.991	2.104	1.558	0.596	11.344	5.11
2	2.991	2.104	1.558	0.295	15.589	3.93
3	2.69	1.663	1.479	0.318	12.581	3.26
4	2.968	0.979	1.616	0.013	13.293	1.42
5	4.122	0.426	2.062	0.689	17.039	3.31
6	6.647	1.701	3.329	1.402	24.109	6.36
7	10.642	2.903	6.526	1.680	32.533	8.36
8	16.469	4.021	13.263	0.784	44.459	3.69
9	21.399	3.855	16.826	5.488	48.162	5.82
10	25.623	3.823	23.678	4.662	52.994	3.55
11	26.526	5.551	24.319	2.422	<u>53.455</u>	<u>3.83</u>
12	34.854	1.153	27.909	3.595	49.819	5.31
13	<u>37.909</u>	<u>4.731</u>	28.770	2.192	49.369	4.36
14	37.223	3.370	<u>29.579</u>	<u>2.154</u>	49.130	2.93
15	36.856	3.419	29.453	2.154	50.330	4.99
16	35.502	3.798	25.502	5.136	49.210	4.69

La lectura del ciclo 0 se realizó antes de adicionar PMA.

x = Media aritmética, s = Desviación Standar.

Nota: El número de muestras (n) para obtener la media aritmética (x) en cada ciclo y para cada grupo fue de 8 (n = 8).

Macrófagos alveolares Normales 72 008 cel/laminilla.

Macrófagos alveolares Infec. VSR 60 924 cel/laminilla.

Macrófagos alveolares Infec Sendai 75 877 cel/laminilla.

1 Ciclo = 120 segundos

Tabla 4

Quimioluminiscencia. Ensayo de fagocitosis por el método de peróxidasa de macrófagos alveolares de ratas Lewis Normales, Infeccionadas con VSR e infeccionadas con Virus Sendai por vía nasal con 10^6 UFP en 100 ul. (Valores Críticos)

Macrófagos Alveolares	Quimioluminiscencia (mv)					
	Normales		VSR		Sendai	
	x	s	x	s	x	s
Ciclo						
0	1.023	0.023	0.019	0.034	1.279	0.01
5					17.039	3.31
7	10.642	2.903				
8			13.263	0.794		
11					53.455	3.83
13	37.909	4.731				
14			29.579	2.154		

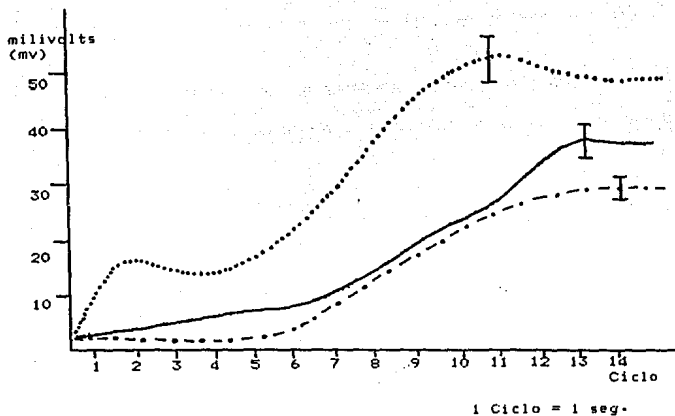


Figura 5

Fig. 3 Quimioluminiscencia de Macrófagos alveolares de ratas Lewis: Normales e Infectadas por vía nasal con los virus Sendai y VSR.

