



11261 1

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**“EFECTO DEL ANTICUERPO ANTIVIRAL EN LA LOCALIZACION
Y CONCENTRACION DE LAS PROTEINAS DEL VIRUS SINCITIAL
RESPIRATORIO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(MICROBIOLOGIA)

P R E S E N T A
BIOL. ENRIQUE HERNANDEZ HERNANDEZ

ASEROR: DRA BEATRIZ GOMEZ-GARCIA

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.

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado de manera muy especial y cariñosamente a tres grupos de personas:

A mi esposa **Miriam Balderas Herrera** y a mi pequeño hijo **Enrique David Hernández Balderas** a quienes amo con todas mis fuerzas y porque en ellos tengo uno de los grandes tesoros que me ha dado Dios.

A mi madre la señora **Eustolia Hernández Becerril**, a mis hermanos **Alberto, Andrea, Agustín, Julio, Jesús y Nora**; a quienes respeto y amo entrañablemente; y porque sin su ayuda no hubiese podido alcanzar mis metas.

A la memoria de tres hombres quienes me han marcaron de forma muy importante la senda y los pasos que debo seguir en esta vida: mi padre el señor **Silvestre Hernández Reyes**, mi hermano **David Hernández Hernández** y mi abuelo **Enrique Hernández Becerril**; en donde se encuentren gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca proporcionada para los estudios de maestría.

A la DGAPA proyecto IN207296 “Mecanismos de protección en *S. schenkii* hacia ambientes generadores de radicales” por la beca otorgada para la culminación de la parte experimental de esta tesis.

Al PUIS proyecto 2226-241-27 VII-90 “Análisis de la variabilidad genética del virus sincitial respiratorio por técnicas de biología molecular y formación de recursos humanos en virología” por la beca otorgada para la culminación de la parte experimental de esta tesis.

A la **Dra. Beatriz Gómez-García** por su dirección, consejos y experiencia transmitida para la realización de este trabajo.

Al comité tutorial compuesto por la **Dra. Beatriz Gómez-García**, el **Dr. Enrique Ortega Soto** y el **Dr. Guillermo Alfaro Martínez** por sus críticas y recomendaciones realizadas en la parte experimental.

Al jurado compuesto por el **Dr. Patricio Gariglio Vidal**, el **Dr. Luis Padilla Noriega**, a la **Dra. Beatriz Gómez-García**, al **Dr. Guillermo Alfaro Martínez** y al **Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva** por sus críticas y sugerencias emitidas en el escrito final, las cuales enriquecieron el trabajo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio **Rocio Tirado**, **Rosa Elena Sarmiento**, **Mirza Romero**, **Ma. Antonieta Guerrero**, **Rosalino Vázquez**, **Jesús Núñez** e **Ignacio Palacios** por su invaluable ayuda en todo momento, pero sobre todo por su valiosa amistad.

A **Gabina Arenas** (fotos de inmunofluorescencias), **Carlos Castellanos** (captura de datos de citometría de flujo), **Rita Flores** (escaneo de imágenes) por su ayuda en la parte técnica y **Herlinda Mejía** por sus observaciones en la ortografía y redacción del escrito final.

A todos los **compañeros y amigos** del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina quienes siempre estuvieron dispuestos a colaborar.

A mis compañeros del InDRE: **Irma**, **Rita**, **Miguel**, **Herlinda**, **Verónica**, **Graciela**, **Gisela**, **Elbia**, **Gloria**, **Cecilia** y **Rosario**; quienes han estado muy interesados en este trabajo.

A nuestra máxima casa de estudios, la **Universidad Nacional Autónoma de México** por otorgarme el gran honor de formar parte de su diversa comunidad.

INDICE GENERAL

| | | |
|-------|---|----|
| 1.1 | Resumen (español) | 1 |
| 1.2 | Resumen (inglés) | 2 |
| 2 | Introducción | 3 |
| 2.1.1 | Generalidades del RSV | 3 |
| 2.1.2 | Epidemiología | 3 |
| 2.1.3 | Estructura viral | 4 |
| 2.1.4 | Proteínas del RSV y su función | 7 |
| 2.1.5 | Ciclo replicativo | 8 |
| 2.1.6 | Respuesta inmune a la infección por RSV | 9 |
| 2.2 | Generalidades de infecciones virales persistentes | 10 |
| 2.2.1 | I Evasión de la respuesta inmune | 12 |
| 2.2.2 | II Replicación no citolítica | 12 |
| 2.3 | Estudios de persistencia del RSV in vivo e in vitro | 12 |
| 2.4 | Modulación del antígeno viral por el anticuerpo antiviral | 13 |
| 2.5 | In vitro | 13 |
| 2.5.1 | Sarampión | 13 |
| 2.5.2 | Rubéola | 14 |
| 2.5.3 | Pseudorabia | 15 |
| 2.5.4 | Influenza | 15 |
| 2.5.5 | Parainfluenza | 16 |
| 2.5.6 | Varicela Zoster | 16 |
| 2.6 | In vivo | 17 |
| 3 | Hipótesis | 19 |
| 4 | Objetivos | 19 |
| 5 | Métodos | 20 |
| 5.1 | Mantenimiento de líneas celulares | 20 |
| 5.2 | Propagación del virus | 20 |
| 5.3 | Titulación del virus | 21 |
| 5.4 | Purificación del virus por gradiente de sacarosa | 22 |
| 5.5 | Obtención de suero anti-RSV | 23 |
| 5.6 | Cuantificación del título de anticuerpos neutralizantes | 23 |
| 5.7 | Purificación de la fracción Ig-G del suero por columna | 24 |
| 5.8 | Obtención de extractos celulares | 24 |
| 5.9 | Inmunoblot | 25 |
| 5.10 | Inmunofluorescencia indirecta | 26 |
| 5.11 | Citometría de flujo | 27 |
| 6 | Resultados | 28 |
| 6.1 | Cinética de infección | 28 |
| 6.2 | Detección de antígenos virales en células incubadas con suero anti-RSV | 29 |
| 6.3 | Efecto de anticuerpos anti-RSV en la distribución de los antígenos virales | 31 |
| 6.4 | Cuantificación de los antígenos virales en la membrana celular por ensayos de citometría de flujo | 33 |
| 6.5 | Determinación de las proteínas virales por ensayos de inmunotransferencia | 38 |

| | | |
|-----|---|----|
| 6.6 | Determinación de la concentración de los antígenos virales en tres distintas fracciones celulares | 38 |
| 6.7 | Inmunotransferencia de células infectadas e incubadas con suero anti-RSV: efecto de la dosis del suero anti-RSV | 40 |
| 6.8 | Análisis densitométrico del ensayo de inmunotransferencia | 42 |
| 7 | Discusión | 44 |
| 8 | Conclusiones | 50 |
| 9 | Apéndice | 51 |
| 10 | Bibliografía | 55 |

