

00346



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

18

**PAPEL DE LAS PARTICULAS DEFECTUOSAS EN EL
ESTABLECIMIENTO DE LA PERSISTENCIA DEL VIRUS
SINCITIAL RESPIRATORIO EN LINEAS CELULARES
HUMANAS DE ORIGEN EPITELIAL**

295083

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)

QFB MIRZA GABRIELA ROMERO VALDOVINOS

DIRECTORA DE TESIS: DRA. BEATRIZ GÓMEZ GARCÍA

MEXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Papel de las partículas defectuosas en el establecimiento de
infecciones persistentes por el Virus Sincitial Respiratorio en
líneas celulares epiteliales humanas**

Maestra en ciencias

P r e s e n t a :

Mirza Gabriela Romero Valdovinos

Directora de tesis: Dra. Beatriz Gómez García

JURADO DESIGNADO:

Presidente:	Dra. Beatriz Gómez García
Primer Vocal	Dr. Abraham Landa Piedra
Segundo Vocal	Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano
Tercer Vocal	Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres
Secretario	Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales
Suplente	M en C. Rosa Elena Sarmiento Silva
Suplente	Dra. Blanca Hayde Ruiz Ordaz

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

**Laboratorio de Virología, Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina UNAM.**

SUSTENTANTE:

Mirza Gabriela Romero Valdovinos

ASESOR:

Dra Beatriz Gómez García.

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Beatriz Gómez por su acertada dirección del tema y por guiar mis primeros pasos en la investigación.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Rosa María del Ángel y el Dr. Rogelio Alonso por su ayuda durante el desarrollo del tema.

A los miembros del jurado por sus correcciones y ayuda en el trabajo escrito.

A las Maestras en Ciencias Rocío Tirado Mendoza y Rosa Elena Sarmiento Silva por la ayuda técnica y científica prestada durante la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca No 113161 para el desarrollo de esta tesis.

Dedicatorias:

A mi familia por estar siempre conmigo apoyándome.

A mis sobrinos Armando y Anie por ser la esperanza del mañana.

A Pablo por compartir este y muchos otros sueños.

A la familia Maravilla Campillo por su amistad y apoyo.

A Mis amigos del laboratorio: Rocío y Rosa Elena por su invaluable cariño y amistad,

A Enrique, Lino y Antonieta por su amistad.

A Jesús Núñez e Ignacio Palacios porque sin su apoyo este trabajo hubiera sido imposible.

A Mis amigas de toda la vida: Adriana Guadalupe, Catalina, Laura, Susana, Olivia, Ma. Eugenia y Martha.

A mis compañeros y amigos: Laura A., Gilberto V, y Ricardo G. por las desveladas

INDICE:

	Página
I Introducción	1
GENERALIDADES DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO .	1
ASPECTOS BIOQUÍMICOS	
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	4
EPIDEMIOLOGÍA	7
PERSISTENCIA VIRAL	8
PERSISTENCIA DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO EN DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTALES	10
PARTÍCULAS DEFECTUOSAS	12
MODELOS DE PERSISTENCIA VIRAL EN LOS QUE SE HA INVOLUCRADO A LAS PARTICULAS DEFECTUOSAS EN VIRUS DE RNA	15
II Planteamiento del problema	17
III Objetivos	18
IV Hipótesis	19
V Material y métodos	20
VI Resultados	29
PURIFICACIÓN DE VIRUS SILVESTRE	29
OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES CON PARTICULAS DEFECTUOSAS	30
CONFIRMACIÓN DE PERSISTENCIA EN LOS CULTIVOS RECUPERADOS POR:	
A) PRESENCIA DE ANTÍGENO VIRAL	34
B) EXPRESIÓN DEL GENOMA VIRAL POR RT-PCR	38
DETERMINACIÓN DE VIRUS EXTRACELULAR INFECTIVO EN LOS SOBRENADANTES DE LOS PASES DE LOS CULTIVOS PERSISTENTES	43
EFECTO DE LA LUZ U. V. SOBRE LA INTERFERENCIA CON LA INFECTIVIDAD	45
DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INFECTAR CÉLULAS VERO DE LOS SOBRENADANTES DE LOS CULTIVOS PERSISTENTES	47
ANÁLISIS POR GRADIENTE DE SACAROSA DE LOS SOBRENADANTES OBTENIDOS DE CULTIVOS PERSISTENTES.	47
ANÁLISIS DE SOBRENADANTES DEL CULTIVO H358 _{PER II}	51
VII Discusión	53
VIII Conclusiones	58
IX Material	59
X Bibliografía	62

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES DEL VIRUS SINCITIAL RESPIRATORIO

ASPECTOS BIOQUÍMICOS

La principal característica del virus sincitial respiratorio es su capacidad de fusionar células en cultivos celulares produciendo sincitio, células multinucleadas. El virus pertenece a la familia *Paramixoviridae*, y al género *Pneumovirus*. Este género presenta diferencias de los otros géneros de la familia en: a) el diámetro de la nucleocápside es de 12 a 15 nm en lugar de 18nm, b) su génoma codifica para un mayor número de proteínas, que otros paramixovirus (10 en comparación con seis o siete) c) el aspecto general de las inclusiones intracitoplasmáticas que produce en la infección presentan un aspecto diferente al de otros paramixovirus y d) finalmente carece de hemaglutinina y neuraminidasa (1).

Aunque también presenta semejanzas con otros miembros de esta familia como son: a) forma de la nucleocápside; b) la envoltura que consiste de una bicapa lipídica que proviene de la membrana de la célula huésped y que contiene proteínas virales transmembranales, y c) su mecanismo de maduración.

El RSV es un virus pleomórfico, mide 150 a 300 nm de diámetro pero partículas de mayor tamaño así como filamentos son comunes cuando se observa al microscopio electrónico.

Presenta una envoltura lipoproteica, su nucleocápside es helicoidal mide 13.5 nm de diámetro y su genoma está constituido por una sola cadena lineal de ARN con polaridad negativa, con valor de sedimentación de 50s y un peso molecular de aproximadamente de 5 000 K Daltones.

Su genoma ARN de sentido negativo de 15385 nt, posee regiones no codificantes una al inicio y otra al termino (regiones leader y trailer) y es traducido en 10 proteínas 8 estructurales y 2

no estructurales. De las proteínas estructurales (F, G, SH, N, P, L, M y M2) presentes en el virión de VSR, tres de ellas están expresadas también en la superficie de las células infectadas (F, G, y SH). Las proteínas no estructurales, designadas NS1 (1C) y NS2 (1B), se encuentran en células infectadas pero no en los viriones.

De las proteínas estructurales dos de ellas son de matriz, se conoce la función de la proteína matriz M (P.M: 28.7 KD) que estabiliza la envoltura viral y participa en el ensamblaje, está formada por 256 aminoácidos, es relativamente básica y puede interactuar con la membrana de la célula infectada.

La función y localización exactas de la segunda proteína de matriz (M2 P.M. 194 KD) no se conocen con precisión se sabe que mientras M es hidrofóbica M2 es muy básica e hidrofílica.

La glucoproteína (G P M 70 a 90 KD), se considera necesaria para la adsorción del virus a la célula huésped y se considera análoga a la hemaglutinina-neuraminidasa de otros paramixovirus.

La glucoproteína (F), de fusión, tiene un peso molecular de 60-68 KD. Está compuesta por dos polipéptidos unidos por puentes disulfuro. Esta glucoproteína es considerada como la responsable de la entrada del virus a la célula mediante la fusión de la envoltura viral con la membrana celular, y la diseminación directa del virus por fusión de membranas entre células infectadas y no infectadas produciendo sincicios en cultivo celular.

Las glicoproteínas F y G son las principales inductoras de anticuerpos a los que se les ha asignado actividad neutralizante *in vitro*. La actividad de estas proteínas es sensible a los detergentes y a la tripsina por lo que se deduce que están localizadas en la superficie del virión. (1, 2)

Las proteínas asociadas a la nucleocápside N, P y L participan en la transcripción y replicación del ARN viral, siendo la proteína L a la que se le asigna el papel de ARN polimerasa dependiente de ARN, mientras que a las proteínas N y P se les considera factores necesarios para la replicación (Chaperonas). (1, 3)

El mecanismo de replicación del VSR es similar al de otros paramixovirus (10), donde el ARN de sentido negativo es transcrito a un intermediario positivo (ARN antigenómico) que sirve como templado para la síntesis del ARN genómico de la progenie del virus; este intermediario requiere para su síntesis de las proteínas N, P y L, las cuales bloquean las señales de paro intergénicas (4).

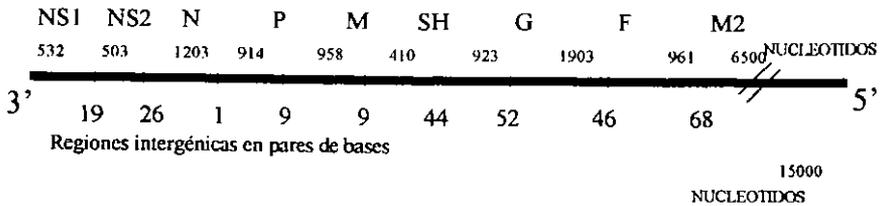
Durante la infección se sintetizan 10 ARNm poli adenilados en un rango de 405 a 6500 nucleotidos; cada uno de estos ARN mensajeros identificados por RNA northern blot y utilizando clonas de cDNA que hibridan con distintos ARNm de las células infectadas. (5).

El VSR al igual que otros paramixovirus contiene secuencias de inicio y término conservadas para la mayoría de los genes que los conforman, pero sus regiones intergénicas varían tanto en tamaño como en secuencia. Estas regiones intergénicas varían en longitud desde uno a 54 nucleótidos. (ver esquema 1)

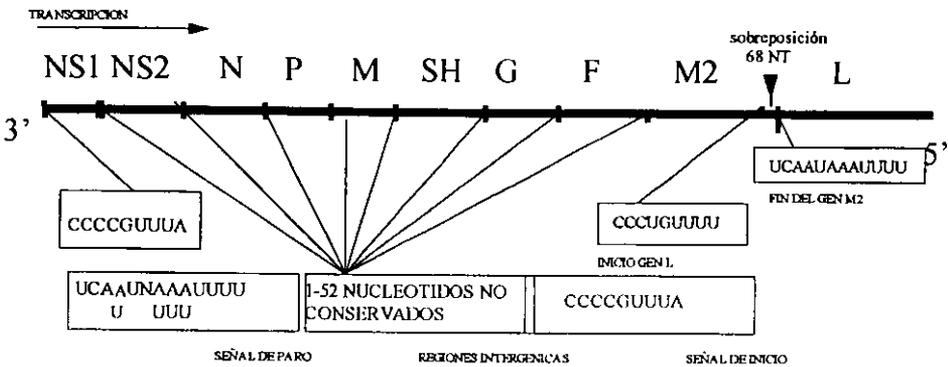
La secuencia genética del VSR en orden 3' a 5' es:

3' NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L 5' que es el mismo orden de transcripción. Como se ha comprobado con experimentos de inhibición de la transcripción con luz U.V.(10)

A) ESQUEMA GENETICO DEL VSR



B)



ESQUEMA 1: esquema de la organización genómica del VSR donde se muestra: A) el orden de los genes, su longitud en nucleótidos y las regiones intergénicas entre cada gen. B) señales de inicio y término de los genes (modificado de Kennet y McIntosh)(6).

CARACTERISTICAS CLÍNICAS

La primoinfección con VSR ocurre generalmente entre las seis semanas y los seis meses de edad, ésta causa comúnmente síntomas del tracto respiratorio superior como son flujo nasal, estornudo, faringitis y malestar general.

Si el cuadro es leve los síntomas no rebasan esta etapa. En los casos severos el VSR puede causar bronquitis y neumonía. (1)

El periodo de incubación es de 4 a 5 días. El virus se multiplica en la nasofaringe y el mecanismo de diseminación al tracto respiratorio inferior es por replicación en el epitelio principalmente por la transferencia del virus de célula a célula y por aspiración de secreciones. Los síntomas respiratorios correlacionan con la presencia y concentración de mediadores inflamatorios en las secreciones nasofaríngeas. En estudios histopatológicos post-mortem se ha encontrado necrosis del epitelio alveolar, infiltración mononuclear peribronquial y taponamiento del lumen bronquial por moco y epitelio desprendido.

El epitelio de las vías respiratorias juega un papel importante en la eliminación de partículas inhaladas, defensa antimicrobiana y mantenimiento de la integridad alveolar. Adicionalmente, las células epiteliales respiratorias están involucradas en la inducción y modulación de la respuesta inflamatoria a través de la síntesis de varios mediadores proinflamatorios así como de citocinas.

Los signos de enfermedad en vías respiratorias bajas se presentan del primer al tercer día después de la rinorrea, por lo que se sugiere que ha invadido bronquios y bronquiolos.

La edad de más alta incidencia de bronquitis, es también el tiempo durante el cual los anticuerpos maternos anti-VSR persisten en el infante, sugiriendo que estos anticuerpos pueden contribuir al proceso de la enfermedad. (6)

Actualmente no se ha podido dar una explicación satisfactoria de la patogenia, sin embargo, se han propuesto varias hipótesis.

a) El aumento de la infección mediado por anticuerpos AME (*Antibody mediated enhancement*) se debe a que los anticuerpos unidos a la partícula viral favorecen la entrada del virus a células con receptores para la fracción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas,

umentando de esta forma el número de células infectadas. (7, 8, 9) este fenómeno puede contribuir a la enfermedad mediante la interacción de los complejos inmunes virus-anticuerpo con la célula huésped que libera mediadores de inflamación o citocinas que contribuyen al proceso inflamatorio (10, 11, 12).

Este mecanismo podría explicar el hecho de que los niños que presentan títulos de anticuerpos maternos por debajo del título neutralizante, presentan un cuadro clínico más grave. Este fenómeno, también se observó en aquellos niños que fueron vacunados con una vacuna inactivada.

b) Se sugiere que anticuerpos IgE específicos presentes en pacientes con bronquiolitis causada por VSR podrían estar provocando la patogenia de la enfermedad a través de reacciones de hipersensibilidad.

c) Los complejos inmunes VSR con anticuerpos específicos, estimulan a los neutrófilos, macrófagos y basófilos a producir tromboxanos, causantes de la contracción del músculo liso de vías respiratorias. (13)

d) También se ha encontrado que la concentración de leucotrieno C₄ (LTC₄) en secreciones respiratorias está asociado a bronquiolitis con VSR (18). Los leucotrienos son productos metabólicos del ácido araquidónico y son potentes mediadores de respuestas alérgicas e inflamatorias y pueden causar constricción de las pequeñas vías aéreas del pulmón produciendo cuadros asmáticos y asfixia. Complejos inmunes insolubles de IgE y agregados de IgG han mostrado estimular la producción de LTC₄ en macrófagos, eosinófilos y basófilos (14).

Estos factores podrían explicar la severidad de las infecciones por VSR, en las bronquiolitis y neumonías en infantes, donde las vías aéreas del pulmón se encuentran aún en estado de desarrollo lo que les confiere vulnerabilidad. (13, 14)

EPIDEMIOLOGÍA

El virus sincitial respiratorio (VSR) esta considerado mundialmente como uno de los principales agentes causales de infecciones severas del tracto respiratorio inferior en niños y personas mayores de 60 años. En países tropicales las epidemias anuales debidas a este virus se presentan durante la época de lluvias, mientras que en países templados los picos de incidencia se encuentran durante el invierno y desaparecen durante el verano. (15)

Tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo el VSR es el agente etiológico del mayor número de casos de bronquitis y neumonías severas que requieren hospitalización en niños de cero a doce meses de edad y de las infecciones nosocomiales de las vías respiratorias en pabellones infantiles (16)

En países desarrollados aproximadamente la mitad de los niños se infectan en su primer estación invernal y 90% de ellos han sido infectados a los dos años. La mortalidad en niños sanos es aproximadamente del 1% pero se incrementa hasta el 3% en aquellos niños con situaciones agravantes como: cardiopatías, enfermedades pulmonares congénitas, prematurez o inmunosupreción (17, 18).

En Países en vías de desarrollo (Argentina, Colombia, Guatemala, Kenya Nigeria, Pakistan, Papua Nueva Guinea, Filipinas, Tailandia y Uruguay) la causa más frecuente de infecciones del tracto

respiratorio bajo es el VSR, al que se le atribuyen más del 70% de los casos en niños menores de 5 años. La mortalidad en estos países alcanza el 7% en este grupo etario (18).

En México las enfermedades infecciosas de las vías respiratorias inferiores ocupan entre el primer y el tercer lugar de muerte infantil a nivel nacional. En el año de 1998 la tasa de mortalidad correspondió a 435 por cada 100 000 niños nacidos vivos en menores de un año. Estos reportes no especifican el agente causal sin embargo es posible que el VSR este involucrado ya que la mortalidad por neumonía y bronquitis aumenta en los meses de septiembre a marzo que es el periodo donde se reportan en el hemisferio norte las epidemias ocasionadas por este virus (19).