- Macrófagos alveolares Normales
- - - - - Macrófagos alveolares Infectados con VSR ($P < 0.01$)
- Macrófagos alveolares Infectados con Sendai. ($P < 0.005$)

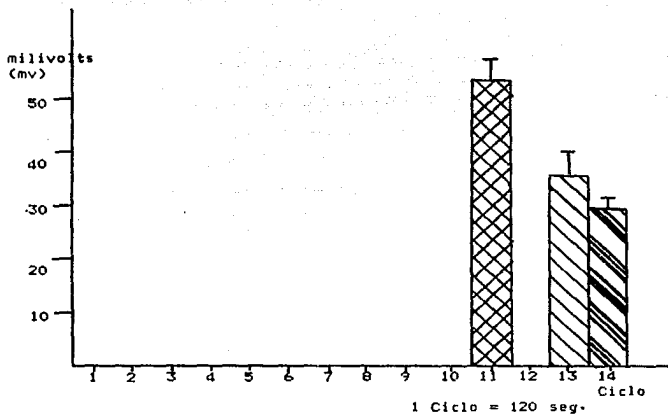


Figura 6

Fig. 4. Quimioluminiscencia de macrófagos alveolares de ratas Lewis: Normales e infectadas por vía nasal con los virus Sendai y VSR.




 Macrófagos alveolares Normales
 Macrófagos alveolares Infectados con VSR
 Macrófagos alveolares Infectados con Virus Sendai.

Tabla 5

Replicación de los virus Sendai y VSR en macrófagos alveolares obtenidos de ratas Lewis normales e infectadas con los virus VSR y Sendai por vía nasal con 10 exp 6 UFP/100 ul.

Efecto Citopático en Monocapas de Células Hep-2.	
Macrófagos Alveolares.	
Normales	Negativo
VSR	Positivo
Sendai	Negativo

Nota: Las monocapas de células Hep-2 con una confluencia del 100% se inocularon con el sobrenadante obtenido del rompimiento de los macrófagos alveolares por congelación-decongelación rápida.

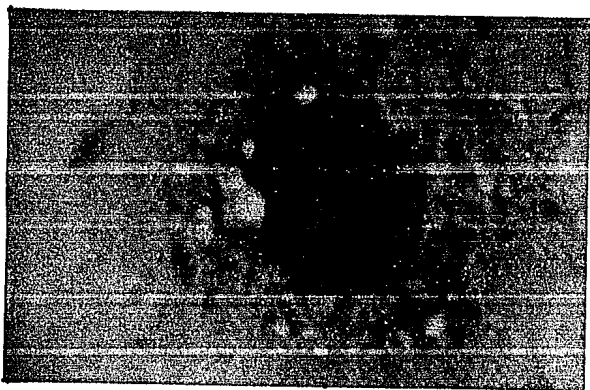


Fig. 7 Fotografia de un macrófago alveolar de
rata teñido con el colorante de Wright.

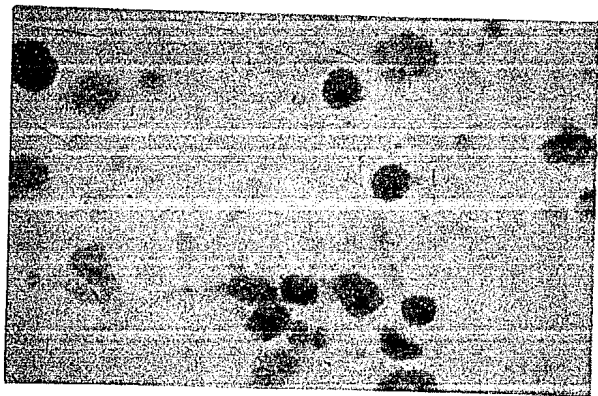


Fig. 3 Esterasa Inespecifica en macrófagos alveolares de rata, en el citoplasma de las células positivas observamos la presencia de un color marrón.

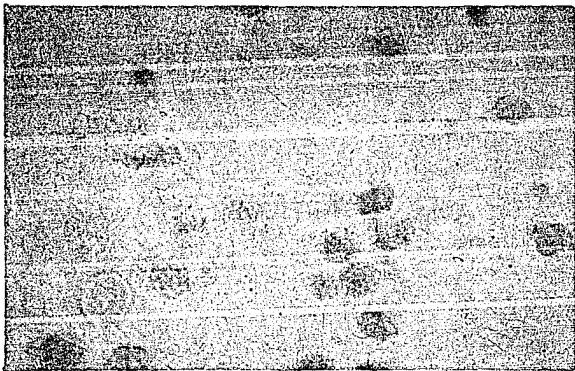


Fig. 9 Esterasa inespecifica en macrófagos alveolares de rata inhibiendo a la enzima con Floururo de sodio, en el citoplasma de las células se observa la presencia del colorante de contraste (verde de metilo) lo que nos indica una prueba negativa.