1.1 RESUMEN

En este trabajo se realizó la incubación con suero policlonal contra el virus sincitial respiratorio (anti-RSV) de células HEp-2 infectadas con el RSV, para analizar si los anticuerpos antivirales tiene la capacidad de inducir cambios en la distribución de los antígenos virales presentes en las células infectadas y si la interacción antígeno-anticuerpo puede ocasionar una alteración en la concentración de antígenos virales presentes en las células infectadas. Las células HEp-2 se infectaron con el RSV a MOI de 1; y se encontró que los antígenos virales se encontraban abundantemente a partir de las 6 horas *post*-infección, razón por la cual se inició la incubación con el suero antiviral 6 horas después de la infección. Los tiempos de incubación con el suero fueron cortos (10 y 20 minutos) o largos (6 horas). Las determinaciones de los antígenos virales se realizaron por inmunofluorescencia, citometría de flujo (FACS) e inmunotransferencia. Los resultados obtenidos en estos ensayos muestran que previo a la incubación con el suero, los antígenos virales presentaban una distribución homogénea y abundante en las células infectadas. Después de la incubación por tiempos cortos (10 y 20 minutos) los antígenos virales mostraron una disminución en su intensidad y además una redistribución hacia la periferia de las células visualizándose únicamente en uno de los polos. Por otra parte a la 6 horas de incubación se observó una reducción de prácticamente el 50% de los antígenos virales de membrana. Por ensayos de inmunotransferencia, se comprobó que la concentración de los antígenos virales obtenidos de extractos celulares fue inversamente proporcional a la concentración de anticuerpo utilizado en la incubación. Cuando se incubó con una alta concentración de anticuerpos se observó la desaparición de tres proteínas virales. Estos resultados indican que el anticuerpo antiviral tiene la capacidad de modificar drásticamente la distribución y concentración de los antígenos virales.

SUMMARY

The effect of anti-respiratory syncytial virus (RSV) polyclonal serum on Hep-2 infected cells was studied through analyzing the concentration cell-viral antigen and its distribution in the cell. Hep-2 cells were infected at multiplicity of 1.0 and after 6 hours post-infection were incubated with the anti-RSV serum at two different time periods: short (10 or 20 minutes) and long (6 hours). The obtained data by indirect immunofluorescence showed that after 10 minutes of incubation the plasma-membrane bound viral antigens were condensed in clusters (patches). By prolonging the incubation for 20 minutes the patches moved to one side of the cell forming caps. When the incubation was done for a longer time (6 h) a significant decrease on fluorescence intensity was observed with respect to the controls, mock infected cells and infected cells incubation with pre-immune serum, furthermore no caps were detected. The presence of viral proteins after the longer incubation was searched in cells extracts by Western blot, the obtained results showed a decrease on viral protein with apparent molecular weight of 200, 90 and 70 kDa, wich might correspond to the L, G and F viral proteins. Moreover, the densitometric analysis of the Werstern blot showed a linear correlation between concentration of the viral proteins and used serum, at higer concentration of the serum lower protein concentration. That result was congruent with the observation obtained by FACS, where the mean of the fluorescence intensity was reduced in 50% in the infected cells when compared with the controls.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 GENERALIDADES DEL RSV

2.1.1 EPIDEMIOLOGÍA

El Virus Sincitial Respiratorio (RSV) pertenece al orden mononegavirales, familia Paramixoviridae y es el prototipo del género Pneumovirus. A nivel mundial al RSV se le considera como el agente etiológico más importante de las infecciones severas del tracto respiratorio inferior en niños menores de dos años, presentándose la más alta incidencia entre los 6 y los 9 meses; y se le asocia con bronquitis, bronquiolitis y neumonías severas que requieren hospitalización (1, 2, 3). También se ha reportado asociación entre infección por RSV en la niñez y problemas pulmonares posteriores, así como con bronquitis crónica. En personas mayores produce infecciones que pueden ser mortales. Las reinfecciones son comunes en todas las edades y la *prima* infección no previene contra infecciones posteriores (4, 5).

Dos principales subgrupos antigénicos, designados A y B han sido descritos para el RSV; las diferencias entre los dos subgrupos están basadas en ensayos de neutralización *in vitro* con suero hiperinmune obtenido en conejos y patrones de reactividad con anticuerpos monoclonales (6, 7). Estos ensayos han demostrado que el dimorfismo antigénico es atribuido principalmente a la variación en la glicoproteína G, siendo el dominio extracelular de esta proteína la región con más alta divergencia de 93-99% (8, 9, 10, 11).

Las epidemias por RSV se presentan anualmente con una estacionalidad bien definida; en los países de climas templados se inicia en el otoño y termina en la primavera, durante el verano no es posible aislar el virus; en los países tropicales se presenta durante la

temporada de lluvias, este comportamiento se repite anualmente, por lo cual se puede mencionar que las infecciones por RSV son predecibles (12).

Entre las enfermedades infecciosas en México, las infecciones respiratorias agudas son la principal causa de mortalidad en infantes por lo cual constituyen un problema de salud; ya que en el año 2000, según la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud se reportaron 22,803,275 casos en toda la población (13). Estos datos unidos al hecho de que el mayor número de casos de neumonía y bronquitis coinciden con las estaciones del año en las cuales se reporta la incidencia más alta del RSV en los países templados, sugiere que el RSV puede ser el responsable en un buen porcentaje de estas infecciones; cabe mencionar que en la gran mayoría de las enfermedades de las vías respiratorias los agentes etiológicos no se logran aislar.

La Organización Mundial de la Salud estima que a nivel mundial ocurren 12.2 millones de muertes anuales en niños menores de 5 años, y las infecciones agudas del tracto respiratorio inferior son la tercer causa de estos decesos, siendo *Hemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y RSV los principales responsables de estas infecciones. Además se ha comprobado que en países no industrializados (Argentina, Colombia, Guatemala, Kenya, Nigeria, Pakistán, Tailandia y Uruguay) las infecciones agudas del tracto respiratorio en niños son ocasionadas en un 70% por el RSV (14).