PERSISTENCIA VIRAL

Gran parte del conocimiento que se tiene de las infecciones virales proviene de observaciones de infecciones agudas, en las cuales el sistema inmune controla la infección y posiblemente el agente infeccioso es eliminado, los síntomas y signos desaparecen. Desde un punto de vista médico son un problema controlable y pueden evitarse, puesto que se dispone de vacunas efectivas para varias de ellas. Sin embargo, los virus también ocasionan otro tipo de infecciones, las persistentes, en las que la desaparición de los síntomas no va acompañada de la eliminación del agente infeccioso sino que al contrario, el virus permanece en el organismo a pesar de que la respuesta inmune es generalmente permanente, a nivel médico son un problema serio, no se dispone de vacunas ni antídotos efectivos (20,21).

En contraste con la infección lítica en la infección persistente el virus no debe destruir a la célula que infecta ni por la infección en sí, ni por la respuesta inmune celular donde linfocitos T citotóxicos sensibilizados al antígeno viral destruyen la célula infectada.

Para que se establezca una infección persistente en un organismo es necesario que el virus no destruya la célula que infecta y que evada la vigilancia del sistema inmune.

Las estrategias que utiliza el virus para permanecer en la célula son: A) la regulación de la expresión de sus genes. B) Generar virus incompletos o defectuosos y C) Disminuir su efecto citopático o invadir células inmunocompetentes (22).

Los mecanismos estudiados para que el virus pueda permanecer en la célula incluyen por lo menos uno de los siguientes: a) infección de células no permisivas o células en un ambiente no permisivo, b) evolución de variantes virales que sean menos citolíticas o interfieran con la replicación del virus silvestre o c) que las proteínas virales funciones como factores regulatorios disminuyendo la expresión de ciertos genes celulares como aquellos que codifican para linfocinas, interferón, factor de necrosis tumoral, hormonas factor de crecimiento etc.(21,23) Este mecanismo se ha observado en virus de DNA como las proteínas E3K19 y E1a de adenovirus que eliminan la expresión en la superficie celular de moléculas MHC clase I y clase II, y la Proteína BCRF1 del citomegalovirus que es homologa a IL-10 y compite con está por su receptor (24, 25,).

Otro aspecto relevante es que el virus puede ser muy lítico para determinada estirpe celular pero no para otras, esto es muy importante en las infecciones *in vivo*, ya que diferentes tipos celulares están presentes en todo el organismo. Un ejemplo claro es el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) que es muy lítico para los linfocitos T pero no para los macrófagos y monocitos en los que puede permanecer tiempo prolongado sin producir muerte celular (26, 27, 28).

Hay evidencia creciente que los virus que causan infecciones persistentes son importantes patógenos humanos, pues causan una variedad de enfermedades crónicas que afectan los sistemas nervioso y endocrino. Por otro lado, el reservorio más común de los virus persistentes son las células del sistema inmune, especialmente los linfocitos y las células mononucleares, (monocitos y macrófagos) ya que esto lleva a la incapacidad del sistema inmune para reconocer y eliminar al virus (27, 28).

La totalidad de los mecanismos para el establecimiento de la persistencia se desconocen, sin embargo, existen evidencias de que no solo son factores virales los determinantes en el establecimiento de la persistencia, sino que se trata de una co-evolución virus célula. En el modelo del FMVD (Foot and Mouth Disease Virus) y las células BHK-21, en las que se establece la persistencia, se observan cambios fenotípicos tanto en la célula como en el virus (29)

PERSISTENCIA DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO EN DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTALES

Además de la morbilidad de la infección aguda del VSR, la infección viral también induce consecuencias crónicas, ya que la infección por VSR predispone al desarrollo de la enfermedad respiratoria hipereactiva y a episodios de resfriado recurrentes. Aunque no se ha demostrado que el RSV pueda producir infecciones persistentes, se tienen evidencias circunstanciales que lo sugieren, como lo son: la presencia del VSR en enfermos con bronquitis crónica (30) y presencia de antígenos virales en la enfermedad de Peaget una enfermedad osea crónica (31).

El VSR es capaz de producir infecciones persistentes *in vitro* en diferentes líneas celulares. Los resultados obtenidos se pueden resumir de la siguiente manera: a) en líneas celulares no linfoides, en la infección persistente obtenida en células HEp-2 a una multiplicidad de infección

(MOI) de 1 se observó un incremento del virus asociado a la membrana celular y una disminución en la producción de virus extracelular, con respecto a una infección aguda (32). También se ha reportado el establecimiento de una infección persistente en células BS-C1 (riñón de mono verde *Cercopithecus aethiops*) utilizando mutantes termosensibles, los resultados de ensayos de centros de infección en estos cultivos demostró que el título de virus extracelular fue bajo, comparado con una infección aguda y se detectaron mutantes que podujeron placas de lisis diferente a la producida por el virus original (33). En células derivadas de embriones de ratones Balb/C infectadas no se observa efecto citopático pero si se presentan focos de infección cuando se cocultivan con células HEp-2, después de 4 pases se observan grupos de células binucleadas. La inmunofluorescencia indirecta de estas células con anticuerpos monoclonales con un título neutralizante alto y dirigidos contra las proteínas de superficie (F y G), muestran un patrón en pequeños gránulos, citoplásmico, moteado y difuso; los anticuerpos dirigidos contra las ribonucleoproteínas (L, P y N) que no neutralizan el virus muestran fluorescencia en la superficie de la célula, en cambio en células HeLa infectadas de manera aguda con sobrenadantes de estos cultivos y teñidas con los mismos anticuerpos se observan cuerpos de inclusión con ambos tipos de anticucrpos (34).

En células linfoides:

En linfocitos B de origen humano, se ha reportado el establecimiento de infecciones persistentes con VSR en las que se producen bajos niveles de virus extracelular y susceptibilidad a linfocitos T citotóxicas específicas para VSR (35).

Macrófagos alveolares humanos, obtenidos de voluntarios adultos sanos, infectados *in vitro* con VSR, se ha demostrado que son permisivos a la infección, soportan la replicación viral

por periodos prolongados, más de 25 días. Aunque no se habla de persistencia, la capacidad de mantener la replicación viral por mas de dos semanas se propone que puede deberse la producción de partículas virales no infecciosas, producción de mutantes termo-sensibles, factores celulares de resistencia viral, y producción de proteínas antivirales como el interferón, que también reduce la producción viral (36).

Un modelo animal *in vivo* para la infección del VSR es el del cobayo en el cual se detecta la presencia de antígeno y RNA viral después de 60 días de inoculación en macrófagos alveolares, tiempo mucho mayor al cual los síntomas respiratorios han desaparecido (37).

PARTÍCULAS DEFECTUOSAS

Las partículas defectuosas (DI's) son mutantes que se producen durante pases seriados a altas multiplicidades de infección, son incapaces de multiplicarse sin la coinfección con el virus completo, pero durante la coinfección se enriquecen las partículas e inhiben la multiplicación del virus parental.

El fenómeno de interferencia varía de un modelo a otro y puede ser por: incompetencia a nivel de adsorción o penetración, o por síntesis limitada de algunos productos virales (proteínas estructurales). Cuando las mutantes son por delección, éstas pueden variar grandemente llegando a encontrar mutantes donde solo han cambiado 7 nucleotidos al extremo 3' del genoma viral (38) hasta aquellas en las que solo se conserva el 5% del genoma original. Sin embargo aún las partículas defectuosas (DI) más pequeñas deben retener las secuencias necesarias para su replicación y encapsidación, de ahí que estas partículas son un exelente modelo para estudiar los pasos involucrados en la multiplicación viral. (39) Las DI se han reportado virtualmente en todas las familias de virus animales y se piensa que ocurren universalmente.

Aunque se han asociado principalmente con los virus de RNA ya que estos tienen una gran variabilidad (10^{-3} - 10^{-5} bases errores por cada base incorporada) y sufren recombinaciones homologas o no homologas que permiten la generación de secuencias nuevas. La mayoría de las mutaciones pueden ser eliminadas por selección natural pero muchas tienen valor selectivo en particular por el ambiente en el cual el virus se replica (40).

Las DI y el virus del que provienen, tienen los mismos constituyentes proteicos, pero sus genomas son más pequeños (41).

Estudios de microscopía electrónica de los RNA genómicos del VSV y de sus DI han ayudado a sugerir algunos mecanismos a través de los cuales se generan los RNA defectivos en los virus de RNA de una sola cadena.

Los RNA's se circularizan por medio de puentes de hidrógeno entre secuencias cortas complementarias en los extremos, estas uniones dan como resultado estructuras en forma de asa (esquemas 2 A y 2B). La pérdida en la secuencia se produce cuando la polimerasa libera al RNA molde y se une en un punto diferente o se une a la cadena naciente. De esta manera la polimerasa inicia nuevamente la síntesis en un punto erróneo y genera una copia incorrecta del genoma; muchas de las partículas defectuosas del virus de estomatitis vesicular (VSV) se generan de esta manera y carecen del extremo 3'. Otras partículas defectuosas se generan por un mecanismo llamado círculo rodante (*roll-over*) en donde podemos encontrar partes del genoma viral por duplicado durante eventos subsecuentes en la replicación, esto se debe a que la polimerasa se regresa sobre la misma hebra y copia varias veces el mismo segmento formando estructuras complejas. Estos mecanismos se ilustran en los esquemas: (2 B y 3c)

Otros tipos de partículas son las que se generan por deleciones e inserciones.

ESQUEMA 3:

Estándar



a) 5',3'DI



b) 5' DI



c) DI compleja



La comparación de genomas del virus estándar y de DI's. Los símbolos abiertos representan las secuencias comunes y los sólidos sus complementarias a) virus con deleciones en ambos extremos, b) partícula en la que el extremo 5' se ha sustituido por la copia complementaria al 3', c) partícula en la cual se han insertado varias secuencias idénticas. (39)

MODELOS DE PERSISTENCIA VIRAL EN LOS QUE SE HA INVOLUCRADO A LAS PARTÍCULAS DEFECTUOSAS EN VIRUS DE RNA

En diferentes modelos de persistencia tanto *in vitro* como *in vivo* se han detectado partículas defectuosas.

La mayoría de las DI's interfieren con la infectividad del virus original. Los títulos de virus infeccioso son menores de los que se encuentran en la infección aguda y no presentan efecto citopático en las células infectadas persistentemente (41).

Aún no está claro si en todos los sistemas virales las DI's se requieren para establecer la infección persistente o si aparecen como un producto secundario durante la misma, en el modelo del virus de parainfluenza en la línea celular CV-1 (Riñon de mono verde), las partículas

defectuosas se presentan hasta después del pase nueve (42), mientras otros modelos han requerido para establecerse mezclas de virus silvestre con DI's (Virus Sendai) (43).

Los cambios encontrados en los virus son casi tan variables como los modelos existentes, muchas DI contienen una copia del extremo 3' en el extremo 5' y se les conoce como copy back este caso se ha descrito para el virus sendai (44), Sarampion (45), Virus simiano tipo 5 (46), y VSV (38).

Las deleciones también son frecuentes y muy variables. En el virus de Sendai: se han encontrado DI con deleciones en el extremo 3' en las que se genera un señal de paro antes de que termine la transcripción (47, 48). En un cultivo persistente de 146 pases con el virus de Parainfluenza (49) se encontraron 3 clonas que tenían sustituciones en la posición 43 transición U → C del extremo 3' del gen de la nucleoproteína NP. Este cambio produjo una conversión en el codón de iniciación en el mRNA de NP de AUG → GUG. En las mutaciones en el extremo 3' es probable que se afecte tanto la transcripción como la replicación y por lo tanto haya una disminución en la actividad citolítica y en la liberación del virus infeccioso (50; 51). En el VSV se describieron partículas que tienen la mitad del extremo 3' y una pequeña porción del extremo 5', estas partículas contienen la deleción de 320 nucleótidos del gene L (RNA polimerasa). El RNA de las DI, puede variar entre 0.1-0.5 % de RNA del virus estándar. El virus de Semiliki Forest se encontró un tipo de DI 18S, la cual tiene una mutación en el extremo 5', esta partícula debe tener las secuencias específicas requeridas para la unión de la polimerasa y para la encapsidación, además en su extremo 3' existen 106 nucleótidos conservados (adyacentes al poliA), mientras que la región genómica que codifica para las proteínas estructurales fue eliminada. (39)

Planteamiento del problema:

Se propone el desarrollo de un modelo *in vitro* con las líneas celulares HEp-2 y H358 que son permisivas a la infección de RSV, utilizando partículas defectuosas y ver si estas son necesarias para el establecimiento de la infección persistente.

Objetivos:

OBJETIVO GENERAL:

Determinar la participación de las partículas defectuosas del virus sincitial respiratorio (VSR) en el establecimiento de cultivos persistentes en líneas celulares epiteliales de origen humanas.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Obtener suspensiones virales libres de partículas defectuosas y enriquecidas con partículas defectuosas.
- Establecer cultivos persistentes con ambas suspensiones.
- Comprobar que los cultivos están persistentemente infectados
- Buscar en los sobrenadantes de los cultivos persistentes la presencia de partículas defectuosas.

Hipótesis:

Es posible establecer infecciones persistentes en líneas celulares epiteliales humanas de pulmón y laringe utilizando suspensiones con partículas defectuosas del virus sincitial.

MÉTODOS:

PROPAGACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES:

Las células HEP2 Carcinoma epidemoide de laringe humana ATCC (*American Type Culture Collection*), VERO (Fibroblastos de riñon de Mono Verde del laboratorio de Virología , Facultad de medicina UNAM donadas por el doctor Trudel del Instituto Armand Frappie Montreal Canada se mantuvieron con D-MEM Gibco BRL). Las Células H358 (Células epiteliales de pulmón humano) proporcionadas por el Dr. Patricio Garilio del Centro de Estudios Avanzados del IPN en medio RPMI 1640 GIBCO BRL complementados con suero fetal bovino al 10% inactivado a 56°C por 30 minutos y 100 UI /ml de penicilina G sódica, 100mg de estreptomocina y 1% de glutamina. Los cultivos se incubaron a 35°C en atmósfera húmeda y al 5% de CO₂. Se subcultivaron aproximadamente 2 veces por semana.

TITULACIÓN DEL VIRUS

El virus Sincitial Respiratorio cepa Long (ATCC-26 (*American Type Culture Collection Rockville MD, USA*) donada por el Doctor Trudel del enstituto Armand Frappie, se propagó en botellas de 25 cm² con células HEP-2 infectadas. Las botellas se incubaron hasta que el efecto citopático fue evidente y/o el 80% de las células estaban desprendidas, entonces se realizó la cosecha viral, la suspensión se sonicó durante 10 m y se añadió sulfato de magnesio a una concentración final de 100mM, para estabilizar el virus. Posteriormente se centrifugó a 110 g en una centrifuga SORBALL modelo RT6000D, el sobrenadante se tituló por dosis infectiva 50 (TCID₅₀) El virus se dividió en alícuotas y se almacenó a -72° C.

A) DOSIS INFECTIVA 50 (TCID₅₀)

Para determinar el título por TCID₅₀ se sembraron células VERO en una placa de 96 pozos 1X10⁵ células por pozo, se incubaron a 35°C y atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Una vez que se alcanzó la confluencia las células se infectaron con las diluciones seriadas de la suspensión del virus (1:3), D-MEM al 1% de suero fetal bovino. Utilizándose cuatro pozos por dilución. A cada pozo se le añadieron 50µl de la suspensión viral o las diluciones, se incubó por dos horas, se retiró el sobrenadante y se adicionó 100µl de medio para infectar.

El título se calculó por el método de Kärber:

$$TCID_{50} = -\Delta - \delta(S-1/2)$$

Donde:

Δ : es el log 10 de la última dilución donde el 100% de los pozos presentaron efecto citopático

δ : es el log10 del factor de dilución

S: es la suma de los pozos que presentaron efecto citopático por dilución incluyendo aquella donde el porcentaje es 100%, dando a ésta última el valor de uno y las otras la fracción correspondiente ($1/4=0.25$) (52).

Ejemplo del calculo:

1/3 1/9 1/27 1/81 1/243

●	●	●	●	●	○				
●	●	●	●	○	○				
●	●	●	●	●	○				
●	●	●	●	○	○				

○ Pozo sin efecto citopático

● Pozo con efecto citopático

$\Delta = 1.90$ última dilución (1/81) con el 100% 4 pozos mostraron efecto citopático

$d = \log_{10} 3 = 0.477$ (la dilución fue 1:3)

$S = 1.5$

Sustituyendo:

$$TCID_{50} = 1.90 * [(0.477)(1.5 - 0.5)]$$

$$= 0.9063$$

$$= 10^{0.9063} / 50 \mu l$$

$$= 10^8 \text{ TCID}_{50} / \text{ml}$$

$$1 \text{ unidad infecciosa} = \log 0.5 = 0.7$$

$$= 112.83 \text{ Unidades infecciosas por ml}$$

B) TITULACIÓN POR PLACA:

En una placa de 24 pozos se sembraron 2×10^5 células por pozo, una vez confluentes se infectaron con 500 μ l con diluciones seriadas (1:4) de la suspensión viral a titular en medio para infectar. Se utilizaron dos pozos por dilución, se dejaron absorber los virus por 2h, se eliminó el sobrenadante, se lavaron las células con PBS y se cubrieron con agar-agar purificado y exento de inhibidores al 0.4% en D-MEM complementado con 2.0% de suero fetal, 100 UI/ml de penicilina G sódica, 100mg/ml de estreptomina y glutamina, a concentración final de 2mM. Las placas se observaron todos los días hasta que el efecto citopático fue evidente, generalmente entre 2 y 4 días después de la infección las células se tiñieron con cristal violeta al 1% en metanol y se contaron las placas.

OBTENCIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE VIRUS LIBRE DE PARTÍCULAS DEFECTUOSAS (VIRUS ESTÁNDAR)

Las suspensiones virales libres de partículas defectuosas se obtuvieron purificando el virus por placa. Para este ensayo se infectaron células HEp-2 en una placa de 6 pozos con 1×10^5 células por pozo con diluciones seriadas del virus, se dejó adsorber el virus por 2 horas, se eliminó el sobrenadante, y las células infectadas se lavaron tres veces con PBS cubriéndolas posteriormente con agar-agar MERCK al 0.2 % en MEM complementado con 2% de suero fetal. Las placas se incubaron durante los siguientes 3 días revisándolas a diario hasta que los sincitios fueron visibles, se marcaron y se tomaron con una micropipeta. Las placas obtenidas se resuspendieron en medio al 2% de suero fetal y propagaron en células HEp-2 primero en una botella de 25 cm² una vez que se detectó efecto citopático se recuperó el sobrenadante y se tituló (Los títulos obtenidos tuvieron un rango aproximado de 1×10^5 y 10^6 TCID₅₀/ml). Esta semilla se utilizó para propagar el virus, se infectaron 5 botellas de 75 cm² a multiplicidad de 0.001 y se recolectó el sobrenadante cuando el efecto citopático fue claro, para confirmar la ausencia de DI's se realizó un gradiente de sacarosa de la suspensión viral. Agregándose polietilén glicol 8000 para obtener una concentración final de 8% se dejó precipitar toda la noche a 4° C, se concentró por centrifugación a 19500 rpm (28, 222 g) en un rotor de ángulo fijo Beckman 45 TI, se resuspendió en 7 ml de amortiguador TEN (Tris 50 mM, EDTA 10 mM y NaCl 0.1 M), se reprecipitó siguiendo el mismo protocolo. Finalmente se resuspendió en el menor volumen posible (1-2 ml) del

mismo amortiguador se sometió a un gradiente de sacarosa (10-60%) obtenido por centrifugación en un rotor de columpio Bekman SW 40Ti a 22000 rpm (61.092 g) durante 2 h. Se observa solo una banda de densidad de 1.18g /ml que corresponde a la densidad reportada para el VSR (53) la cual se colectó y se tituló (1.8×10^8 TCID₅₀/ml.)

DETERMINACIÓN DE DI POR INTERFERENCIA CON LA INFECTIVIDAD DEL VIRUS SILVESTRE.

La técnica utilizada fue la descrita por Threuhaf W:M con algunas modificaciones. (54) Brevemente monocapas de células VERO confluentes en placa de 96 pozos (1X10⁵ células por pozo), se infectaron con 100µl de cada una de las diluciones del virus a titular usando 4 pozos por dilución, se incubaron por 2 h a 37° C en ambiente húmedo con 5% de CO₂. Posteriormente se retiró el medio, se lavaron con PBS y se infectaron con virus silvestre (sin partículas defectuosas a una MOI de 0.3, se incubó por 2h, se retiró el medio y se incubaron por 72h. A continuación se retiró el sobrenadante y se adicionó solución salina balanceada de EARLE, complementada con rojo neutro al 0.033%, se incubaron durante 2h siendo las células que sobreviven a la infección las que se tiñen con este colorante. Posteriormente se lavaron con PBS para eliminar el colorante que no fue absorbido y se lizaron las células con etanol al 50% en solución de fosfato monobásico de sodio 0.1M. Una vez liberado el colorante se determina la absorbancia a 540nm.

OBTENCIÓN DE SUEROS ANTI RSV

Para esto se utilizaron 2 conejos Nueva Zelanda, machos de 2 kg. Antes de inmunizarlos se obtuvo suero de los conejos por punción en la vena marginal de la oreja El antígeno utilizado fue la suspensión purificada por gradiente de sacarosa.

La inmunización se realizó de acuerdo al siguiente esquema, se inocularon 400 mg de proteína con adyuvante completo de Freund se ajustó el volumen a 400 µl, y se aplicó por vía subcutánea en cuatro diferentes puntos de la región dorsal del conejo.

Una semana después se inoculó con la misma cantidad de antígeno con adyuvante incompleto de Freund, por vía intramuscular en dos sitios de inoculación diferentes (ambas piernas del conejo), se realizaron tres inoculaciones más, con intervalos de una semana cada una. Una semana después de la última inoculación se realizó una sangría de prueba, y se

titularon los anticuerpos neutralizantes de la infectividad viral. Una vez que se obtuvo un título aceptable (1×10^5 unidades neutralizantes / ml) se procedió a sangrar a blanco el conejo (55).

Titulación de anticuerpos.

Se realizaron diluciones seriadas 1:3 de la suspensión de virus estándar con un título de 1.8×10^8 se mezclaron con 50 μ l de suero y se incubó durante 1 hora y posteriormente se infectaron monocapas de células VERO en placas de 96 pozos con 2 pozos por dilución con 100 μ l de la mezcla virus suero. Considerando el título como el inverso de la última dilución en la que no se presenta efecto citopático.

INMUNO FLUORESCENCIA INDIRECTA

La inmunofluorescencia indirecta se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por García Barreno y col. (56). En un portaobjeto de poliestireno con 8 pozos se añadió por pozo polilisina a una concentración de 10mg/ml 100 μ l/pozo, para favorecer la adhesión de las células, se incubó 20 min a temperatura ambiente se retiró la polilisina, y se lavó con PBS estéril. Se añadieron 1×10^5 células se incubó a 37° C por una hora se infectaron las células y se incubó 24 h más. Las células se fijaron con metanol frío durante 5 min y posteriormente en acetona 30 s. La preparación se dejó secar al aire, se bloqueó con 100 μ l de suero de burro concentrado toda la noche a 4° C, se lavó 2 veces con amortiguador de lavado (PBS albumina sérica bovina al 0.25% y tween al 0.3%), se adicionó el suero anti- RSV obtenido en conejo diluido en PBS albumina al 0.5% y se incubó durante 1h a 37° C. Se lavó 3 veces con el amortiguador de lavado y se agrega el conjugado anticuerpo comercial IgG anti-conejo fluoresceinado obtenido en burro AMERSHAM a una dilución 1: 500. Se incubó una hora y se lavó con agua. Se observó al microscopio.

ENSAYO DE FACS

El ensayo se realizó en tubos eppendorf sensibilizados con 1 ml de amortiguador de lavado estéril (PBS al 0.1% de ASB albumina sérica bovina filtrado por membrana de 0.22 μ) a 37° C por 30 minutos.

Se retiró el sobrenadante y se adicionaron un millón de células con el suero anti-RSV obtenido en conejo a una dilución de 1:6 en 0.5 ml de medio de cultivo, se incubó 2 horas a 4° C con agitación constante. Se lavaron 2 veces y se fijaron con solución de paraformaldehído al 0.5% en PBS 0.1% de ASB pH 7.5 (que se preparó justo antes de usarla) se incubaron durante 30 minutos, se lavaron e incubaron con un mililitro de anticuerpo anti-conejo fluoresceinado (1:500 en amortiguador de lavado), Incubar a 4° C por 2 h con agitación constante se lavaron 2 veces más y se analizaron en un citómetro de flujo Beckton Dickinson DU640.

Se utilizaron varios controles: Células infectadas con anticuerpo no específico (suero de conejo no inmunizado) como control de isotipo, células infectadas de manera aguda 48 h post infección a MOI de 1 como control positivo, y células sin ningún tratamiento para determinar la fluorescencia basal de la célula.

DETERMINACIÓN DE FOCOS DE INFECCIÓN (INMUNOPEROXIDASA):

Monocapas semiconfluentes de células VERO en placa de 96 pozos se infectaron con sobrenadantes en los que se deseaba investigar la infectividad, se dejó absorber los viriones por 2 h a 37°C, se reemplazó el medio por medio fresco y se incubaron por 48 h. Posteriormente se fijaron las células con formaldehído al 3% en PBS. Se bloqueó con ASB al 1% en PBS y se incubó toda la noche a 4°C, posteriormente se lavaron las células 2 veces con el amortiguador de lavado, se agregó el anticuerpo policlonal anti RSV obtenido en

conejo y se incubo a 37°C por 1h, se lavo la placa 3 veces y se adiciono el conjugado peroxidado, después de una hora de incubación se lavó la placa 3 veces y se adiciono el sustrato: 3,3-diaminobenzidina en tris HCl pH 7.6. con 3λde H₂O₂ la reacción se determinó por microscopía óptica y se detuvo la reacción después de 20 min con ácido sulfúrico 1M

EXTRACCIÓN DE ARN CELULAR TOTAL de acuerdo al método de Chomczynski y Sacchi con modificaciones (57).

- 1.-SE utilizaron 4X10⁶ células por ensayo.
- 2.- Se les agregaron 250 μl de solución D (4M Isotiocianato de Guanidinio, 0.5% N-laurilsarcosil sódico, 2 mM Citrato de sodio pH 7.0. Se adiciona 1 mM de 2-mercaptoetanol en el momento de su uso).
- 3.- Se agregaron 500 μl de fenol saturado en agua, 50 μl de acetato de sodio 2 M (pH 4) y 100 μl de cloroformo-alcohol isoamilico 25:1. Se agitó durante diez segundos, posteriormente se centrifugó entre 10 y 15 minutos en centrífuga Eppendorf 15 000 rpm a temperatura ambiente.
- 4.-Se obtuvo el sobrenadante y se adicionó 1 μl de glucógeno (10 μg) y 500 μl de isopropanol frío. Se enfría durante 1 hr. a -20 °C
- 4.-Se centrifugó a 15 000 rpm durante diez minutos en centrífuga Eppendorf.
- 5.-Se lavó la pastilla con 200 μl de etanol al 75% y se disgregó el precipitado con ayuda de la micropipeta.
- 6.-Se centrifugó 10 minutos en Eppendorf a 15 000 rpm.
- 7.- Se obtuvo el precipitado y se secó al vacío.
- 8.-La pastilla se resuspendió en 20μl de agua tratada con dietil pirocarbonato (Se adicionó DEPC al 0.01% y se incubó por una noche a 37 grados y posteriormente se esterilizó por

calor húmedo para eliminar las posibles ARNsas). El RNA se utilizó para los ensayos de RT-PCR.

SÍNTESIS DE ADNc.

En un tubo Eppendorf de 0.65 ml se colocaron: 4 µl del amortiguador de reacción (50mM Tris HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 10 mM de DTT, 2mM de cada fosfato de desoxirribonucleótido, 20pM de oligo dT a 3mg de RNA a transcribir, 20 U de inhibidor de RNAsas (Lakeside) y 200U de la transcriptasa reversa (Superscript GIBCO). El volumen de reacción se completó a 20 µl y se incubó a 42 ° por una hora.

PCR DEL GEN N DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO:

Los cebadores utilizados fueron 5'ggAACAAGTTgAggTTTATgAATATGC 3' y 5'CTTCTgCTgTCAAgtCTAgTACACTgTAGT 3' descritos por Collins. (58)

A los tubos de reacción anterior se le agregó el amortiguador de amplificación (50mM de KCl, 10mM de Tris HCl, 1.5 Mg Cl₂= 60pM de los iniciadores N1 y N2 , 2.5 U de Taq ADN polimerasa (Biotecnologías Universitarias) y se agregó agua tratada con dietil pirocarbonato para un volumen final de 100 µl , se calentó a 99°C por un minuto para eliminar la transcriptasa remanente que puede actuar como inhibidor de la polimerasa. La amplificación se llevó a cabo en 30 ciclos una temperatura de desnaturalización del ADN de 94°C por un minuto, una temperatura de hibridación de iniciadores del 65 °C por un minuto y una temperatura de extensión de 72°C por 2 minutos, se dejó un periodo de extensión de 7 min a 72°C, y posteriormente se mantuvieron a 4 °C.

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

SEPARACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES OBTENIDAS DE CULTIVOS PERSISTENTES POR GRADIENTES DE SACAROSA.

Se colectaron sobrenadantes de los pases de las células infectadas persistentemente hasta obtener volumen de 100 a 200 ml de cada línea, se precipitaron y se sometieron a gradiente de sacarosa como se describió en la purificación del virus.

Determinación de la densidad de las partículas virales obtenidas de los cultivos persistentes.

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD DE LAS PARTÍCULAS VIRALES OBTENIDAS DE LOS CULTIVOS PERSISTENTES

Se colectaron sobrenadantes de los pases de las células infectadas persistentemente hasta obtener volúmenes de 100 a 200 ml de cada cultivo persistente (HEP-2 y H358), se precipitaron y se sometieron a gradiente de sacarosa como se describió en la purificación del virus silvestre. La densidad de cada una de las fracciones se determinó por refractometría en un reflectómetro Carl Zeiss modelo 120371.

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE IRRADIACIÓN CON LUZ U.V. PARA ELIMINAR LA INFECTIVIDAD VIRAL.

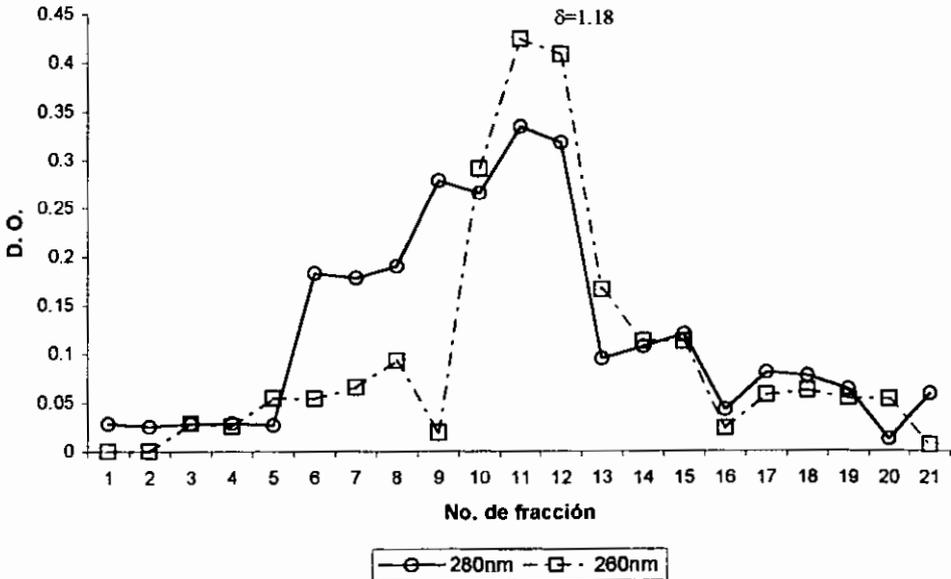
Se irradiaron las suspensiones del virus silvestre con una lámpara de luz U.V. de 15 Watts GE GI578 a 15 cm de distancia 5, 10, 14 y 30 segundos con agitación una vez irradiadas estas suspensiones se utilizaron para infectar células VERO en placas de 96 pozos por suspensión, a partir de los 15 s de irradiación no se detectó efecto citopático

RESULTADOS:

PURIFICACIÓN DE VIRUS SILVESTRE

La suspensión viral libre de partículas defectuosas se obtuvo purificando el virus por placa y por gradiente de sacarosa como se describió en material y métodos.

En la gráfica 1 se muestran los resultados del gradiente de sacarosa de la suspensión viral libre de DI's en donde a cada fracción se le determinó la concentración de proteínas y ácidos nucleicos por densidad óptica a 260 y 280 nm respectivamente.



GRÁFICA No 1 Se muestra la densidad óptica de cada una de las fracciones obtenidas del gradiente de sacarosa del virus silvestre.

En el gradiente de sacarosa, solo se observó un pico de proteínas el cual coincide con un pico de ácido nucleico, por tanto decidimos colectar las fracciones 11 y 12. La densidad de ambas fracciones fue de 1.18 g/ml que coincide con la reportada en la literatura para el VSR (53)

OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES VIRALES CON PARTÍCULAS DEFECTUOSAS.

Para la obtención de suspensiones virales enriquecidas con DI se propagó tres veces el virus purificado usando multiplicidades de infección (MOI) de 5 y 10.

La presencia de partículas defectuosas (DI's) se evaluó por la capacidad de cada uno de los pases para interferir con la infectividad viral, y de manera paralela se determinó el título viral de cada pase (tabla No 1)

TABLA 1: Obtención de suspensiones virales enriquecidas con partículas defectuosas.