DISCUSION

El Virus Respiratorio Sincical (VSR) tiene la capacidad de infectar células involucradas en la respuesta inmune, tales como los leucocitos Poliorfonucleares de sangre periférica [34]. La expresión del antígeno del VSR se determinó por la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta Anticomplemento ya que presenta una sensibilidad y alta [34, 36, 37, 39, 48, 49] y mediante la cual se determinó satisfactoriamente, que el VSR tiene la capacidad de infectar a los macrófagos alveolares de rata. Es importante hacer notar que el VSR además de infectar al macrófago también presenta la capacidad de replicarse en él, lo que no ocurre con el Virus Sendai, el cual infecta a estas células fagocíticas pero no se replica en ellas. Estos resultados apoyan los de otras investigaciones [12,13] en las cuales se observó que los virus que son capaces de infectar y replicarse en los macrófagos provocan una mayor susceptibilidad del hospedero.

La disminución de la capacidad bactericida que presentan los macrófagos alveolares de ratas infectadas con VSR por vía nasal reafirman los resultados de otras investigaciones. Ketelsen [15] y Kleirman [16] trabajaron con macrófagos de bovino infectados con los virus Herpes y el Virus de la Rinotraqueitis

Infecciosa bovina y en los que también observaron una capacidad bactericida disminuida.

En los estudios de la capacidad de activación de los caminos oxidativos del macrófago durante el estallido respiratorio por el método de quimioluminiscencia el cual es muy práctico rápido y sensible, se observó que los macrófagos alveolares de ratas infectadas con VSR mostraron una actividad notablemente disminuida en comparación con la actividad que presentaron los otros dos grupos de macrófagos, estas diferencias no solo se presentan en la magnitud de la respuesta, sino que también en el tiempo que tarda la célula para alcanzar el pico de máxima actividad. Estos resultados obtenidos con macrófagos alveolares de rata muestran similitud a los que obtuvo Gordon [33] quien trabajó con leucocitos Poliorfonucleares de niños infectados con VSR los cuales mostraron una disminución de la capacidad bactericida y baja reducción de nitroazul de tatrazolio.

Estos resultados son compatibles con la importancia de estas células en la inmunidad, ya que su infección con el VSR le provoca una alteración funcional lo que repercute en severas bronquiolitis y neumonías asociadas a bacterias como Streptococcus pneumoniae y Haemophylus influenzae.

Definitivamente consideramos que este estudio estimula a continuar con la línea de investigación ya que no estudiamos la capacidad de presentar antígeno ni los aspectos secretores en los que se involucran a las prostaglandinas, leucotrienos, factor de necrosis tumoral e interleucinas los cuales tiene un papel determinante como mediadores en la respuesta inmune, ya que promueven la activación y proliferación de las células involucradas en los mecanismos de defensa, de modo que si el macrófago se ve afectado en la producción y liberación de estos mediadores la respuesta inmune se encuentra disminuida [50]. Ver figura II.