2.1.2 ESTRUCTURA VIRAL

El RSV es pleomórfico, su tamaño oscila entre los 150-300 nm de diámetro, el material genético codifica para diez proteínas designadas con las letras F, G, SH, N, P, L, M, M2, NH1 y NH2 (Fig. 1). El virión tiene una envoltura lipídica de la cual sobresalen en forma de espículas, las glucoproteínas virales implicadas en la unión y penetración del virus a la

célula huésped (F, G y SH). Debajo de la envoltura del virus se encuentra la nucleocápside, estructura que rodea y recubre el ácido nucleico viral; la nucleocápside se encuentra formada por tres proteínas N, P y L. Las proteínas, M y M2, constituyen la matriz, estructura que permite la interacción de la envoltura y la nucleocápside (15, 16, 17).

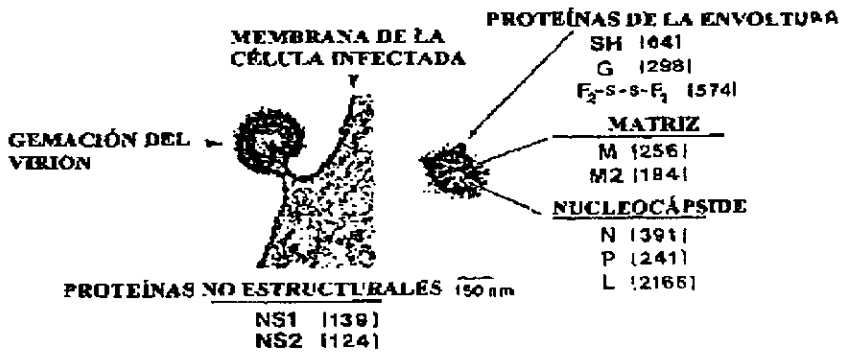


Figura 1. Fotomicrografía electrónica de gemación (izquierda) y virión libre (derecha) del RSV. Los números de los entre corchetes indican el número de residuos de aminoácidos de cada proteína. (Tomado de Fields, 1996)

El genoma del RSV es RNA monocatenario, no segmentado de polaridad negativa; el orden de transcripción de las diez proteínas es: 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'. Las dos primeras proteínas son no estructurales y las ocho restantes se encuentran presentes en la partícula viral. El RNA viral tiene secuencias específicas de paro-inicio, al final y principio de cada uno de los genes, es decir en las regiones intergénicas; el tamaño de estas regiones es de 1-52 nucleótidos. El gen L presenta la característica de que sus primeros 68 nucleótidos se encuentran dentro del gen M2, por lo que el final del gen M2 y el comienzo del gen L se encuentran sobrelapados (Fig. 2). El RNA presenta regiones reguladoras que

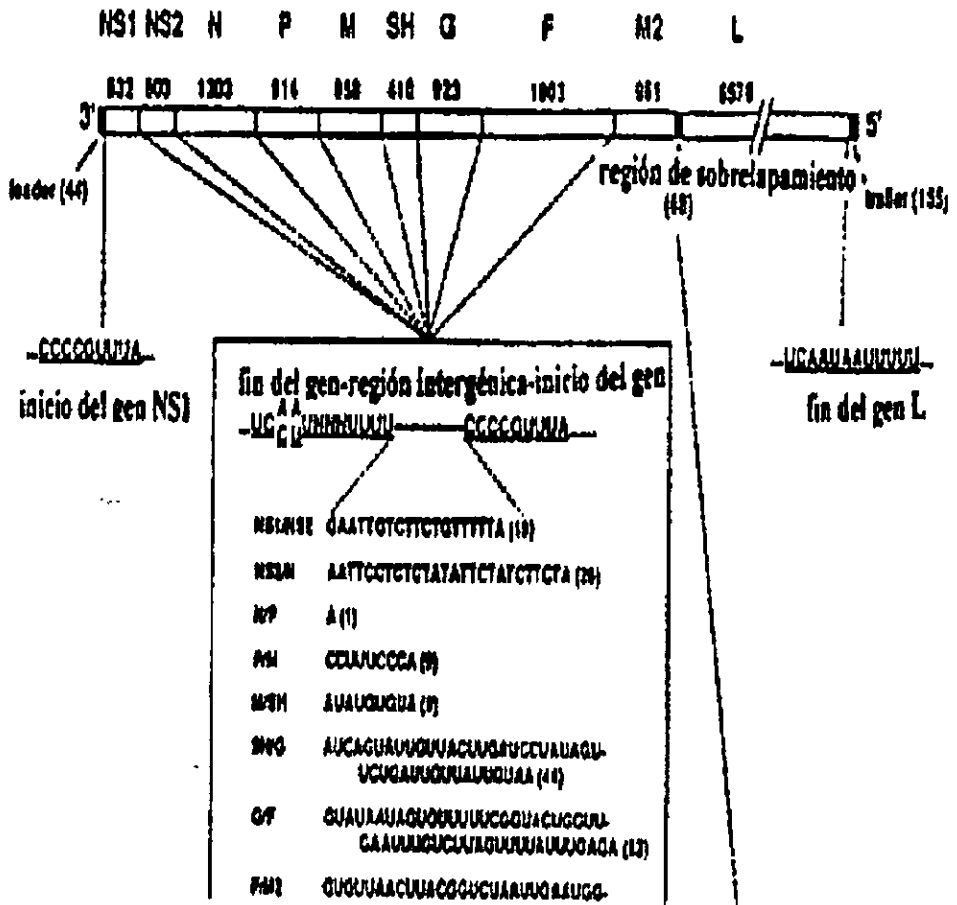


Figura 2. Mapa genético del RNA genómico del RSV(A2). El número debajo de cada gen indica el tamaño de nucleótidos del gen completo (Tomado de Fields, 1996).

son importantes para la transcripción y replicación del genoma viral: el promotor, región "líder" al extremo 3' y región "trailer" al extremo 5' (18, 19 y 20).

2.1.3 PROTEÍNAS DEL RSV Y SU FUNCIÓN

De las ocho proteínas estructurales del RSV, tres son glucoproteínas (G, F y SH) y junto con la membrana lipídica forman la envoltura del virus.