Cultivo	D.O.	Media de D.O. A 540nm ¹	Desviación estándar	% de sobrevida ⁴	% de muerte	% de interferencia
Células no infectadas Control (-) ²	0.166 0.178 0.188 0.187	0.1798	0.024	100		ND
Células infectadas con virus silvestre Control (+) ³	0.080 0.080 0.098 0.078	0.075	0.0069	51.78	48.21	ND
HEp-2 MOI 5 Pase 1	0.079 0.056 0.074 0.072	0.070	9.9x10 ⁻³	48.01	51.98	ND
HEp2 MOI 10 Pase 1	0.080 0.073 0.069 0.076	0.0745	4.6x10 ⁻³	51.09	48.90	N.D
HEp-2 MOI 5 Pase 2	0.098 0.088 0.086 0.089	0.090	5.3X10 ⁻³	61.72	38.27	9.9
HEp2 MOI 10 Pase 2	0.100 0.102 0.097 0.099	0.099	2.08 ⁻³	67.90	32.09	16.12
HEp-2 MOI 5 Pase 3	0.102 0.103 0.104 0.105	0.1035	1.29x10 ⁻³	70.98	29.01	19.2
HEp2 MOI 10 Pase 3	0.123 0.134 0.142 0.143	0.1355	9.25x10 ⁻³	92.93	7.06	51.78

¹ De cada cosecha se determinó el % de interferencia como se describió en material y métodos y se muestran las lecturas colorimétricas de cuatro pozos individuales, el promedio y la desviación estándar de las lecturas obtenidas en cada caso.

² El control negativo (Células sin infectar) se tomo como el 100% de sobrevida y a partir de él se calcularon los % de sobrevida en todos los demás casos.

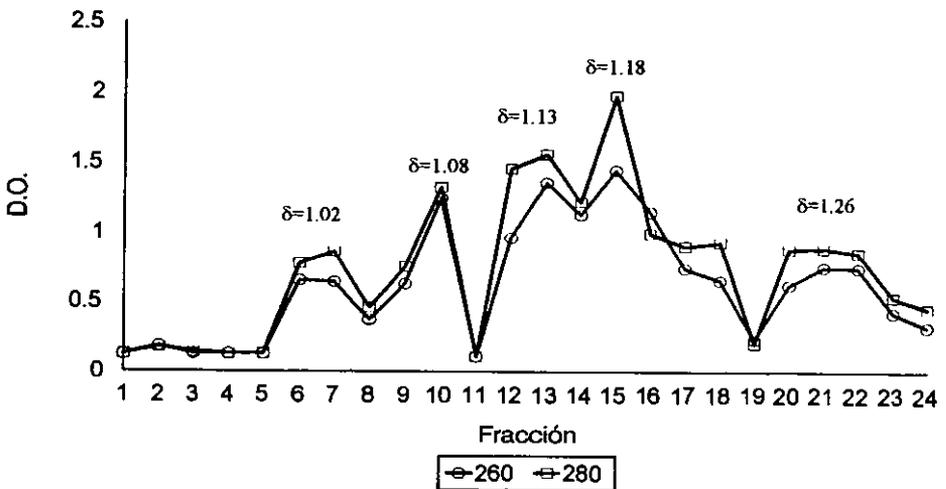
³ El control positivo son células infectadas a MOI de 0.3 con el virus silvestre purificado.

⁴ El porcentaje de interferencia se calculó como el porcentaje de sobrevida en cada sobrenadante menos el del control positivo.

% de sobrevida = [(D. O. Control negativo /D. O. del sobrenadante de pase)*100] - [(DO control negativo/ DO. Control positivo) *100]

Como se muestra en la tabla el porcentaje de interferencia fue detectable a partir del 2º pase a MOI de 5 y 10 y aumentó en el siguiente pase, el efecto fue más evidente utilizando MOI de 10.

Para los siguientes experimentos se utilizó la suspensión viral con mayor porcentaje de interferencia a la infectividad (tercer pase a MOI de 10) se separó por gradiente de sacarosa. (Gráfica No 2)

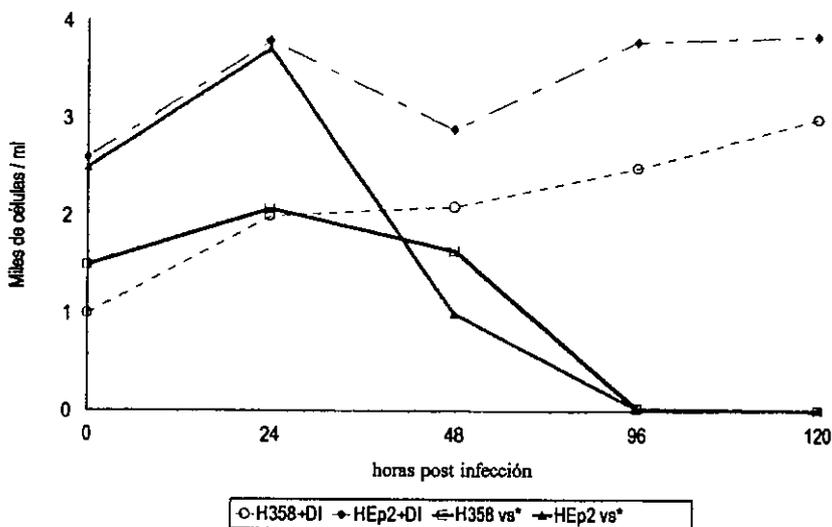


Gráfica No 2 Densidad óptica de las fracciones obtenidas en el gradiente de sacarosa del tercer pase MOI 10

Como puede observarse en la gráfica, la suspensión obtenida del pase 3 se separa en 5 picos principales tanto de proteína como de ácidos nucleicos los picos 1,2,3, y 5 tienen densidad diferente de la del virus silvestre lo que podría sugerir la presencia de DI's. Así decidimos utilizar esta suspensión viral para establecer los cultivos persistentes. Para esto, se infectaron líneas celulares epiteliales de laringe y pulmón humano (HEp-2 y H358 respectivamente) se infectó a

multiplicidades de 10, 5, 1 y 0.1. Las multiplicidades de infección mayores de 0.1 fueron incapaces de generar persistencia ya que las células no sobrevivieron y se comportaron como en una infección aguda, Sin embargo a la multiplicidad de 0.1 obtuvimos células persistentemente infectadas en donde pudimos comprobar la infección y mostraban una buena tasa de crecimiento.

Cuando realizamos la infección de líneas celulares HEP-2 y H358 con el virus silvestre observamos efecto citopático generalizado a las 48 horas, las células que sobrevivieron (entre el 1 y 2%) con el tiempo también murieron por lo que fue imposible recuperar el cultivo, en cambio cuando la infección se hizo con la suspensión enriquecida de partículas defectuosas, tuvo un número de células viables estable y logramos establecer el cultivo, en el cual se observa efecto citopático localizado. Este evento puede observarse en la gráfica No 3 en donde la cinética de sobrevivencia de ambas líneas celulares a MOI. de 0.1 con las suspensiones libre o enriquecida con DI's es diferente.



GRÁFICA No 3: La viabilidad celular se determinó con azul tripano después de la infección con las suspensiones de virus silvestre o con la suspensión con DI's

* vs=virus silvestre

CONFIRMACIÓN DE PERSISTENCIA EN LOS CULTIVOS RECUPERADOS

A) Presencia de antígeno viral:

Uno de los parámetros que se utilizaron para determinar si el cultivo celular estaba persistentemente infectado fue la determinación de manera rutinaria de la expresión de antígeno viral por inmunofluorescencia indirecta (Figura 1).

Para determinar la cantidad de células que presentaban el antígeno viral se utilizó citometría de flujo. En los pases 20 y 21 H358per se observó un porcentaje de 71 y 98.88 % de células infectadas (Fig 2 c y d) mientras en los pases 30, 88 y 89 en el cultivo HEP-2 per

encontramos 82% y 90 % de células infectadas respectivamente (figura 2 f y g). Ninguno de los pases mencionados produjo virus extracelular infeccioso determinado por TCID₅₀.

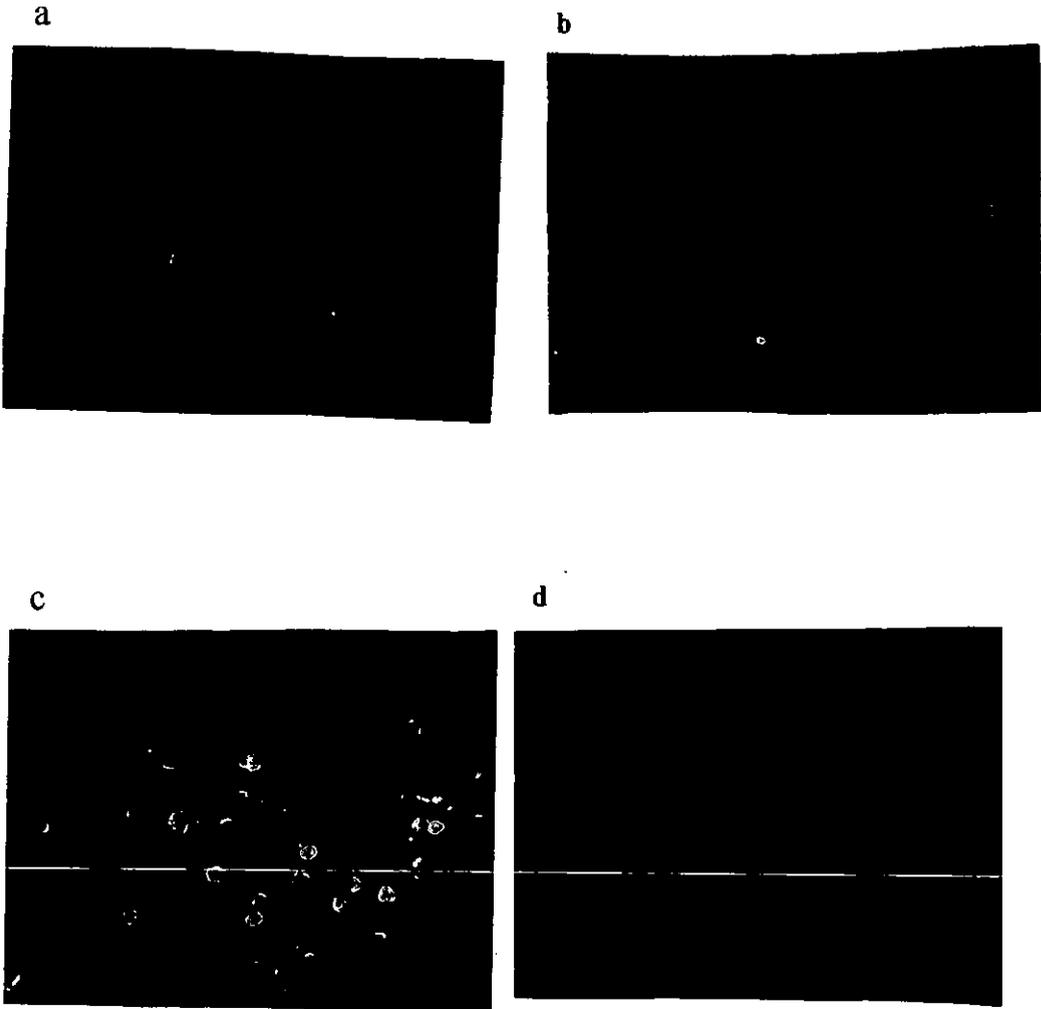


Figura 1: Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos anti VSR obtenidos en conejo, se muestra en a) células no infectadas (control negativo), b) Células infectadas de manera aguda 48h post infección (control positivo) c) Cultivo persistente H358, d) Cultivo persistente HEp-2

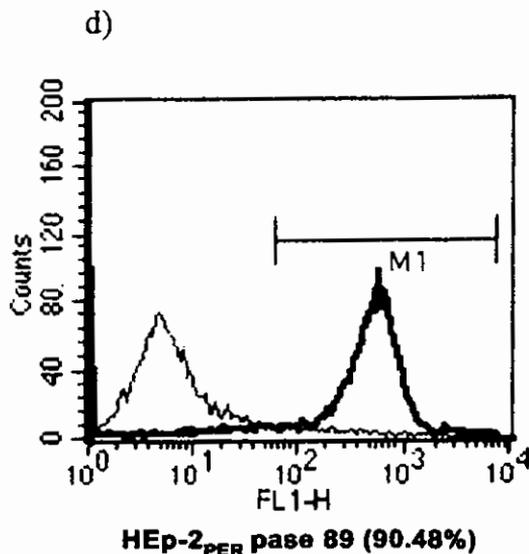
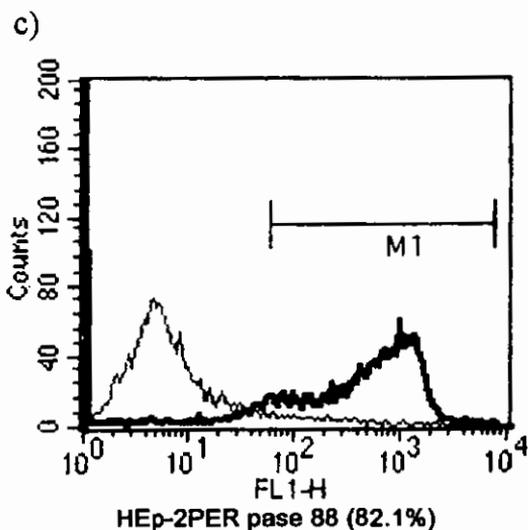
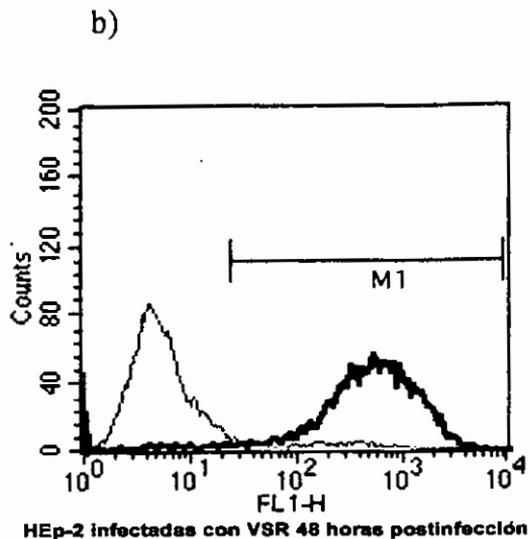
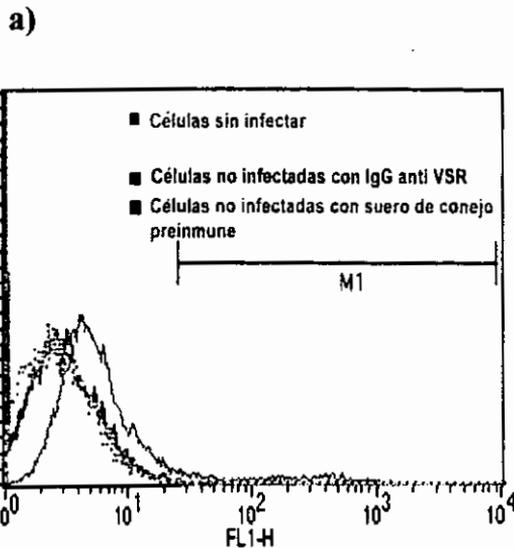
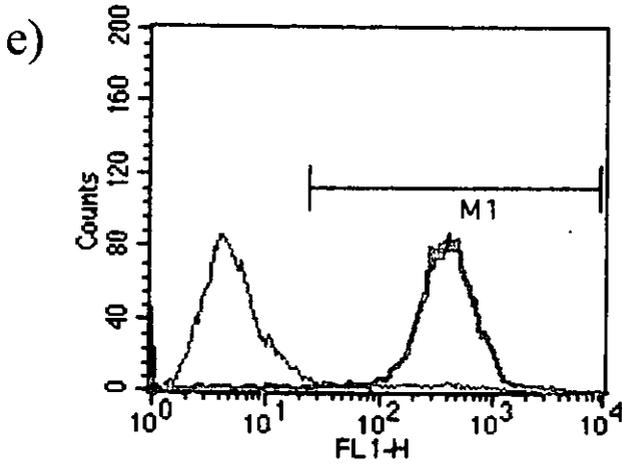
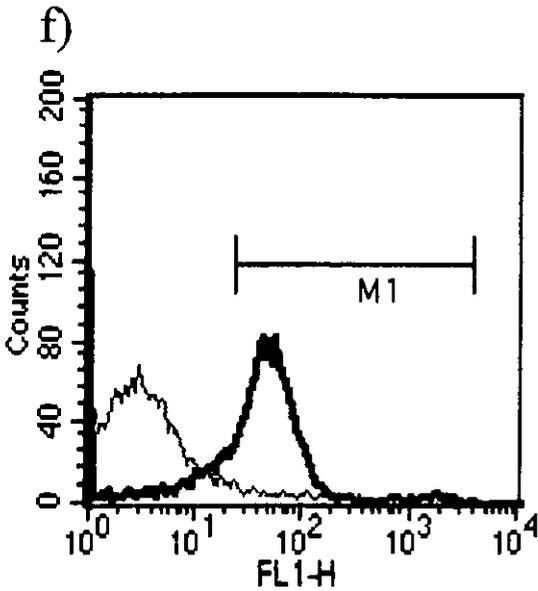


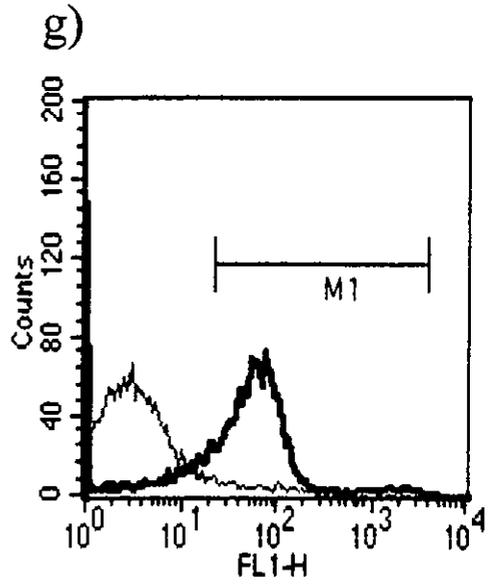
Figura 2: Ensayo de FACS en el panel a) se muestran los controles negativos, células no infectadas : sin tratamiento, células con solo el anticuerpo anti VSR obtenido en conejo, células tratadas solo con el segundo anticuerpo anti IgG de conejo fluoresceinado, y células tratadas con suero preinmune y el segundo anticuerpo. En el panel b) células HEp-2 infectadas de manera aguda, y en c) y d) los Pases 88 y 89 del cultivo persistente en HEp-2 respectivamente.