CONCLUSIONES

- a) Los macrófagos alveolares son infectados por el Virus Respiratorio Sincicial y el antígeno viral se determinó satisfactoriamente por el método de inmunofluorescencia indirecta anticomplemento.
- b) El Virus Respiratorio Sincicial induce inhibición de la capacidad bactericida en los macrófagos alveolares obtenidos de ratas infectadas con este virus.
- c) La capacidad bactericida se observó disminuida en los macrófagos alveolares obtenidos de ratas infectadas con Virus Respiratorio Sincicial, este decremento se observa tanto en la magnitud de la respuesta como en el tiempo requerido para alcanzar el máximo de su magnitud.
- d) Este virus presenta la capacidad de replicarse en los macrófagos alveolares por lo que su eliminación del tracto respiratorio bajo es muy difícil.
- e) En esta investigación se puede concluir que el Virus Respiratorio Sincicial provoca inmunodepresión ya que infecta y altera la funcionalidad del macrófago alveolar provocando una disfunción de la respuesta inmune, siendo esta la causa de que se presenten severas infecciones de las vías respiratorias bajas.

REFERENCIAS

- 1.- Denny F.W., Loda F.A. Acute Respiratory Infections are the Leading Cause of Death in Children in Developing Countries. Am J Trop Hyg. 1986;35:1-2.
- 2.- Pringle C.R. Progress Towards Control of the Acute Respiratory Viral Diseases of Childhood. Bull Who 1978;65:133-137.
- 3.- Armas D.J., Cano G. Epidemiología de una Enfermedad Común: La Gripe. Salud Pub. Mex. 1974;16:169-183.
- 4.- Ruíz G.J., Cedillo R., Cielo D., Bustamante C., Espinoza L. Infección Respiratoria: Estudio de 133 Familias. Gac. Med. Mex. 1979;115:347-358.
- 5.- Glezen W., Loda F., Clyde W., Senior R. Epidemiologic Patterns Acute Lower Respiratory Diseases of Children in a Pediatric Group Practice. J. Pediatr 1971;78:399-406.
- 6.- Sarkkinen O., Olli M., Heikki P., Erkki V., Jussi E. Identification of Respiratory Virus Antigens in Middle Ear Fluids of Children with Acute Otitis Media. J Infect Dis Vol 151, No 3, March 1985:444-448.

- 7.- De Silva L., Hanlon M. Respiratory Syncytial Virus: A Report of a 5 years Study at a Childrens Hospital. Journal of Medical Virology. 33:219-228 (1991).
- 8.- Murphy B., Prince G., Walsh E. Dissociation between Serumneutralizing and Glicoprotein Antibody Responses of Infants and Children who received Inactivated Respiratory Syncytial Virus Vaccine. Journal of Clinical Microbiology. Aug 1986, 197-202.
- 9.- Taylor G., Stott E., Hughes M., Collins P. Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice. Infection and Immunity 198d p 649-655.
- 10.- Stott E., Taylor G. Respiratory Syncytial Virus Brief Review. Archives of Virology 84:1-52 (1985).
- 11.- Rouse B., Horhov D. Immunosuppression in Viral Infections. Rev Infec Dis 1986;8:850-873.
- 12.- Lloyd C., Sithisarn P., Djinawi D. Role in Macrophages in Wesslesbron and Germinston Virus Infection in Mice. J Infec Dis Vol 131, No 2, 1975, 119-128.
- 13.- Scott P., James S., Sher A. Respiratory Burst is not Required for Killing of Intracellular and Extracellular Parasites by a lymphokine-activated macrophages Cell line. Eur J Immunol 1985;15:553-558.

- 14.-Welliver R., Kaul A., Ogra P. Cell-Mediated Immune Response to Respiratory Syncytial Virus Infection: relationship to Development of Reactive airway Disease. *J pediatr* 1979;94:370-375.
- 15.-Ketelsen A., Johnston D., Muscoplat C. Depression of Bovine Monocyte Chemotactic Response by Bovine Viral Diarrhea Virus. *Infect Immunol* 1979;25:565-568.
- 16.-Kleirman E., Snyderman R., Daniels C. Depression of Human Monocyte Chemotaxis by Herpes Simplex and Influenza Viruses. *J Immunol* 1974;113:1562-1567.
- 17.-Jakob G., Warr G. Immune-Enhanced Phagocytic Dysfunction in Pulmonary Macrophages Infected with Parainfluenza 1 (Sendai) Virus. *Am Rev Respir Dis* 1981;124:557-561.
- 18.-Forman A., Rabiuk L. Effect of the Infection Bovine Rhinotracheitis Virus Infection of Bovine Alveolar Macrophage Function. *Infect and Immun* 1982;35:1041-1047.
- 19.-Meisner H., Murray S., Kiernan M., Snyderman D., McIntosh K. A Simultaneous outbreak of Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Type 3 in a New Born Nursery. *J Pediatr* 1984;104:680-684.
- 20.-Garner P., McQuillin J., Court S. Speculation on Pathogenesis in Death from Respiratory Syncytial Virus Infection. *Br Med J* 1970;1:327-330.