La proteína G está constituida por 298 aminoácidos, el peso molecular de la proteína madura es de 90 kDa, mientras que la forma inmadura tiene un peso molecular de 30-40 kDa. La diferencia en el peso molecular se debe a que la proteína madura se encuentra altamente glucosilada. La proteína G es el antígeno más divergente entre los dos subgrupos del RSV (A y B) y su principal función es la de unir al virus con la célula huésped. Esta proteína tiene el dominio citoplasmático, el transmembranal y el extracelular; los dos primeros se encuentran altamente conservados en los dos subgrupos, mientras que el extracelular presenta una alta divergencia; la única región conservada en este dominio es la comprendida entre los aminoácidos 164 y 176, el hecho de que esta región no presente variación en su secuencia de aminoácidos permite especular que sea el posible sitio de unión al receptor celular y/o que tenga una función estructural importante en la conformación tridimensional de la proteína (21, 22, 23, 24).

La proteína F está formada por una cadena de 574 aminoácidos, tiene un peso molecular de 70 kDa cuando se encuentra glucosilada y forma espículas en la envoltura del virus junto con las proteínas G y SH. Es sintetizada como un precursor F0 de 63 kDa el cual es glucosilado y posteriormente hidrolizado por una proteasa celular para formar dos subunidades F1 (50 kDa) y F2 (20 kDa) que están unidas por un puente disulfuro. La proteína F presenta cinco dominios que de región amino a región carboxilo son: el péptido señal, el de unión de las dos subunidades, el de fusión de membranas, el dominio transmembranal y el dominio citoplásmico. La función de la proteína F es la de fusionar la envoltura viral con la membrana celular y la de formación de sincicios (25, 26, 27, 28).

La proteína SH es una proteína integral de la envoltura viral, está formada por 64 aminoácidos, el peso molecular de la forma madura es de 21 kDa y la forma no glucosilada es de 7.5 kDa. Consta de tres dominios: intracelular, transmembranal y extracelular; el único dominio que presenta alta divergencia entre los dos subgrupos es el extracelular. La función exacta de esta proteína se desconoce, pero por su carácter de proteína de la envoltura y su composición glucosídica pudiera estar participando en la unión celular, penetración, fusión y/o en la morfogénesis del virión (29,30).

La nucleocápside viral está formada por tres proteínas L, N y P. La proteína L de 2,165 aminoácidos y con peso molecular de 250 kDa tiene actividad de polimerasa viral. La proteína N de 391 aminoácidos y con peso molecular de 43 kDa, se mantiene estrechamente unida al RNA genómico. La proteína P de 241 aminoácidos y de 27 kDa es una fosfoproteína y tiene dos funciones, servir como factor en la transcripción y replicación de la partícula viral y además como chaperona para la proteína L (31,32, 33).

El RSV presenta dos proteínas de matriz M y M2 de 256 y 194 aminoácidos, con pesos moleculares de 28 y 22 kDa respectivamente. Las funciones de estas dos proteínas es de mantener la nucleocápside transcripcionalmente inactiva antes del empaquetamiento y permitir la interacción entre la nucleocápside y la envoltura viral (34, 35).

Las últimas dos proteínas son las no estructurales NS1 y NS2 con peso molecular de 15 y 14 kDa, y de 139 y 124 aminoácidos respectivamente, se desconoce su función, pero debido a su carácter de proteínas no estructurales pudieran estar regulando la síntesis del RNA viral y/o la maduración de la partícula viral (36).

2.1.4 CICLO REPLICATIVO

El ciclo replicativo del virus comienza con la unión de la partícula viral a la célula huésped, este evento está mediado por la proteína G, el receptor celular se desconoce (37). Una vez

unida la partícula viral a la célula huésped se lleva a cabo la fusión de la envoltura viral a la membrana celular (38). Posteriormente la nucleocápside es liberada al citoplasma. La síntesis de los diez RNAm, los cuales se sintetizan en forma individual, se lleva a cabo por un mecanismo secuencial en el cual la polimerasa viral reconoce las secuencias de paro e inicio ubicadas en las regiones intergénicas, una vez que la polimerasa reconoce estas secuencias libera el RNA recién sintetizado. Para la replicación del RNA viral, la polimerasa viral utiliza como molde el RNA genómico y sintetiza un RNA de polaridad positiva o antígenómico, el cual servirá como molde para la síntesis del genoma viral, para este proceso se requiere que las proteínas N, L y P bloqueen las señales de paro e inicio ubicadas en las regiones intergénicas (20).

Los RNAm y las proteínas son detectados a partir de las 4-6 horas *post*-infección, el máximo de la síntesis de los RNAm se presenta a las 16 horas *post*-infección y el de las proteínas es entre las 18-20 horas. La concentración de cada proteína parece estar determinada por la abundancia de cada RNAm, la abundancia relativa de cada RNAm decrece entre la distancia del promotor y el gen. El proceso de ensamblaje de la partícula viral, se inicia cuando la proteína N se une al RNA genómico y forma una estructura helicoidal, a la cual se unen posteriormente las proteínas P y L. La proteína G, F y SH migran a la membrana celular, que es el sitio en el cual el virus adquiere su envoltura. El ensamble entre la envoltura y la nucleocápside está dirigido por las proteínas de matriz, y es de esta forma en la que queda conformada una partícula viral (39, 40).

2.2 RESPUESTA INMUNE A LA INFECCIÓN POR RSV

La respuesta inmune originada por RSV es permanente pero no protectora, las reinfecciones son frecuentes aún en presencia de altos títulos de anticuerpos neutralizantes.

Los resultados de la respuesta inmune a la infección por RSV en humanos así como en modelos experimentales (rata de algodón y ratón) son contradictorios. Algunas observaciones indican que la respuesta inmune es protectora, en cambio otras sugieren que causa daño, principalmente en el pulmón y esto es válido tanto para la respuesta inmune humoral como para la celular (41, 42).

Las observaciones que indican que la respuesta inmune tiene un efecto protector son: 1) los anticuerpos antivirales IgM, IgG e IgA confieren a infantes protección parcial contra las reinfecciones, 2) la eliminación del virus requiere una respuesta inmune efectiva, de lo contrario el organismo no elimina el virus, como se ha observado en pacientes inmunodeprimidos; y 3) en modelos experimentales con ratón y rata de algodón se ha reportado que linfocitos CD8 participan en la eliminación del RSV. Entre las observaciones que implican a la respuesta inmune como responsable de la patología se tiene: 1) niños que fueron inmunizados con una vacuna inactivada en los años 60's, en la reinfección presentaron cuadros más severos que los niños que no fueron vacunados, 2) en modelos experimentales se ha reportado que linfocitos T (CD4) favorecen la severidad de la enfermedad y el daño pulmonar (43, 44).