H358 infectadas con VSR 48 horas postinfección



H358_{PER} pase 20 (78.59%)



H358_{PER} pase 21 (80.04%)

Figura 2 continuación:

Se muestran los resultados del ensayo de FACS en el panel e) células H358 infectadas de manera aguda 48 pos-infección, en f) y g) los pases 20 y 21 del cultivo persistente en H358 respectivamente.

B) Expresión del genoma viral por RT-PCR.

Otro criterio para confirmar la persistencia del virus en el cultivo fue determinar la expresión del genoma viral, lo cual se realizó través de la amplificación de un segmento de 277 pares de bases comprendido en la región del RNA mensajero del gen de la nucleocápside (N) a partir del nucleótido 858 al 1135.

La retrotranscripción se realizó con la fracción de RNA que se une a oligo dT para seleccionar a los mensajeros y de esa manera estar seguros de que el genoma viral estaba siendo expresado durante la persistencia los resultados se muestran en la figura 3, donde se observó el producto de 277 pb tanto con el RNA obtenido de las células infectadas de manera aguda (control +) como en los cultivos persistentes de HEP-2 per pases 6 y 18 y de H358 per pases 6, 12 y 26. Este ensayo de RT-PCR se llevó a cabo de manera regular en los distintos pases obtenidos con el fin de confirmar la expresión del genoma viral. En las células HEP-2 el producto de PCR fue visible a partir del pase 5 y hasta el pase 45, mientras que para las células H358 del pase 6 al 56.

ANÁLISIS DEL VIRUS OBTENIDO DE LOS SOBRENADANTES DE CULTIVOS PERSISTENTES:

Para determinar si los cultivos persistentes producían virus extracelular infeccioso se titularon los sobrenadantes por TCID₅₀ y se analizó la presencia de partículas defectuosas por interferencia a la infectividad del virus silvestre (tabla 2). Los resultados se muestran en la gráfica no 4

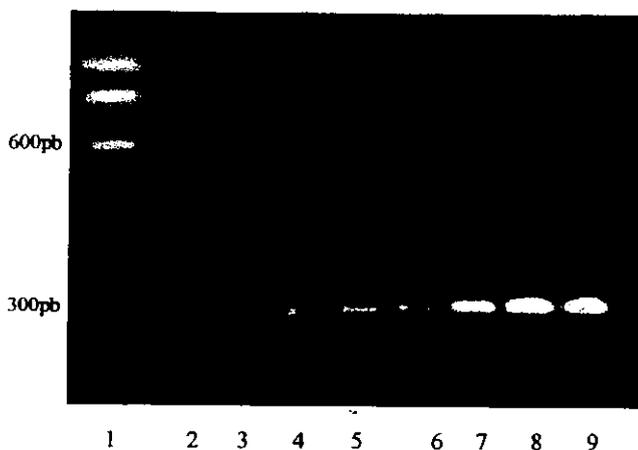


Figura 3: RT-PCR para el gen N del RSV carnil 1) Marcador de pesos moleculares 100 pb Bio Rad, 2) células no infectadas (control negativo) 3) sin cDNA, 4) células infectadas con el virus silvestre de manera aguda 48hs post infección, carriles 5 y 6) pases 6 y 18 del cultivo persistente en HEP-2, carriles 7, 8 y 9) pases 6, 12 y 26 del cultivo persistente en H358 respectivamente. Los productos de la amplificación fueron separados en un gel de agarosa al 1% en TBE teñido con bromuro de etidio.

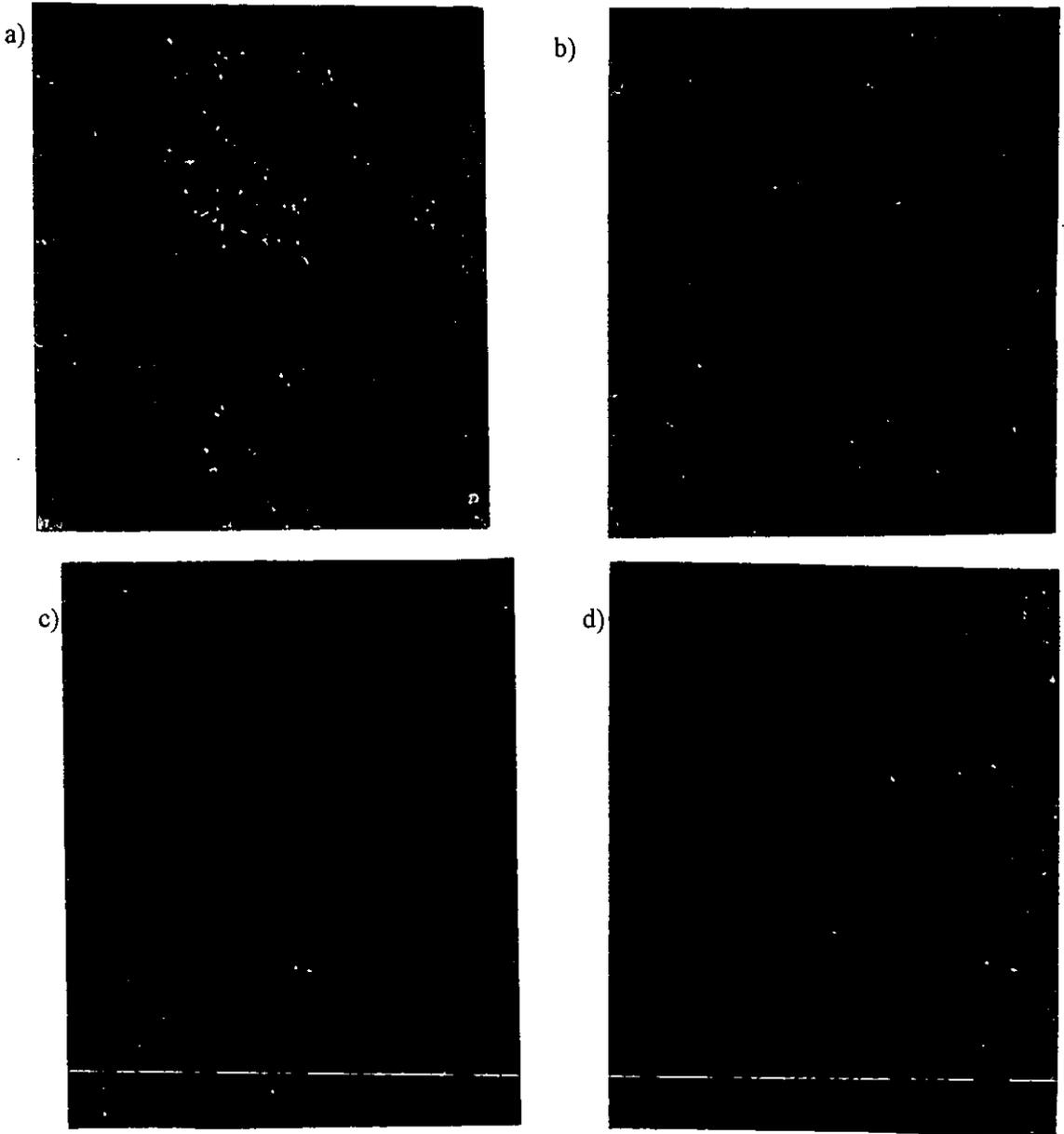


Figura 5: Focos de infección en células VERO utilizando la técnica de inmunoperoxidasa que se describe en métodos panel: a) células no infectadas, b) Células infectadas con el virus silvestre de manera aguda c)células infectadas con el sobrenadante del pase 20 del cultivo persistente en HEP-2 y en d) células infectadas con el obrenadante del pase 27 del cultivo persistente en H358

	Control (+)*	Control (-)**	P1	p2	P3	P4	P5	p6	p7	p8	p9	P10
DO ¹	0.173	0.548	0.224	0.340	0.379	0.482	0.495	0.507	0.569	0.560	0.577	0.578
%sobrevida	31.56	100	40.87	62.04	69.16	87.95	90.32	92.52	100	100	100	100
%muerte	68.44	0	59.12	37.95	30.84	12.04	9.67	7.48	0	0	0	0
%interferencia			9.31	30.48	37.6	56.39	58.76	60.97	72.27	70.62	73.73	73.91

TABLA No2 Interferencia determinada en sobrenadantes de pases del cultivo persistente de células H358.

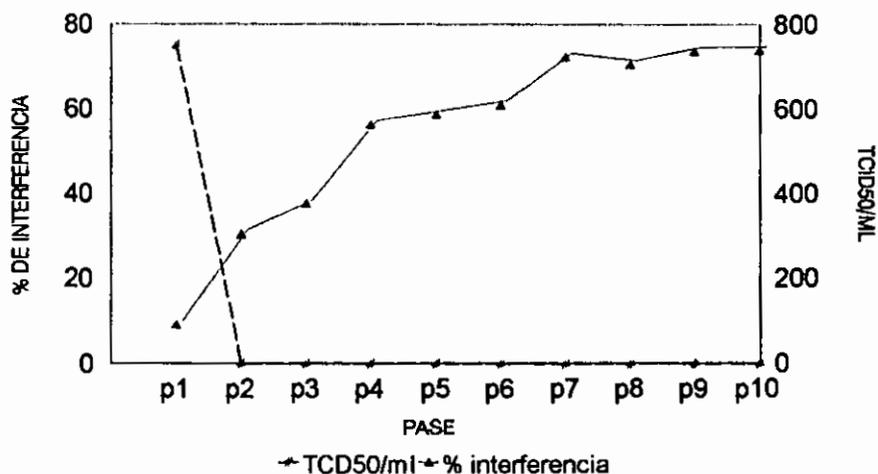
¹media de 4 determinaciones independientes

*Control positivo (células infectadas de manera aguda con el virus purificado MOI 0.03 72 h post infección)

** Control negativo (Células no infectadas)

P= No de pase

Estos mismos resultados se muestran en la gráfica 4:



GRÁFICA 4: Título y porcentaje de interferencia determinados en los sobrenadantes de los primeros 10 pases obtenidos del cultivo persistente en células H 358

Como puede observarse el % de interferencia a la infectividad se incrementa con el pase, mientras se reduce el efecto citopático sugiriendo que durante la persistencia se producen partículas

defectuosas que modulan la infectividad del virus silvestre. Este mismo evento se observa en las células HEp-2 (Tabla 3 y grafica 5). Lo cual apoya nuestra observación anterior

	Control (+)*	Control (-)**	P1	p2	p3	p4	p5	p6	p7	P8	p9	P10
DO ¹	0.142	0.356	0.272	0.274	0.250	0.350	0.352	0.325	0.352	0.345	0.358	0.422
%sobrevivida	39.88	100	76.40	76.96	70.22	98.31	98.87	91.29	91.29	96.91	100	100
%muerde	60.11	0	23.59	23.04	29.77	1.68	1.12	8.70	8.70	3.08	0	0
%interferencia			36.52	37.08	30.34	58.43	58.99	51.41	51.41	57.03	60.68	78.65

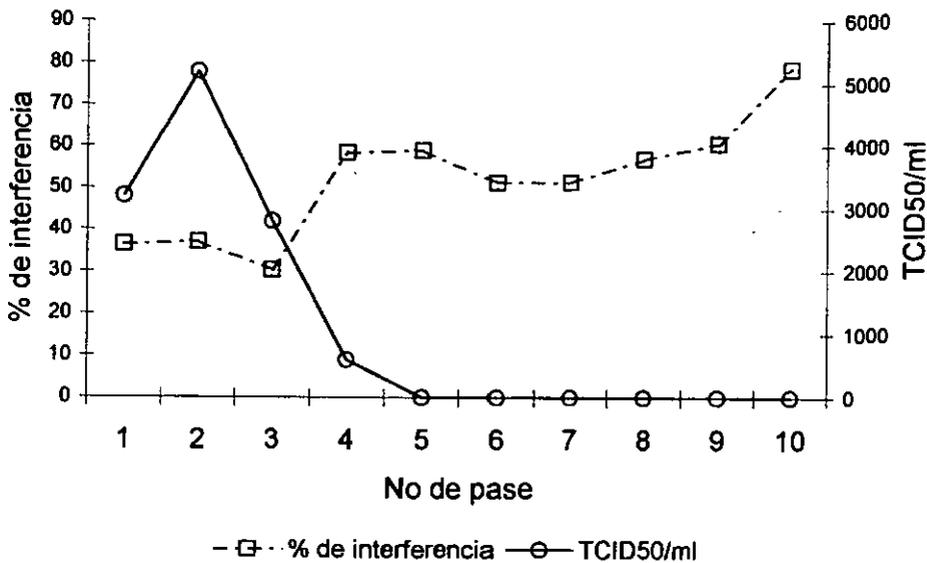
TABLA No 3: Interferencia determinada en sobrenadantes de pases del cultivo persistente de células HEp 2

¹media de 4 determinaciones independientes

* Control positivo (células infectadas de manera aguda con el virus purificado MOI 0.3 72h post infección)

** Control negativo (Células no infectadas)

Cabe mencionar que en la en línea celular H358 no se detectó virus extracelular después del pase 2, sin embargo la interferencia aumentó hasta alcanzar el 73.68%. En la línea celular HEp-2 se observó virus extracelular en los dos primeros pases a partir del pase 3 no se detecto virus infecciosos extracelular por TCID₅₀, En esta línea celular también se observo el incremento de la interferencia con el número de pases hasta alcanzar el 78.63% en el pase 10 y en la línea celular HEp-2 se observó virus infeccioso extracelular hasta el pase 3 medido por TCID₅₀ y la interferencia llegó a alcanzar el 78.63% en el pase 10.



GRÁFICA No 5: Título determinado por TCID₅₀ y porcentaje de interferencia en el cultivo persistente obtenido de células HEp-2 con respecto al número de pase

DETERMINACIÓN DE VIRUS EXTRACELULAR INFECTIVO EN LOS SOBRENADANTES DE LOS PASES DE LOS CULTIVOS PERSISTENTES.

Debido a que en los sobrenadantes de células infectadas persistentemente no pudimos detectar extracelular utilizando TCID₅₀ y debido a la baja sensibilidad de ésta técnica, decidimos usar un método más sensible que fue el de ensayo en placa. Esta técnica permite detectar una partícula infecciosa, siempre y cuando el número de virus producido por célula infectada sea suficiente para infectar las células adyacentes y originar una placa. Mediante el ensayo en placa se analizaron los pases HEp2per 12, 35, y 57 y H358per 10, 22, 35 y 57, sin embargo solo en los pases Hep2per 12 y H358per 10 se detectó virus extra celular por placa. Los resultados se muestran en la tabla No 4.