- 21.--Collier A.,Clyde W. Model Systems for Studing the Pathogenesis of infectios Causing Broncheolitis in Man. Pediatric res 1977;11:243-246.
- 22.--Prince G.,Jenson a.,Horswood R.,Camargo E.,Chanok R. The Pathogenesis of the Respiratory Syncytial Virus Infection in Cotton Rats. Am J Pathol 1978;93:771-772.
- 23.--Sun C.,Wyde P.,Wilson B.,Knight V. Cell-Mediated Cytotoxic Responces in Lungs of Cotton Rats Infected with Respiratory Syncytial Virus. Am Rev Resir Dis 1983;127:460-464.
- 24.--Degrè M. Interaction Between Viral and Bacterial Infection in the Respiratory Tract. Scand J Infect Dis, Supp 149;1986:140-145.
- 25.--Faden H.,Ogra P. Neutrophils and Antiviral Defense. Pediatr Infec Dis J 5 (1);1986:86-91.
- 26.--Bale J. Creation of a Research Program to Determine the Etiology and Epidemiology of Acute Respiratory Tract infection among Children In Developing Countries. Reviews of Infec Dis, Vol 12, Suppl 8, Nov-Dec 1990:s861-s866.
- 27.--Edwyn B. The Epidemiology of Acute Respiratory Tract Infection in Young Chidrent Comparasion of Findings from several developing Countries. Infec Dis, Vol 12, suppl 8, Nov-Dec 1990:s870-s888.

- 28.--Wessenbacher M.,Carballal G.,avila M.,Harisiadi J.,Catalano M.,Cerqueiro C.,mutagh P. Etiologic and Clinical Evaluation of Acute Lower Respiratory Tract Infections in Young Children: An Overview. *infect Dis*, Vol 12, Suppl 8, Nov-Dec;1990:s889-s893.
- 29.--Ghafoor A.,Khalidnonani N.,Ishaq Z.,Zaidi S. Diagnoses of Acute Lower respiratory Tract Infections in Children in Rawalpindi and Islamabadi Pakistan. *Infect Dis*, Vol 12, Suppl 8, Nov-Dec;1990:s899-s914.
- 30.--Hortal H.,Mogdasy C.,Russ J. Microbial Agents Associated with Pneumonia in Childrens from Uruguay.*Infect Dis*, Vol 12, Suppl 8, Nov-Dec;1990:s915-s942.
- 31.--Korppi M.,Leinonen M.,Koskela M.,Makela H.,Launiala K. Bacterial Coinfection in Children Hospitalized with Respiratory Syncytial Infections. *Pediatr Infect Dis J* 8(10) 687-691.
- 32.--Hietala J.,Uhari M.,Tuokko H. Mixed Bacterial and Viral Infections are Comon in Children. *Pediatr Infect Dis J* 8 (10) 683-686.
- 33.--Gordon P.,Bayles P. Effect of Virus Infection on Polimorphonuclear Function in Children. *Br Med J* June 1976;26:1570.