2.3 GENERALIDADES DE LAS INFECCIONES VIRALES PERSISTENTES

Las infecciones virales se presentan en forma aguda o persistente, en la enfermedad aguda el cuadro clínico es evidente, la respuesta inmune del huésped controla la multiplicación del virus, los signos y síntomas desaparecen y posiblemente se elimina el agente infeccioso. En cambio en las infecciones persistentes la desaparición de los signos y síntomas no va acompañado de la eliminación del agente infeccioso, el virus permanece en el organismo a pesar de que el huésped responde a la infección y por lo general la respuesta inmune es

permanente. Las infecciones virales persistentes, a diferencia de las agudas donde el virus permanece por corto tiempo en el organismo, favorecen los daños patológicos por tiempos prolongados (45,46).

En los últimos años se ha incrementado el interés en estudiar las infecciones virales persistentes debido a que actualmente se cuenta con técnicas altamente sensibles para detectar los ácidos nucleicos y proteínas; y con estas metodologías se encontraron virus o sus huellas en pacientes con enfermedades crónicas o degenerativas cuya etiología se desconoce, sugiriendo así que los virus pueden ser los agentes etiológicos de enfermedades de esa índole.

Para que un virus permanezca por largos periodos de tiempo en el organismo es indispensable que la infección viral no sea citopática, que el genoma viral permanezca en la célula infectada y que evada la respuesta inmune del huésped. Para que la persistencia se establezca y se mantenga es indispensable que exista un balance entre la expresión del genoma viral y la sobrevivencia de la célula. Algunos virus de DNA y RNA que ocasionan enfermedades con cuadros agudos pueden originar infecciones persistentes (47).

El mecanismo que permite al virus permanecer en un organismo que normalmente controla la multiplicación viral es complejo. El modelo ampliamente estudiado es el del ratón infectado con el virus de linfocoriorio meningoencefalitis (LCMV), a través de estos estudios se ha demostrado que para establecer y mantener la infección persistente, tanto el virus como la célula se modifican. El virus atenúa su infectividad y la célula altera sus funciones principalmente las no indispensables para su supervivencia, las denominadas de lujo, es decir los virus pueden infectar y permanecer en células sin destruirlas, pero producen cambios alterando las funciones y actividades específicas de cada tipo celular (48, 49).

Algunos de los mecanismos implicados en el establecimiento de las infecciones persistentes son:

2.3.1 Evasión de la respuesta inmune

- A) Eliminación de los antígenos virales de la superficie de células infectadas
 - 1.- Modificación de la expresión de proteínas virales como respuesta a la actividad antiviral de los anticuerpos induciendo “capping” (redistribución de los antígenos virales) y modulación de la expresión de los genes virales.
 - 2.- Abatimiento en la expresión de los antígenos virales de la envoltura.
 - 3.- Alteración de la expresión de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
- B) Alteración de las funciones del timo por infección del timo durante el desarrollo del sistema inmune (tolerancia).
- C) Alteración por infección del sistema inmune periférico
 - 1.- Inmunosupresión generalizada
 - 2.- Inmunosupresión selectiva.

2.3.2 Replicación no citolítica

- A) Generación de variantes virales
 - 1.- Partículas virales defectuosas.
 - 2.- Mutantes termosensibles.

2.4 ESTUDIOS DE PERSISTENCIA DEL RSV *IN VIVO* E *IN VITRO*

La persistencia del RSV en humanos no está demostrada, sin embargo existen evidencias circunstanciales que lo sugieren: 1) los virus de la misma familia establecen infecciones persistentes en humanos, 2) se tienen reportes que permiten asociar a la persistencia del

RSV con cuadros de bronquitis crónica y con la enfermedad de Paget, 3) el RSV persiste en pacientes con inmunodeficiencias adquiridas (SIDA) y congénitas. Finalmente la modulación antigénica inducida por el anticuerpo se podría sugerir como uno de los posibles mecanismos que favorecen la persistencia del RSV (50, 51, 52).

2.5 MODULACIÓN DEL ANTÍGENO VIRAL POR EL ANTICUERPO ANTIVIRAL.

La modulación de los antígenos por el anticuerpo puede definirse como el mecanismo por el cual la presencia de los antígenos virales (internos o externos) son extruidos y/o endocitados de las células infectadas por la incubación con anticuerpos antivirales específicos.

Se tienen reportes de este fenómeno tanto *in vivo* como *in vitro*. Los resultados obtenidos en virus de RNA y DNA pertenecientes a las familias Paramixoviridae, Togaviridae, Ortomixoviridae, Coronaviridae, Herpesviridae y Parvoviridae pueden resumirse en la siguiente forma.

2.6 IN VITRO:

2.6.1 SARAMPIÓN: Con este virus existen reportes en la línea celular HeLa y en células neuronales de rata persistentemente infectadas.

Células HeLa.

1) En células HeLa infectadas e incubadas con anticuerpos policlonales se reporta disminución de la expresión de las proteínas virales de la envoltura (F y H) y de la nucleocápside (P y M); estos resultados se obtuvieron en ensayos de pulso y caza, marcando metabólicamente las proteínas con metionina radiactiva. Este mismo efecto se observó al incubar las células HeLa infectadas con anticuerpos monoclonales contra la

proteína H y marcando las proteínas con metionina; no se reporta la incubación con anticuerpos monoclonales contra otras proteínas (53, 54, 55, 56).

Células Neuronales.

2ª) En células neuronales persistentemente infectadas la expresión de todas las proteínas virales disminuyó al incubar con anticuerpos policlonales, esto se observó al marcar las proteínas con metionina radioactiva.

2b) El efecto del anticuerpo se revertió eliminándolo del medio, de esta forma todas las proteínas virales se expresaron nuevamente.

2c) Cuando el cultivo persistente se incubó con nueve diferentes anticuerpos monoclonales contra la proteína H, todos provocaron “capping”, y sólo dos de ellos ocasionaron la disminución en la expresión de todas las proteínas virales. El reporte no menciona la especificidad de los diferentes anticuerpos monoclonales (57, 58).