Virus estándar	SN* HEp2 P-12	SN* H358 P-10
2490 UFP/ml	173 UFP/ml	156 UFP/ml

TABLA No 4: Titulación por placa del virus estándar y de los sobrenadantes de los cultivos persistentes obtenidos en las células HEp-2 y H358

*SN sobrenadante de células infectadas persistentemente

P=No de pase

Las placas obtenidas en los sobrenadantes de cultivos persistentes son más pequeñas que las que produce el virus silvestre como se muestra en la figura.4

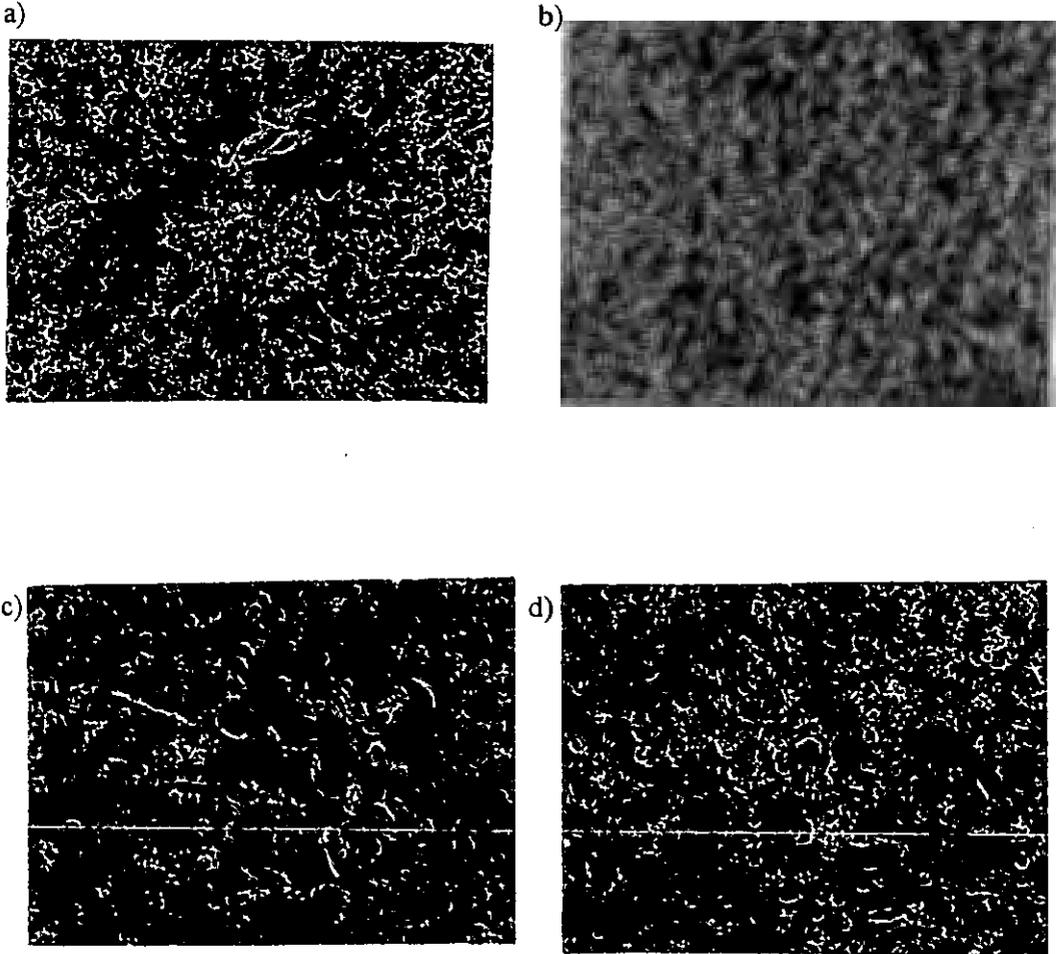


Figura 4: Titulación por placa: se muestran las placas obtenidas en células VERO en el panel a) virus silvestre, b) Células no infectadas c) células infectadas con sobrenadantes de Pase 23 del cultivo persistente obtenido en células HEp2 y en d) células infectadas con el sobrenadante del pase 22 del cultivo persistente obtenido en células H358

EFEECTO DE LA LUZ U. V. SOBRE LA INTERFERENCIA CON LA INFECTIVIDAD.

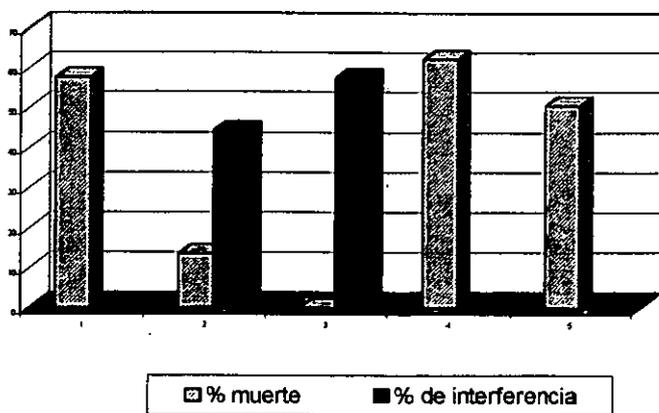
Con el fin de comprobar que la interferencia con la infectividad del VSR inducida por los sobrenadantes del cultivo persistente se debía efectivamente a la presencia de partículas defectuosas y no a factores tales como interferón o citocinas producidas por las células infectadas, irradiamos el sobrenadante de algunos de los pases persistentes con luz U.V. para inactivar así a las partículas virales y los probamos nuevamente en la interferencia.

El virus silvestre con un título de 1×10^5 TCID₅₀/ ml se irradió con una lámpara de luz U.V. de 15 Watts durante 5, 10, 15 y 30 segundos. Aunque desde los 15s no se detectó virus infeccioso por TCID₅₀ decidimos irradiar los sobrenadantes por 30 segundos ya que está reportado que las partículas defectivas por tener RNA de menor tamaño, requieren dosis más altas (59).

Los sobrenadantes de los cultivos persistentes de ambas líneas celulares (HEp-2 per pase 10 y H358 per pase 12) se irradiaron durante 30s y se repitió el ensayo de interferencia. Como esperábamos la interferencia a la infectividad no se detectó en los sobrenadantes después de la irradiación confirmando que es de naturaleza viral y debida a DI (Tabla 5 y grafica 6).

	D. O. promedio	Desviación estándar	% sobrevida	% muerte	% de inferencia
Control negativo	0.490	2.3×10^{-3}	100	0	0
Control positivo	0.208	1.2×10^{-3}	42.44	57.56	0
Sobrenadante H358 per pase 12	0.425	1.5×10^{-3}	86.73	13.27	44.29
Sobrenadante Hep-2 per pase 10	0.510	1.3×10^{-3}	100	0	57.56
Sobrenadante H358 per pase 12+ U.V.	0.185	1.4×10^{-3}	37.5	62.25	0
Sobrenadante Hep-2 per pase 10+ U.V.	0.242	3×10^{-4}	49.38	50.62	0

TABLA No 5: Efecto de la luz UV sobre los sobrenadantes de pases de cultivos persistentes.



GRÁFICA No 6: Porcentaje de muerte e interferencia de los sobrenadantes de los cultivos persistentes antes y después del tratamiento con luz U.V.

- 1.-Células infectadas con el virus silvestre a MOI 0.3 (control positivo)
- 2.-Células infectadas con sobrenadantes del pase 10 del cultivo persistente de las células HEp-2.
- 3.- Células infectadas con sobrenadantes del pase 12 del cultivo persistente de las células H358.
- 4 y 5 Célula infectada con sobrenadantes de los pases 10 HEp-2 y 12 H358 después de irradiarlos durante 30s con luz U.V.

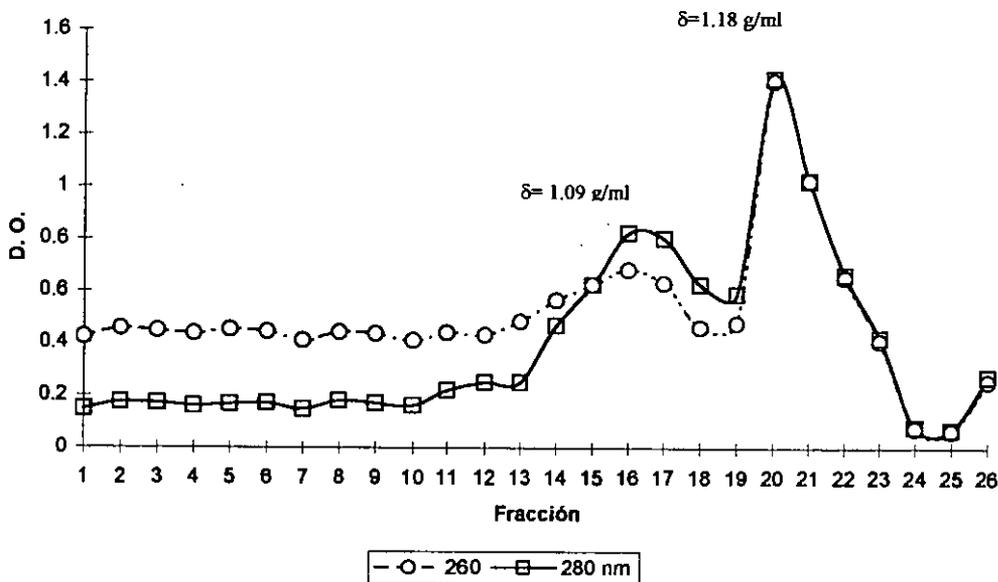
DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INFECTAR CÉLULAS VERO DE LOS SOBRENADANTES DE LOS CULTIVOS PERSISTENTES:

En los sobrenadantes de los pases (15, 20, 36 HEp2per y en los pases 17, 27 y 42 de H358 per) en los que no se detectó virus infeccioso extracelular ni por TCID₅₀ ni por placa viral se determinó su capacidad para infectar células VERO induciendo focos de infección a las 48 h postinfección. Los resultados se muestran en la figura: 5 como puede observarse se presentaron focos de infección sugiriendo que las células VERO se infectaron y expresan algunas proteínas virales aunque no se replicó el virus lo suficiente para que se produjera placa viral.

ANÁLISIS POR GRADIENTE DE SACAROSA DE LOS SOBRENADANTES OBTENIDOS DE CULTIVOS PERSISTENTES.

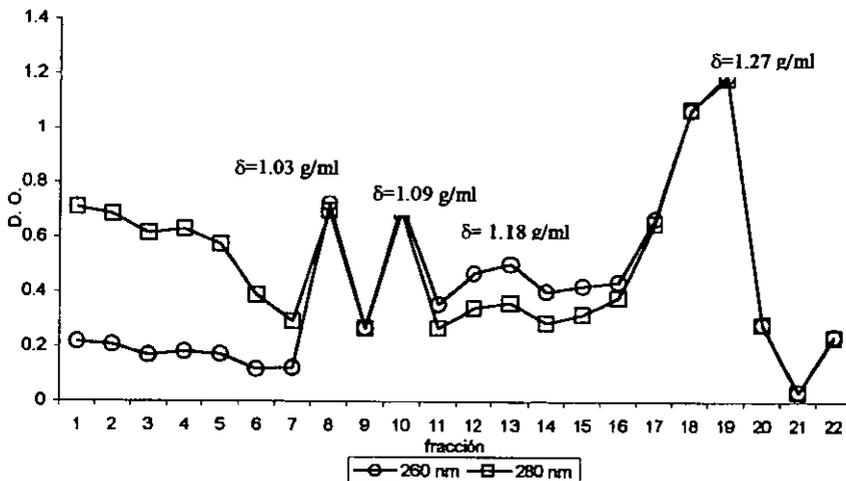
La presencia de antígenos virales demostrados por inmunofluorescencia y por focos de infección sugirió la presencia de DI's en los sobrenadantes obtenidos de los cultivos persistentemente infectados así que se decidió tratar de separar estas DI's en gradientes de sacarosa para lo cual fue necesario concentrarlos.

Para analizar los gradientes se fraccionaron y se determinó la absorbancia a 280 y 260 nm para determinar la presencia de proteínas y de ácidos nucleicos respectivamente de manera paralela se determinó la densidad de las fracciones por refractometría (gráficas 7 y 8).



GRAFICA No 7 Densidad óptica de las fracciones obtenidas del gradiente de sacarosa del sobrenadante del cultivo persistente de las células H358

En el sobrenadante de las células HEp -2 per se observa un pico con densidad semejante a la del virus original (1.19 g/ml) y otro pico de menor densidad (1.09g/ml)



GRÁFICA No 8 Densidad óptica de las fracciones obtenidas del gradiente de sacarosa del sobrenadante del cultivo persistente de las células HEp-2

En el caso de las células H358 se encuentra el pico que corresponde a la densidad del virus original (1.18 g/ml) y tres picos más (1.03, 1.09 y uno de mayor densidad de 1.2 g/ml) que pueden corresponder a DI's.

Con la finalidad de ver si las partículas obtenidas de los gradientes son capaces de establecer infecciones persistentes, se utilizaron los picos obtenidos del gradiente de sacarosa, para infectar células H358. Solo el pico con mayor densidad (1.27 g/ml), en la que suponemos se pueden encontrar agregados de virus completos y DI's logró generar infección.

La infección de células H358 con las partículas que se encontraron en este pico se le denominará H358 per_{II}, no presentó efecto citopático pero si fue claramente visible la expresión de antígeno viral por inmunofluorescencia indirecta (Figura No 6). Al utilizar el sobrenadante del cultivo H58 per_{II} para infectar células VERO se detectaron focos de infección (Figura 7). Por

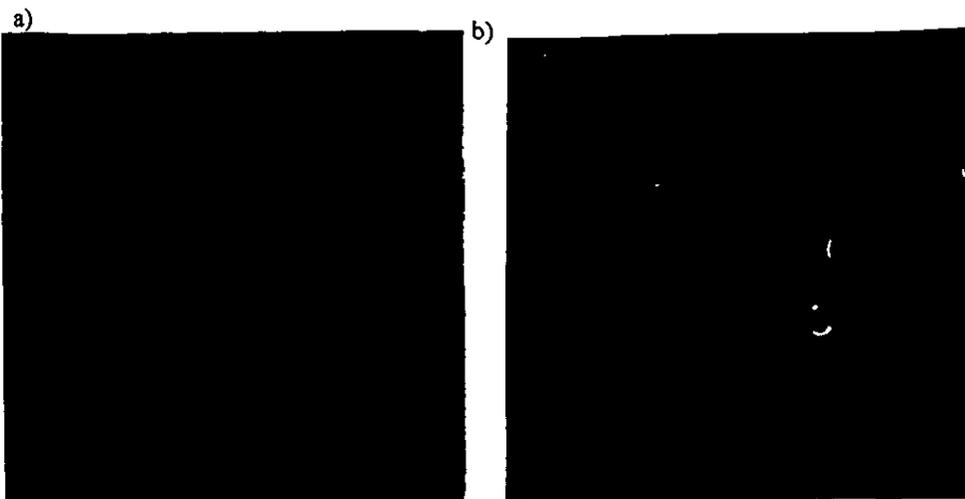


Figura No 6: Determinación de antígenos virales por inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti VSR obtenido en conejo en el panel a) se muestran células no infectadas y en b) células del pase 14 del cultivo H358_{perfl.}

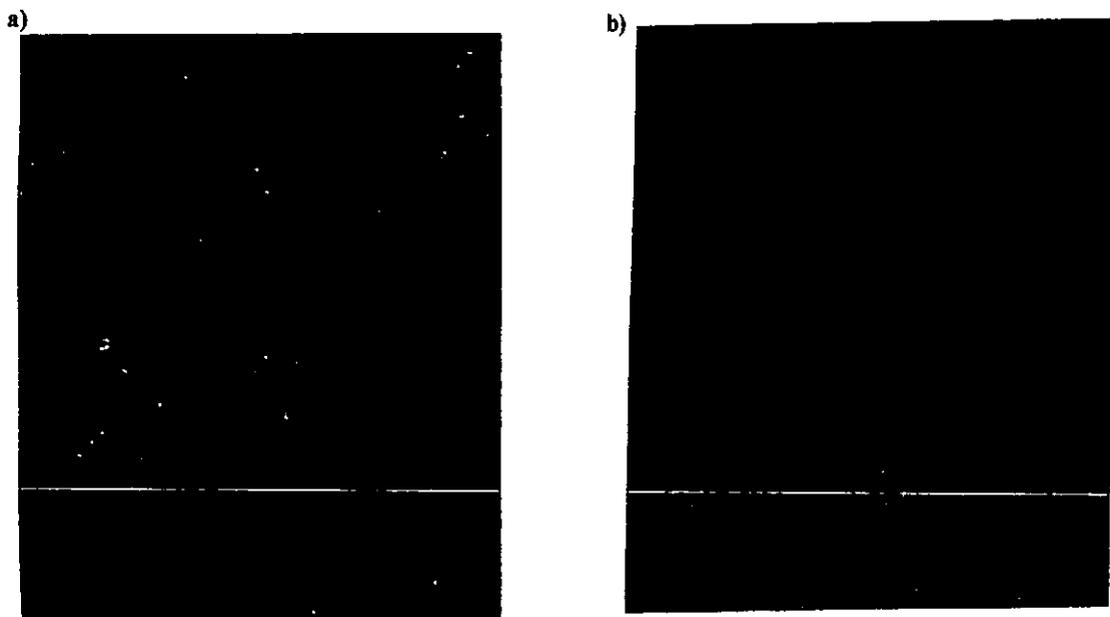


Figura No 7: focos de infección panel a) células no infectadas y en b) en células VERO infectadas con sobrenadantes del pase 14 del cultivo H358_{perfl.}

otro lado también se realizó el ensayo de RT-PCR (Figura 8) del gen N en las células del cultivo H358 per II obteniéndose el producto esperado (277 pb).