- 34.-Domourat F.,Norbert J.,Walsh E.,Nagan R. Respiratory Syncytial Infection of Human Mononuclear Leucocytes "in vitro" e "in vivo". J Infer. Dis Vol 152, No 5, Nov 1985:895-902.
- 35.-Peffa C.,Reiss C.,Mc Intosh K. The Efect of Respiratory Syncytial Virus Infection on Mice Protein Malnutrition. J Med Virol 1991.
- 36.-Swenson P.,Kaplan M. Rapid Detection of Respiratory Syncytial Virus in Nasopharyngeal Aspirates by a Comercial Enzyme Immunoassay. Journal of Clinical Microbiology, March 1986, Vol 23, No 3: 485-488.
- 37.-Arens M.,Swierkoz E.,Schmidt R.,Armstrong T.,Rivetna K. Enhanced Isolation of Respiratory Syncytial Virus in Cell Culture. Journal of Clinical Microbiology, feh 1985, 286-287.
- 38.-Cannon M.,Stott E.,taylor G.,Askonas B.,Cearance of Persistent Respiratory Syncytial Virus Infections in Immunodeficient Mice Following transfer of T Cell. Immunology 1987, 62:133-138.
- 39.-Waner J.,Whitehurst N.,Jones S.,wall L.,Shalaby H. Isolation Viruses from Specimenes Submitted for Direct Immunoflourescence Test for respiratory Syncytial Virus. Proc Soc Exp Biol Med 1979;162:249-253.

- 40.-Pefa C. Sendai Virus Infection of Normal and Protein Malnourished Mice: Response of Airway Leukocyte to Infection. J Microbiol Pathol
- 41.--Skerrett S.,William R.,henderson R.,Thomas M. Alveolar Macrophage Function in Rats with Severe Protein Calorie Malnutrition. Arachidonic Acid Metabolism, Cytokine and Antimicrobial Activity. Journal of Immunology, Vol 144, No 3,1990. 1052-1061.
- 42.--Allred C.,Margetts J.,Hill H. luminol-Induce Neitrophill Chemiluminiscence. Biochemica and Biophysica Acta 631 (1980);380-385.
- 43.--Eastmon C.,Cole P.,Williams A.,Hastings M. The Measurement of Opsonic and Phagocytic Function by Luminol Depend Chemiluminiscence. Am J Immunol 1980, 41: 67.
- 44.--Salvaraj R.,Sbarra A.,Thomas G., Cetrulo C., Mitchel G. A Microtechnique for Studing Chemiluminiscence Response of Phagocytes Using Whole Boll and its Chemiluminiscece Response of Phagocytes in Pregnancy. Res Journal of Petiruloendntelial Society 31:3-16 (1986).

- 45.-Oleske J.,De la Cruz A.,Ahdieh H.,Sorvinjo J.,La Braico R.,Cooper R.,Singh R.,Minerfor A. Effects of Antibiotic on Polimorphonuclear Leukocyte Chemiluminescence and Chemotaxis. Journal of Atimicrobial Chemoterapy (1983) 12 suppl C,35-38.
- 46.-Giuner L.,Edwards M.,Anderson D., baker C. Immunoglobulin for Intravenous use Enhancement of "in vitro" Oponofagocytic Activity of Neonatal Serum. Infec Diss 1985;151:217-220.
- 47.-Orlowsky J.,Sieger L.,Bascom F.Bactericidal Capacity of Monocytes of Newborn Infants. The Journal of Pediatrics, Vol 89, No 5, 797-801.
- 48.-Pothier P.,Nicolas C.,Prudhomme G.,Kazmierczak A.,Bricoot F. Monoclonal Antibodies Against Respiratory Syncytial Virus and their Use for Rapid Detection of Virus in Nasopharingeal Secretions. Journal of Clinical Microbiology Feb 1985:286-287.
- 49.-Popw-Kaupp T.,Kern G.,Binder C.,Tuma W.,Knnidi M.,Kunz C. Detection of Respiratory Syncytial Virus in Nasopharingeal Secretions by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Indirect Immunoflourescence, and Virus Isolation: A Comparative Study. Journal of Medical Virology. 19:123-134 (1986).
- 50.-Mizel S.B. The Interleukins. FASEB J 3:2379-2388;1989.