2.6.2 RUBEOLA

En rubéola se han reportado estudios en células humanas de origen linfocítico infectadas en forma aguda y en cultivos de células Vero infectadas persistentemente.

En células linfocíticas: Se ha observado una inhibición total en la síntesis de proteínas virales cuando las células linfocíticas infectadas se trataron con suero policlonal, además, no se detectó virus infeccioso en forma intra o extracelular. La transcripción viral no se afectó, ya que el RNAm viral se acumuló en la célula durante el tiempo que duró el tratamiento; al eliminar el suero anti-viral del cultivo se reanudó la síntesis de proteínas virales (59).

En células Vero:

En células Vero persistentemente infectadas e incubadas con suero policlonal los RNAm virales se acumularon durante este tiempo y no se obtuvo virus infeccioso durante el tiempo

que duró la incubación con el suero, y al eliminar el suero del cultivo se detectaron nuevamente los virus, aunque con menor efecto citopático que el obtenido normalmente del cultivo persistente, pero el tratamiento con el anticuerpo no logro “curar” el cultivo (60).

2.6.3 PSEUDORABIA

En células de riñón de cerdo (SK-6) infectadas con el virus e incubadas con sueros antivirales, se encontró que el 47% de las células infectadas presentaron “capping” de todos los antígenos virales de la membrana celular; y en el 30% de las células que presentaron capping los antígenos virales fueron extruidos al espacio extracelular a las 2 horas después de la incubación con el suero. En estas mismas células no se lograron detectar antígenos virales después de la expulsión de los antígenos. Por otra parte, se comprobó que mutaciones en los dominios citoplasmáticos de las glucoproteínas virales E y I, que son responsables de la unión y penetración de la partícula viral a la célula y que se encuentran abundantemente expresadas en la superficie celular, disminuyen significativamente el porcentaje de células que presentan “capping” (61).

2.6.4 INFLUENZA

Se estudio el papel que tiene el dominio citoplasmático de la hemaglutinina (HA) del virus de influenza en la redistribución de los antígenos virales de membrana por la acción de la incubación con anticuerpos específicos. El dominio citoplasmático de la hemaglutinina fue truncado y está proteína fue expresada en células HeLa por el virus de vaccinia. Los resultados indican que en las células con la proteína truncada se disminuyó siete veces la frecuencia de células que presentan capping en comparación con las células que tenían la proteína completa (62).

2.6.5 PARAINFLUENZA

En un estudio semejante al de influenza se analizó el papel del dominio citoplásmico de la glucoproteína de fusión (F) del virus de parainfluenza en la redistribución de los antígenos virales de membrana por la acción de la incubación con anticuerpos específicos. El dominio citoplásmico de esta glucoproteína fue truncada y expresada en células CV-1 por el virus de vaccinia. Los resultados indican que en células con la proteína truncada se observa un decremento en el porcentaje de células que presentan “camping” comparándolas con las células que llevan la proteína completa (63).

2.6.6 VARICELA ZOOSTER

Células MRC-5 infectadas con el virus de varicela fueron incubadas con anticuerpos monoclonales contra las glucoproteínas I y II, las cuales son abundantemente expresadas en la superficie de la membrana celular, ambos tratamientos ocasionaron la modificación en la distribución de los antígenos virales, no sólo de la membrana celular sino también en el citoplasma; sin embargo estos anticuerpos no evitaron el efecto lítico de la infección. En otro estudio realizado con células de melanoma humanas infectadas con varicela e incubadas con anticuerpos monoclonales contra la glucoproteína gp II inhibió completamente la formación del efecto citopático, además bloqueo la formación de la progenie viral y eliminó los antígenos virales de la membrana celular. Cuando el anticuerpo monoclonal fue eliminado del cultivo se reanudo la expresión de los antígenos virales en la membrana celular, el cultivo produjo progenie viral infecciosa y las células mostraron el efecto citopático característico del virus (64, 65).

2.7 *IN VIVO*

a) En ratones infectados con el virus del sarampión tratados con anticuerpos policlonales o monoclonales contra la proteína H, se encontró que ambos tratamientos redujeron en un 80% la mortalidad de los ratones, disminuyeron la cantidad de antígenos virales detectados en cerebro y además, inhibieron en un 90% la transcripción de los RNAm virales principalmente de las proteínas F y H (66, 67).

b) Ratones infectados con el virus de Influenza A y sometidos a un tratamiento con anticuerpos monoclonales contra la proteína M₂, se reportó que el anticuerpo redujo 100 veces el título viral en pulmón y fosas nasales, siendo que en los controles estos tejidos presentan altos títulos virales (68). La proteína M₂ se encuentra presente abundantemente en la superficie de las células infectadas.

c) En ratones infectados con virus Sindbis y sometidos a tratamiento con suero policlonal, se logró eliminar el virus infeccioso de la médula espinal y del cerebro; además se redujo en 90% la concentración de los RNAm virales en estos tejidos. Posteriormente al someter a estos ratones infectados a un tratamiento por tres meses con anticuerpos monoclonales contra la glicoproteína E₂ de la envoltura viral (implicada en la virulencia), se logró disminuir dramáticamente el nivel del RNA viral del cerebro. Sin embargo por ensayos de RT-PCR fue posible detectar RNAm viral lo que sugiere que el genoma viral es capaz de mantenerse en los ratones a concentraciones mínimas cuando son tratados con altas concentraciones de anticuerpos monoclonales(69).

d) Ratones tratados con anticuerpos monoclonales contra la proteína E₂ de la envoltura del virus de la hepatitis murina y posteriormente infectados con el virus, se encontró que el anticuerpo protegió a los ratones de la enfermedad letal, no obstante no fue capaz de

bloquear la infección, pero sí logró disminuir el título viral en hígado y cerebro que son tejidos en donde animales control presentaron altos títulos de virus infeccioso (70).

e) Finalmente en visones infectados con un parvovirus, que ocasiona la enfermedad de los visones de las Aleutianas; y sometidos a un tratamiento con cuatro diferentes anticuerpos monoclonales contra proteínas estructurales, se encontró que el tratamiento con los anticuerpos redujo en un 75% la mortalidad de los animales, disminuyó la sintomatología, previno la infección aguda pero no la crónica, redujo los niveles de RNAm virales pero no afectó la duplicación del DNA (71, 72, 73).