El porcentaje de infección determinado por FACs fue de 86.46 (Figura 9)

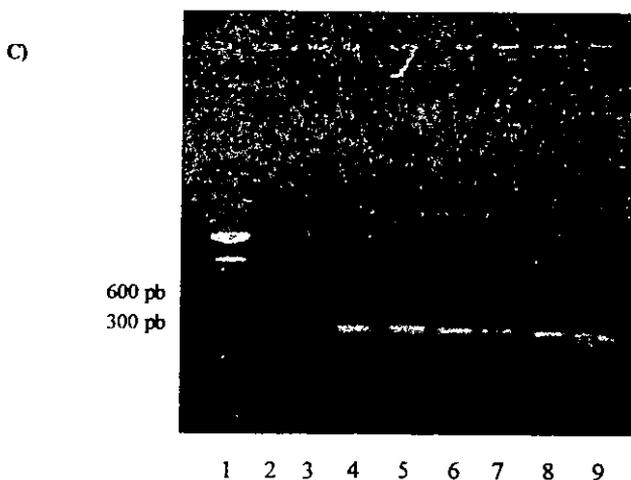
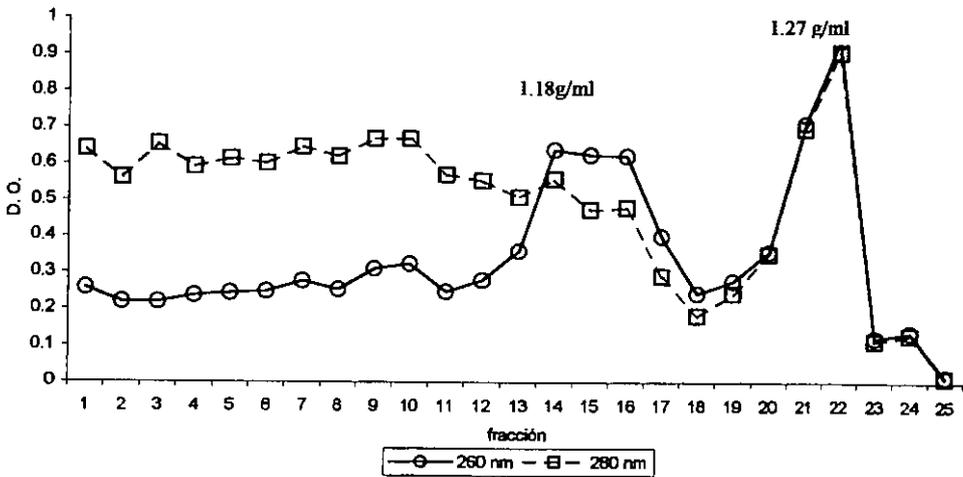


Figura 8: RT-PCR para el gen N del RSV del cultivo persistente obtenido de la infección con el pico de mayor densidad del gradiente de sacarosa en el camil: 1)Pesos moleculares plasmido pBR 322 cortado con MspI, carril 2) células no infectadas (Control negativo), carril 3) reacción sin cDNA, Carril 4) células infectadas con el virus silvestre 48 h post infección (control positivo) en camiles 5, 6, 7, y 9) Pases 2, 4, 8,12 y 19 del cultivo persistente H358 per II. Los productos de la amplificación fueron separados en un gel de agarosa al 1% en TBE teñido con bromuro de etidio.

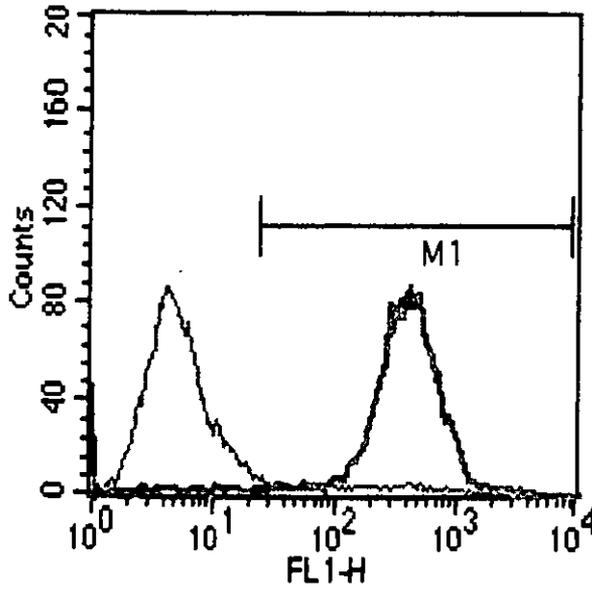
ANÁLISIS DE SOBRENADANTES DEL CULTIVO H358 PER II POR GRADIENTE DE SACAROSA:

El sobrenadante del cultivo H358_{perII} se recolectó hasta obtener un volumen de 200 ml suficiente para concentrar las partículas obtenidas y analizarlas en un gradiente de sacarosa (gráfica No 9). En este gradiente se conserva el pico que corresponde a la densidad de 1.27 g/ml (con la que se inicio la infección) y uno de menor densidad (1.18 g/ml) que corresponde al virus silvestre, perdiéndose los picos con densidad de 1.03 y 1.09 g/ml.

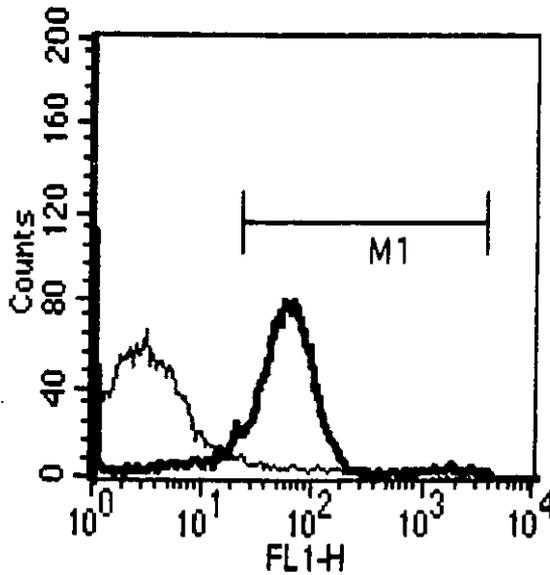


GRÁFICA No 9 Densidad óptica de las fracciones obtenidas del gradiente de sacarosa del sobrenadante del cultivo persistente de las células H358_{perII}

a)



H358 infectadas con VSR 48 horas postinfección



H358_{PER II} pase 8 (86.46%)

Figura 9: Ensayo de FACS en células H358 infectadas con las partículas del pico de densidad mayor al virus original 1.27g /ml en el panel a) células H358 infectadas con el virus silvestre 48 hs post infección y en b) las células del pase 8 del cultivo persistente.

Discusión:

Para que un virus permanezca persistentemente en una célula es necesario que esta sobreviva a la infección y se establezca un equilibrio entre la duplicación celular y la replicación del virus. Este equilibrio puede lograrse a través de cambios tanto en el virus como en la célula. Entre los cambios que sufre el virus para permanecer en una célula están la modulación de su infectividad a través de generar diferentes variantes, entre estas se encuentran las partículas defectuosas (DI). Las DI se han descrito como variantes virales en donde el genoma viral está parcialmente deletado o bien presenta inserciones, la característica relevante de estas DI es que son incapaces de replicarse a sí mismas, y dependen del virus estándar para su multiplicación. Esta dependencia se debe a que compiten con él por productos genéticos virales y celulares indispensables para completar su ciclo replicativo.

Las DI's se han asociado con las infecciones persistentes de virus de DNA y RNA tanto *in vitro* (en líneas celulares), como *in vivo*. A pesar de que la asociación de DI's con la persistencia viral data de los años 60 aún no está claro si las DI's realmente participan en este fenómeno o simplemente son un producto secundario (41).

La persistencia de los Paramixovirus incluyendo el VSR se ha reportado *in vitro* en diferentes líneas celulares e *in vivo* en cobayos (37), sin embargo la participación de las DI's no ha sido estudiada.

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la participación de las DI en el establecimiento de persistencia del Virus Sincitial Respiratorio (VSR) en líneas celulares epiteliales del tracto respiratorio, se seleccionó este tipo de estirpes celulares por ser el blanco inicial de la infección viral en el humano.

La estrategia consistió en establecer la persistencia en dos líneas celulares (HEp-2 y H358) en las que el virus estándar es altamente lítico. Para modular este efecto del virus, fue necesario establecer la infección con suspensiones enriquecidas con partículas defectuosas, las características de la suspensión utilizada se describen en la tabla 1 y su análisis por gradiente de sacarosa se muestra en la gráfica 2.

En las gráficas 4 y 5 se observa claramente como la presencia de DI's en el inóculo viral evita la muerte celular permitiendo que el virus permanezca en el cultivo.

Uno de los criterios utilizados para determinar que los cultivos estaban persistentemente infectados fue la determinación de virus infeccioso extracelular, inicialmente la infectividad viral se determinó por TCID₅₀, sin embargo la sensibilidad

de ésta técnica es baja, por lo que al no encontrar virus infectivo se decidió utilizar la técnica de placa viral. Con este ensayo es posible determinar una partícula infectiva siempre cuando la cantidad de virus producido por célula sea lo suficientemente alto para que infecte las células adyacentes y así origine un sincitio, (célula gigante multinucleada). Empleando esta técnica fue posible determinar virus infectivo extracelular en sobrenadantes del cultivo persistente. Se estudiaron los pases de HEp-2per 9,10,17 y20; y del H358per 11,12,17,32. Solo con los pases 10 de HEp-2per y 12 del H358per se encontró virus infeccioso aunque el título fue bajo (aproximadamente 1 logaritmo menos que el detectado por TCID₅₀ del virus estándar) también el tamaño de la placa fue más pequeño que la obtenida con el virus original lo que sugiere que la producción de virus infectivo por célula infectada (burst size) es menor a la que produce el virus estándar.

Una de las características que se han observado con más frecuencia en las DI's es su capacidad de interferir con la infectividad del virus estándar, debido a que compiten por el receptor celular y por proteínas estructurales. Por lo tanto decidimos estudiar este fenómeno en el sobrenadante del cultivo persistente observándose que la interferencia se incrementa conforme aumenta el número de pase lo que sugiere que las DI se forman durante la persistencia.

Para confirmar que realmente la interferencia se debía a las DI presentes en el sobrenadante y no a factores solubles (como el interferón o otras citocinas) los sobrenadantes se trataron con luz U.V. con el fin de inactivar la infectividad de las partículas defectuosas presentes en del cultivo, por la formación de dímeros de timina que fraccionan el RNA. La irradiación fue capaz de anular el efecto de interferencia que habíamos obtenido en los sobrenadantes de los cultivos persistentes soportando el echo de que la interferencia puede ser de naturaleza viral.

El hecho de que el tratamiento con luz U.V. haya eliminado la interferencia así como que el porcentaje de interferencia aumenta con los pases sugiere que las DI's se produjeron durante los pases. Este resultado es concordante con el encontrado por Treuhaft (54) en el que en una infección aguda con el VSR se generan DI's en células HEp2 a altas multiplicidades determinadas por interferencia, estos mismos autores demuestran que la interferencia no se debía a la presencia de interferón, pues esta no se ve afectada al tratar el sobrenadante con suero anti-interferón (60).

Con la finalidad de investigar si el virus que se produjo en los sobrenadantes de

los cultivos persistentes era infectivo y podía transmitirse de forma intercelular, se llevó a cabo el ensayo de focos de infección, en el cual se infectan células Vero y después se determina la presencia de antígeno viral por inmuno peroxidasa.

Las células Vero que se infectaron con el sobrenadante de cultivos persistentes mostraron la formación de focos de infección pero no fue posible observar sincitio. Lo que indica que se infectan las células pero la replicación viral si es que se lleva a cabo no es suficiente para originar efecto citopático visible.

La presencia de antígeno viral en las células infectadas persistentemente, se determinó: cualitativamente por inmunofluorescencia indirecta y cuantitativamente por el ensayo de FACS. Con esta última técnica pudimos comprobar que un 98.88% de células presentan antígeno viral, en pases H358per 20 y 21 71 y 82.10% y 90.48% en los pases 88 y 89 del cultivo HEp-2per respectivamente. Estos valores se comparan con el 80% obtenido por Fernie (34) con VSR en un modelo de células que son poco susceptibles al virus, como son cultivos primarios de células de ratón Balb/C. Por otro lado es un porcentaje alto cuando se compara con otros modelos de cultivos persistentes obtenidos con diferentes virus sin partículas defectuosas, como el virus de la Rabia. (61), el de Virus de Hepatitis murina (62) y con el virus de Herpes simple (63) en los que el porcentaje de infección se encuentran son: 0.001, el 5 y 30 % respectivamente.

El porcentaje de células infectadas mayores al 30% concuerda con modelos matemáticos de cinética propuestos para diferentes modelos. Que sugieren que en un cultivo persistente obtenido a partir de partículas defectuosas la mayoría de las células que sobreviven son aquellas que están infectadas solo con DI's o simultáneamente con partículas defectuosas y virus estándar, debido a que las infectadas solo con el virus estándar mueren (64).

En los cultivos persistentes tanto de HEp2 como de H358 en pases que no presentan efecto citopático (ECP) fue posible confirmar que el genoma viral se expresa ya que encontramos por ensayo de RT-PCR el RNA mensajero del gen estructural N.

La presencia del mensajero viral así como de proteínas (antígenos virales) nos indica que el virus esta transcripcionalmente activo.

Otra evidencia de que en el cultivo persistente se tienen DI's es el hecho de que se observan bandas de diferente densidad a la del virus original por gradiente de sacarosa. Estas bandas están presentes tanto en la suspensión viral enriquecida con partículas con la que se inicio la persistencia, así como en los sobrenadantes de los

cultivos persistentes de HEp-2per y H358per. En HEp-2 per se encuentran dos bandas, una de densidad igual a la del virus original (1.18g/ml) y una de mayor densidad (1.2g/ml). En cambio en H358per encontramos 3 bandas dos de menor densidad (1.03g/ml y 1.09g/ml) y una de mayor densidad (1.2g/ml) como se muestra en la figuras No. 8 y 9. Estos datos nos indican que efectivamente en los cultivos persistentes se produjeron partículas de diferente densidad a la del virus original.

Las diferentes bandas obtenidas del gradiente de sacarosa del sobrenadante del cultivo H358per se utilizaron para infectar células H358 con la finalidad de ver si se obtenían cultivos persistentes. Solo en aquella que presentaba mayor densidad de la del virus original (banda de 1.27g/ml); fue posible establecer un nuevo cultivo persistente en células H358.

El cultivo obtenido se mantuvo por 15 pases durante los cuales, los resultados de inmunofluorescencia para las células fue positivo (fig 9) y se observó la capacidad para formar focos de infección en células Vero (fig 7). Al analizar el sobrenadante de este cultivo se encontró 99% de interferencia y en un gradiente de sacarosa se encuentran las bandas que corresponden al virus original (1.18 g/ml) y una banda de mayor densidad (1.27 g/ml) (gráfica 9).

Las DI's se han utilizado como modulador de infectividad para establecer cultivos persistentes *in vitro* con el virus sendai (paramixovirus) en células BHK y en otros modelos de virus de RNA relacionados con los paramixovirus (Ebola, y parainfluenza) etc. (65 y 50).

Además de su participación en el establecimiento de modelos de persistencia debido a su interferencia con la infectividad del virus original y su incapacidad de replicarse por sí mismas se han propuesto otros usos para las DI's como son: posibles vacunas atenuadas y recombinantes, así como el de vectores de expresión para diversas proteínas (66, 67).

La presencia de DI's *in vivo* ha sido difícil de demostrar y solo se ha reportado en ratones recién nacidos infectados con LCMV (Virus de linfo coriomeningitis murina) (68), en pacientes infectados con HIV y en chimpancés infectados con virus de Hepatitis A. (69, 70) Su presencia se ha propuesto como la responsable de la constante activación del sistema inmune, debida a la constante producción del antígeno viral en el organismo. Sin embargo, también se les han atribuido propiedades patogénicas como el desarrollo de la secuela grave de un Paramixovirus, el virus de sarampión

(panencefalitis esclerosante subaguda) en el que estudios post mortem de células cerebrales de pacientes que desarrollaron esta enfermedad se encontraron principalmente DI's del tipo copy back. (71).

CONCLUSIONES.

Es posible establecer un cultivo persistente en líneas celulares epiteliales de origen humano con el Virus Sincitial Respiratorio utilizando suspensiones enriquecidas con partículas defectuosas.

El virus purificado es muy lítico en estas líneas celulares impidiendo la viabilidad celular después de que se presenta el efecto citopático.

En los sobrenadantes de los cultivos persistentes se puede detectar, interferencia con la infectividad del virus original y presencia de antígenos virales en la superficie celular.

Durante la infección persistente se encuentran partículas de densidad mayor a la del virus original en los sobrenadantes, Estas variantes no solamente son capaces de modular la infección lítica por el mismo virus, sino que aquellas que son de densidad mayor son capaces de establecer infecciones persistentes.

MATERIAL

MATERIAL DESECHABLE

Botellas de cultivo marca COSTAR 75 cm (3275)

Placas de cultivo celular de 24 pozos COSTAR (3594)

Placas de cultivo celular de 96 pozos COSTAR (3594)

Puntas para micropipeta con filtro y probadas contra RNAsas y DNAsas GIBCO 200-1000 μ l (14868-012) y de 20-200 μ l (14867-014)

Raspadores (gendarmes) COSTAR (3008), (3010)

Tubos Eppendorf presiliconizados 1.5, 0.6 ml COSTAR (3208,3210)

REACTIVOS QUÍMICOS:

Acetona Química Dinámica, México Mex, Cat A05000

Agarosa certificada para biología molecular BIO-RAD

Albumina sérica bovina SIGMA, Chemical Co., St. Louis MO; Cat A-4503

Alcohol isoamílico SIGMA I-9392

Azul de bromofenol. BIO RAD Cat. 161-0404

Azul tripano SIGMA Chemical Co., St. Louis MO, Cat. T-0776

Adyuvantes:

Adyuvante completo de freund SIGMA Chemical Co., St. Louis Mo., Cat F-4258

Adyuvante incompleto de freund SIGMA Chemical Co., St. Louis Mo., Cat F-5506

Antibióticos.