Todos estos reportes realizados tanto *in vivo* como *in vitro* sugieren que el anticuerpo puede ser considerado como un factor importante en la evasión de la respuesta inmune en algunas infecciones virales; ya que es capaz de: a) disminuir la mortalidad de los individuos infectados, b) reduce la severidad de la enfermedad, c) evita la infección aguda pero no la crónica, d) inhibe la traducción de RNAm virales, e) mantiene el genoma viral en forma no productiva, y f) redistribuye los antígenos virales de la membrana celular.

Partiendo de estos antecedentes, en este trabajo se plantea estudiar el efecto del suero anti-RSV en células HEP-2 infectadas con el RSV, con la finalidad de determinar si este fenómeno de modulación antigénica se presenta con este virus, por lo cual se estudiará si la interacción antígeno-anticuerpo altera la concentración de las proteínas virales y/o modifica la distribución de los antígenos en la membrana de la célula infectada.

3. HIPÓTESIS:

LA INTERACCIÓN DE LOS ANTIGENOS DEL RSV PRESENTES EN LA MEMBRANA CELULAR CON ANTICUERPOS POLICLONALES ANTIVIRALES ALTERA LA CONCENTRACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS ANTIGENOS VIRALES PRESENTES EN LAS CÉLULAS.

4. OBEJETIVO GENERAL:

ANALIZAR EL EFECTO DE INCUBAR CON SUERO POLICLONAL ANTI-RSV CÉLULAS QUE PRESENTAN ANTÍGENOS DEL RSV EN LA MEMBRANA CELULAR, EN LA DISTRIBUCIÓN Y CONCENTRACIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES PRESENTES EN LAS CÉLULAS INFECTADAS.

4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

ANALIZAR EL EFECTO DE INCUBAR CÉLULAS QUE PRESENTAN ANTÍGENOS DEL RSV CON SUERO POLICLONAL EN LA DISTRIBUCIÓN DE LOS ANTÍGENOS VIRALES PRESENTES EN LAS CÉLULAS.

DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN OPTIMA DE ANTICUERPO ANTI-RSV REQUERIDA PARA OBSERVAR CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE LAS PROTEÍNAS VIRALES PRESENTES EN EXTRACTOS DE CÉLULAS INFECTADAS POR RSV.

CUANTIFICAR ANTIGENOS VIRALES PRESENTES EN CÉLULAS INFECTADAS E INCUBADAS EN PRESENCIA DE SUERO POLICLONAL ANTI-RSV.

3. HIPÓTESIS:

LA INTERACCIÓN DE LOS ANTIGENOS DEL RSV PRESENTES EN LA MEMBRANA CELULAR CON ANTICUERPOS POLICLONALES ANTIVIRALES ALTERA LA CONCENTRACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS ANTIGENOS VIRALES PRESENTES EN LAS CÉLULAS.

4. OBEJETIVO GENERAL:

ANALIZAR EL EFECTO DE INCUBAR CON SUERO POLICLONAL ANTI-RSV CÉLULAS QUE PRESENTAN ANTÍGENOS DEL RSV EN LA MEMBRANA CELULAR, EN LA DISTRIBUCIÓN Y CONCENTRACIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES PRESENTES EN LAS CÉLULAS INFECTADAS.

4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

ANALIZAR EL EFECTO DE INCUBAR CÉLULAS QUE PRESENTAN ANTÍGENOS DEL RSV CON SUERO POLICLONAL EN LA DISTRIBUCIÓN DE LOS ANTÍGENOS VIRALES PRESENTES EN LAS CÉLULAS.

DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN OPTIMA DE ANTICUERPO ANTI-RSV REQUERIDA PARA OBSERVAR CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE LAS PROTEÍNAS VIRALES PRESENTES EN EXTRACTOS DE CÉLULAS INFECTADAS POR RSV.

CUANTIFICAR ANTIGENOS VIRALES PRESENTES EN CÉLULAS INFECTADAS E INCUBADAS EN PRESENCIA DE SUERO POLICLONAL ANTI-RSV.

5 MÉTODOS

5.1 MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES

La línea celular utilizada en este trabajo fue HEp-2, se propagó en medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, inactivado a 56°C durante 30 minutos, a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. En lo sucesivo a este medio se le denominará medio completo y además cuando se mencione el término de incubación nos referiremos a las condiciones de 37°C, con CO₂ y en atmósfera húmeda. La propagación de la línea celular se hizo en botellas de 75 cm², una vez alcanzada la confluencia se subcultivaron 2-3 veces por semana por tripsinización. NOTA: Las formulas de todos los medios y soluciones empleadas se encuentran descritas en el apéndice.

5.2 PROPAGACIÓN DEL VIRUS:

El RSV se propagó en monocapas de células HEp-2 con 80-100% de confluencia, a una multiplicidad de infección (MOI) de 1 en medio MEM suplementado con 2% de suero fetal bovino con antibióticos (a este medio se le denominará medio de infección), se dejó absorber 2 horas a 37°C, transcurrido este tiempo se retiró el sobrenadante y se adicionó medio de infección. Las células infectadas se incubaron de 3 a 5 días hasta observar un efecto citopático claro. El sobrenadante se recuperó, se sonicó durante 10 minutos (Branson ultrasonic clear modelo 452E) y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente (Sorval RT 6000D); posteriormente el sobrenadante se dividió en dos fracciones, una alícuota sirvió para titular el virus y la otra fracción se transfirió a criotubos con 0.2 M de MgSO₄, para su almacenamiento a -70°C.

5.3 TITULACIÓN DEL VIRUS

La cuantificación de las partículas virales infecciosas se realizó por dosis infectiva del 50% (TCID₅₀). Para lo cual se infectaron monocapas de células HEp-2 confluentes en placas de 96 pozos con diluciones seriadas (1:4) en medio de infección. De la suspensión viral original se depositaron 100 µl en el primer pozo de la placa y de este se toman 25 µl para transferirlos al siguiente pozo y la dilución se completa adicionando 75 µl de medio para infectar, este paso se repitió 11 veces para así tener 12 diluciones de la suspensión viral original. Este procedimiento se hizo por cuadruplicado para obtener un valor más confiable.

El título se calculó según el método de Kärber (74):

$$TCID_{50} = -\Delta -\delta(S - 0.5)$$

Donde:

$\Delta = \log_{10}$ donde el 100% de pozos presentaron efecto citopático.

$\delta = \log_{10}$ del factor de dilución.