Estreptomicina SIGMA Chemical Co. Cat S-6501

Penicilina SIGMA Chemical Co. cat PEN-NA

Bromuro de etidio BIO-RAD 161-0430

Carbonato de sodio J. T. Baker Cat 790

Citrato de sodio J.T. Baker Cat 3646

Cloruro de potasio Merck Cat. 6404 y # L 10657ON

Cloruro de sodio Merck cat 6404 y # L 206160r

Dietil pirocarbonato SIGMA D5758

EDTA (etilén diaminoacetato de sodio dibásico) J. T. Baker 8993

EDTA 99.9 % de pureza SIGMA Co 808370

Fenol GIBCO Cat. L 1 5509011 100g

Ficoll SIGMA F4375

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Fosfato monobásico de potasio J.T. Baker Cat 790
Fosfato dibásico de sodio ANALIT Quimico Dinamia.
L-glutamina SIGMA G1517
Isotiocianato de guanidina GIBCO 15535-016
N-Lauril sarcosilato de sodio. SIGMA L-5125
D-MEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium) GIBCO BRL
Metanol MERCK Cat. 3705B21583
2 Mercapto etanol BIO RAD 21277
2-Propanol MERK 215882
Polietilen glicol (PEG) 8,000 SIGMA p-2139
Polilisina SIGMA, Chemical Co., St Louis, MO, Cat, 1399
Sacarosa MERK K-3985251
Tripsina de páncreas bovino SIGMA Chemical Co. 1989
Trizma SIGMA T-7149

REACTIVOS BIOLÓGICOS

Conjugado IgG anti conejo fluoresceinado Amersham N1034
Conjugado IgG anti conejo peroxidado Amersham NA 934
dATP Trifosfato de desoxiadenosina GIBCO BLR Cat. 8252SA
dCTP Trifosfato desoxicitidina GIBCO BLR Cat. 18253-013
dGTP Trifosfato desoxiguanosina GIBCO BLR Cat. 18254-011
dTTP Trifosfato desoxitimidina GIBCO BLR Cat. 28025-013
Inhibidor de RNAsa 20 000 U Boehringer Mannheim Cat. 799,017
Suero fetal bovino Bioexport (esterilizado por radiación γ).
Transcriptasa reversa. Monoloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLTV RT) GIBCO BRL
Taq polimerasa donada por el Dr. Rogelio Alonso jefe del laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Medicina de la UNAM.(AMPLIFICASA,
BIOTECNOLOGIAS UNIVERSITARIAS-MÉXICO)

Células y virus

-Células HEp 2 (carcinoma epidermoide de laringe ATCC CL 23)) y VERO (Riñón de Mono verde africano, *Cercopithecus aethiops* Cat ATCC CCL) del laboratorio de Virología, Facultad de Medicina UNAM ; proporcionadas por el

doctor Trudel del Instituto Armand Frappie, Montreal Canadá . Estas líneas celulares se mantuvieron con D-MEM adicionando del 10 % de suero fetal de bovino inactivado por calor (56°C por 20 minutos) 100 UI /ml de penicilina G sódica. Las botellas de cultivo se incubaron a 35 °C en atmósfera húmeda y con 5% de CO₂

-Células H358 (Carcinoma epidermoide de pulmón Humano descontinuada por el ATCC.) Proporcionada por el Dr. Patricio Garilio del Centro de Estudios Avanzados del IPN .

-Virus Sincitial Respiratorio

Cepa Long (ATCCVR-26 AMERICAN TYPE CULTURE COLECTION, ROCKVILLE MD, U.S.A) y B 8/ 60 donadas por el Doctor Trudel del Instituto Armand Frappie, Se recibió en células HEP 2 infectadas en botellas de 25 cm² complementado con MEM suero fetal bovino a 2 % y antibióticos. Las botellas se incubaron hasta que el efecto citopático fue evidente y /o el 80 -100 % de células estaban desprendidas, entonces se realizó la cosecha viral.

BIBLIOGRAFÍA:

- 1) McIntosh K and Chanock R M. (1990) Respiratory syncytial virus in: BN Fields, DM. Knipe et all, eds. Virology Raven Press, New York : 1045-1072.
- 2) Stott E and Taylor G. (1985) Respiratory syncytial virus brief review *Archiv. Virol* 84 (1): 1-52
- 3) Collins D. L., and Wetz G. W. (1983) cDNA cloning and transcriptional mapping of nine poly- adenylated RNAs encoded by genome of human respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2208-3212.
- 4) Yu Q Hardy R W and Wetz G W. (1985) Funcional cDNA clones of human respiratory syncytial virus N, P and L proteins support replication of respiratory syncytial virus genomic RNA analogs and define minimal trans-acting requirements for RNA replication. *J. virol* 69 (4) 2412-2419
- 5) Collins P. L. and Dickens L. E. (1986) Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order. *Poc Natl Acad Sci. USA.* 83:4594-98
- 6) Valdespino J L. García M L. (1994) Consideraciones clinicoepidemiologicas de las infecciones respiratorias agudas y Crónicas En García M L, Giono S, Pacheco C R, Escibar A, t Vakdesoubi H, K, eds Infecciones respiratorias agudas y crónicas INDRE, México.
- 7) Glezem W P, Paredes A, Allison J R , Taber L H and Frnk A L. (1981) Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from Low invome families in relationship to age, sex ethnic group, and maternal antibody level. *J. Pediatr.* 98:708-715.
- 8) Gimenez H B, Keir H M and Cash P. (1989) In vitro enhancement of respiratory syncytial virus infection of U937 cell by human sera. *J. Gen Virol* 70:89-96.
- 9) Krilov L R, Anderson L. J, Marcoux L and Bonagura V. r. (1989) Antibody mediated enhancemet of respiratory syncytial virus infection in two monocyte/macrophage cel lines *J. Infect. Dis.* 160:777-782
- 10) Becker S, Koren H A and Henke D C. (1993) Interleukin expression in normal nasal epithelium and its modulation by infection with respiratory syncytial virus and cytokines tumor necrosis factor, Interleuckin 1 and Interleukin 6. *A. J. Respir. Cell Mol Biol.* 8:2027
- 11) Arnold R, Werner F, Hwbert B, Wwerche H and Kenig W. (1994) Effect of respiratory syncytial virus antibody complexes on cytokine (Il-8, Il-6, TNF alfa) release and respiratory burst in human granulocytes *Immunology* 82:184-191
- 12) Welliver R C, Sun M Rinaldo D and Ogra P. L. (1995) Respiratory syncytial virus specific IgE responses following infection evidence for a predominantly mucosal response *Pediatric. Res.* 19:420-424
- 13) Yalovitz B, Welliver R C, castro G and krytofik D A. (1998) The release of leukorienes in the respiratory tract during infection with respiratory syncytial virus; role in obstructive airway disease. *Pediatric Res* 24:504-507
- 14) Ananaba G A, and Anderson L J. (1991) Antibody enchancement of respiratory syncytial virus stimulation of leukotriaene production by a macrophage like cell line. *G. Virol.* 65 (9):5052-5060
- 15) Schaechter M, Medoff G, Eisenten B I. (1993) Mechanisms of Microbial Diseases; Williams y Wilkins, Eds, USA.

- 16) Macintosh K. And Masters H. (1978) The immunologic response to infection with respiratory syncytial virus in infants. I. Infect. Dis, 138(1):24-34
- 17) McIntosh K. Halonen P. (1993) Report of a workshop on respiratory viral infections: epidemiology, diagnosis treatment and prevention. Clin. Inf. Dis. 16:151-164
- 18) Simoes E. (1999) Respiratory syncytial virus infection. The Lancet 354:847-52
- 19) Boletín semanal de la dirección general de epidemiología, SSA semana 52 año 2000
- 20) Southern, P. and Oldstone, MAB. (1986) Medical consequences of persistent viral infection. N Engl J Med 314:359-67
- 21) Ahmed R, Stevens JG. Viral persistence In: viral infections N Engl J. Med 315:939-48
- 22) Oldstone MAB, (1991) molecular anatomy of viral Persistence (Minireview) J. virol 65 (12): 6381,6386.
- 23) Domingo Sz, and Pierce SK (1992) Virus infection blocks the processing and presentation of exogenous antigen with the major histocompatibility complex class II molecules. Eur. J Immunol 22:2055-2062
- 24) Murphy PM (1993) Molecular mimicry and the generation of host defense protein diversity. Cell 72:823-826
- 25) McGrooch D.J, Cook S, Dolan A, Jamieson FE, Telford EAR. (1995) Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpes virus. J Mol Biol 247:443-58
- 26) Roux L, Simon AE, and Holland JJ. (1991) Effects of defective interfering viruses on virus replication and pathogenesis *In vitro* And *in vivo* Adv virus res. 40:181-211
- 27) Domingo E, Baranowski E, Carmen MRJ, Miartín AM and Escarmis C. (1998) Quasispecies structure and persistence of RNA viruses Emerg Inf Dis 4 (4):521-527
- 28) Jacobson S. and Pfau CJ. (1980) Viral pathogenesis and resistance to defective interferin particles Nature 283 (17): 311-13
- 29) Martín-Hernández A., Carrillo E., Sevilla N. & Domingo E. (1994). Rapid cell variation can determine the establishment of a persistent viral infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:3705-3709.
- 30) Krivitskaia VZ, Lakovleva NV. (1992) The characteristics of the humoral response to respiratory syncytial virus infection in adult patients with different form of bronchitis vopr. Virusol 37:146-9
- 31) Mills BG, Singer Fr, Weigner LP and Holst PA. (1981) Immunohistological demonstration of respiratory syncytial virus antigen in Peaget disease of bone. Proc. Natl Acad. Sci. USA 78:1209-13
- 32) Baldrige P and Senterfit LB. Persistent (1976) Infection of cells in culture by respiratory syncytial virus Proc Sci biol and med. 151:684-88
- 33) Pringle CR., Shirodaria PV., Cash P., Chiswell DJ. & Malloy P. (1978). Initiation and maintenance of persistent infection by RSV. Journal of Virology. 28 (1):199-211.
- 34) Fernie BF, Ford EC and Gerin JL. (1981) The development of Balb/C cells persistently infected with respiratory syncytial virus Presence of ribonucleoprotein on the cell surface Proc Sci biol and med 167:83-86

- 35) Bangham C. & McMichel AJ. (1986). Specific human cytotoxic T cells recognize B-cell lines persistently infected with RSV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 9183-9187.
- 36) Panuska JR, Cirino NM., Midulla F, Despot JE., McFadden ER. & Huang Y. (1990) Productive infection of isolated human alveolar macrophages by RSV. *Journal of Clin. Invest.* 174:173-184.
- 37) Hegele RG, Hayashi S, Bramley AM, and Hogg JC. (1994) Persistence of respiratory syncytial virus Genome and protein after acute bronchiolitis in ginea pigs. *Chest* 105(6), 1848-54
- 38) Semler BL. and Holland JJ. (1979) Persistent vesicular stomatitis virus infection mediates base substitutions in viral RNA termini. *J. of virol.* 32 (2): 420-28.
- 39) Lehtovarva P., Soderlund H., Keranen S., Pettersson R. F., Käriäinen L. (1981). 18S defective interfering RNA of Semliki Forest Virus contains a triplicated linear repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78(9): 5353-57.
- 40) Novella I., Domingo E. & Holland J. (1997). Rapid viral quasispecies evolution: implications for vaccine and drug strategies
- 41) Dimmock NJ. & Primrose SB., (1994). Introduction to modern virology, fourth ed. Blackwell science LTD.
- 42) Moscona A. & Peluso R., (1993). Persistent infection with of Human Parainfluenza virus type 3 in CV-1 cells analysis of the role of defective interfering particles *Virology* 194: 399-402.
- 43) Garcin D., De Melo M., Roux L., Kolakfsky D., and Curran J. (1994). Presence of a Truncated Form of the Sendai virus P protin in a Long-Term persistent infection: Implications for the Maintenance of the Persistent state. *Virology*. 201:19-25
- 44) Gian G., Kailash C., Gupta, and Kingsbury D. W. (1983). Genomic and Copy-back 3' termini in Sendai virus Defective Interfering RNA species JI of *Virology* 45(2): 659-664.
- 45) Whistler T., Bellini W., Rota P.,(1996). Generation of defective interfering particles by two Vaccine Strains of Measles virus. *Virology*. 220: 480-484
- 46) Murphy SK., Ito I. & Parks GD. (1998). A funtional antigenomic promoter for the paramyxovirus simian virus 5 requires proper spacing between an essential internal segment and the 3' terminus. *J. Virology*. 72 (1): 10-19.
- 47) Gian G., Exeen M., Morgan, and Kingsbury. (1985) Nucleotide sequences responsible for generation of internally deleted Sendai virus defective interfering genomes *Virology* 146:27-37.
- 48) Roux L. And Waldvogel Francis. (1981) Establishment of Sendai Virus persistent Infection: Biochemical analysis of the early phase of a standard plus defective interfering virus infection of BHK cells. *Virology* 112:400-410
- 49) Murphy D., Dimock K. & Kang Y. (1991). Numerous transitions in human parainfluenza virus 3 RNA recovered from persistently infected cells. *Virology* 181:760-763.
- 50) Bishnu P.De & Banerjee A. (1993). Rescue of synthetic analogs of genome RNA of human parainfluenza virus type 3. *Virology* 196:344-348.
- 51) Marschall M., Böswald C., Schuler A. & Youzbashi E. (1993). Productive and non productive phases during long-term persistence of influenza C virus. *J. of gen. Virology*. 74: 2019-2023.

- 52) Payment and Trudel M. (1993) *Methods and techniques in virology* Marcel Decker Inc New York.
- 53) Cline GB, Coates H, Anderson NG, Chanock RM and Harris WW. (1967) Respiratory syncytial virus isolation by combined continuous flow-Isopycnic banding centrifugation *J. of virol* 1 (4): 659-664
- 54) Treuhft, M. (1983). A colorometric assay for quantification of defective interfering particles of RSV. *Journal of General Virology*. 64:1301-1309.
- 55) Mayer R. J. Walker (1987) *JH Immunochemical Methods in cell and molecular biology*. London Academic Press Limited, 215-17
- 56) Garcia BB, Palomo C, Peñas C, Delgado T, Pérez BP, and Melero JA. (1989) Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F an G glico proteins *J. Virol* 63,925-32
- 57) Chomzaynsky P, Sacchi N. (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thocyonate-phenol-chloroform extraction. *Annal Biochem*. 162:156-159
- 58) Collins PL, Anderson K, Langer SJ and Werts GW (1985) Correct sequence for the mahor nucleocapsid protein mRNA of respiratory syncytial virus *Virol* 146:69-77
- 59) Kowal KJ and Stollar V. (1980) Differential sensitivity of infectious and defective-interfering particles of sindbis virus to ultraviolet irradiation *Virol* 103:149-157
- 60) Treuhft, M & Been M. (1982). Defective interfering particles of RSV. *Infection and immunity* 73:439-444.
- 61) Ray NB, Ewalt LC and Lodmell D (1995) Rabies virus replication in primary murine bone marrow macrophages and in human and murine macrophage-like cell lines: Implications for viral persistence *J. of Virol* 69(1): 764-772
- 62) Chen W. and Baric R., (1995). Function of a 5' -end genomic RNA mutation that evolves during persistent Mouse Hepatitis virus infection *in vitro* 69(12): 7529-7540.
- 63) Cummings PJ, Rinaldo CR (1989) Coevolution of virulent virus and resistant cells as a mechanism of persistence of Herpes Simplex virus type 1 in a human T lymphoblastoid cell line *J. gen Virol*.70: 97-106
- 64) Kirwood TBL. and Bangham CRM. (1994) Cycles, chaos, and evolution in virus cultures: a model of defective interfering particles *Proc Natl. Acad. Sci USA*. 91:8685-89
- 65) Calain P, Monroe MC. And Nichol ST. (1999) Ebola virus defective interfering particles and persistent infection *Virol*: 262 (1) 114-128
- 66) Li HO, Zhu YF, Asakawa M, Kuma H, Hiraata T, Ueda Y, Lee YS, Fuku Kato A, Nagai Y, Hasegawa M. (2000) A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai deficient gene transfer and expression, *Jvirol* 74(14) 6564-69
- 67) Clement N, Avalosse B, El Bakkouri K, Velu T Brandenburger A (2001), Cloning and sequencing of defective particles derived from the autonomous parvovirus minute virus of mice for the construction of vectors with minimal cis-Acting sequences. *J. Virol* 75 (3): 1284-93
- 68) King Ch Ch, de Fries R, Kolhekar S and Ahmed R (1990) *in vivo* selection of

- lymphocytic Choriomeningitis virus during persistent infection J. of Virol, 64(11): 5611-16
- 69) Sanchez G, Xu S, Chermann JC and Hirsch I(1997) Accumulation of defective viral genomes in peripheral blood mononuclear cells of human immunodeficiency virus type 1 infected individuals J. Virol 71 (3):2233-2240
- 70) Nüesch JPF, Chastonay J, Siegl G, (1989) Detection of defective genomes in Hepatitis A virus particles present in clinical specimens J. gen Virol /0:3475-80.
- 71) Sodhu; S. Croowlwy J, Lowenthal A, Karcher D, Menonna J, Cook S, Udem S, Dauling P (1994) Defective measles virus in human subacute sclerosing panencephalitis brain. Virology 202(2): 631-641