S= suma de los pozos que presentan efecto citopático, incluyendo aquella donde el porcentaje es 100%, dando a está el valor de uno y las otras fracciones el valor correspondiente (1/4 = 0.25).

| | 1 Virus Conc entrad o | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | ◆ | ◆ | ◆ | | | | | | | | | |
| B | ◆ | ◆ | | | | | | | | | | |
| C | ◆ | ◆ | ◆ | | | | | | | | | |
| D | ◆ | ◆ | ◆ | ◆ | | | | | | | | |
| E | ◆ | ◆ | | | | | | | | | | |
| F | ◆ | ◆ | ◆ | | | | | | | | | |
| G | ◆ | ◆ | ◆ | | | | | | | | | |
| H | ◆ | ◆ | | | | | | | | | | |

Cultivo Celular con Efecto Citopático= ♦
Cultivo Celular Normal=

5.4 PURIFICACIÓN DEL VIRUS POR GRADIENTE DE SACAROSA

La purificación de las partículas virales obtenidas de las monocapas celulares infectadas se hizo por gradiente de sacarosa. El sobrenadante de células HEP-2 crecidas en botellas de 150 cm² e infectadas, se transfirió a tubos de 60 ml y se adicionó polietilenglicol (PEG 8000) al 8% p/v, se incubó a 4°C durante la noche y se centrifugó a 19,500 rpm durante una hora a 4°C (ultra centrifuga Beckman modelo L8-60M). El precipitado obtenido se resuspendió en amortiguador TEN, y se volvió a reprecipitar con PEG durante toda la noche a 4°C, se centrifugo a 19,500 rpm durante 1 hora a 4°C y se resuspendió en 2 ml de amortiguador TEN. El gradiente de sacarosa se preparó a las concentraciones de 60-45-35-20% en amortiguador TEN. Las soluciones de sacarosa se colocaron en un tubo de 15 ml con ayuda de pipetas Pasteur de mayor a menor concentración, empleando el mismo volumen para cada una de las soluciones. En la parte superior del gradiente se adicionó el precipitado viral (2 ml). Se dejó estabilizar de 15-30 minutos y se centrifugo a 150,000 g por 60 minutos a 4°C (ultra centrifuga Beckman modelo L8-60M). Después de centrifugar se perforó el tubo por el extremo inferior para recuperar la banda que se encuentra en la interfase de 45-35% de sacarosa. Se puede saber cuál es la interfase porque se conoce la cantidad de cada una de ellas colocadas en el tubo. Cuando no fué posible visualizar las bandas, debido a que la cantidad recuperada de virus era baja, se recolectaron fracciones de 1 ml. A cada una de las fracciones colectadas se les tituló su infectividad por TCID₅₀ y cuantificó la cantidad de proteínas por el método de Lowry.

5.5 OBTENCIÓN DE SUERO α RSV

El suero anti-RSV se obtuvo de conejos Nueva Zelanda de 3 kg, antes de la inmunización se obtuvieron 2-3 ml de suero preinmune. El esquema de inoculación (75) se realizó inyectando al conejo con una mezcla de 400 μ g de proteína más adyuvante completo de Freund en un volumen final de 0.5 ml, por vía subcutánea en la región dorsal en cuatro sitios diferentes. Los 400 μ g de proteína inoculados corresponden a 3.5×10^6 TCID₅₀/ml. Una semana después se prepararon 400 μ g de proteína y se mezclaron con adyuvante incompleto de Freund y la inmunización se hizo con 0.5 ml de la mezcla por vía intramuscular profunda en dos sitios distintos. Las siguientes tres inoculaciones se realizaron con intervalos de una semana con 400 μ g de proteína sin adyuvante por vía intramuscular con 400 μ g de proteína en 0.25 ml en cada ocasión. Una semana después de la última inoculación se realizó una sangría de prueba y se determinó la actividad neutralizante a la infectividad del suero obtenido. Cuando la respuesta de anticuerpos neutralizantes del conejo fue de 3.2×10^6 unidades neutralizantes/ml, el conejo se sangró a blanco. La sangre se obtuvo por punción cardíaca, se colocó en tubos Falcon de 50 ml y se dejó coagular (30-60 minutos), después de esto con ayuda de un hisopo se retiró el coágulo deslizándolo por las paredes del tubo y se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos. Con ayuda de pipetas Pasteur se recuperó el suero, se inactivó a 56°C por 30 minutos, se esterilizó por filtración con una membrana de 0.22 μ m, se tituló y se almacenó a -20°C.

5.6 CUANTIFICACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES

La actividad neutralizante se determinó diluyendo el suero en medio para infectar y mezclándolo con una cantidad constante de virus infeccioso (2.5×10^6 TCID₅₀/ml), para

esto se realizaron las diluciones del suero 1:3 por cuadruplicado, se tomaron 50 μ l de cada una de ellas y se mezclaron con 50 μ l de la suspensión viral, esta mezcla se inoculó durante 2 horas. Se infectaron monocapas de células HEP-2 confluentes con la mezcla virus-suero anti-RSV y se incubaron durante 2 horas, después de este tiempo se retiró el sobrenadante, se adicionó medio para infectar y se incubaron hasta observar el efecto citopático.

5.7 PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN Ig-G DEL SUERO POR COLUMNA DE PROTEÍNA A SEPHAROSA

La proteína A sepharosa se hidrató con 4 ml de H₂O desionizada por gramo de proteína y se colocó en una jeringa de 5 ml con la punta tapada con pelo de ángel, la columna se lavó con 40 ml de amortiguador de fosfatos 0.5M pH 8.0 y posteriormente con 20 ml de amortiguador de fosfato 0.1M pH 8.0. Se añadieron 4 ml del suero a la columna y se incubó a 4°C toda la noche, se lavó perfectamente con el amortiguador de fosfatos 0.1M pH 8.0 hasta obtener una densidad óptica de cero a 280 nm. Posteriormente las Ig-G's fueron eluidas de la columna adicionando a ésta una solución de ácido acético 0.1M y NaCl 0.15M. Las fracciones fueron colectadas en volúmenes de 1 ml en tubos conteniendo 100 μ l de TrisHCl 1M pH 8.0, con la finalidad de amortiguar el pH de las fracciones, las fracciones colectadas se leyeron en el espectrofotómetro a 280 nm, se trabajó con aquellas que dieron valores de densidad óptica entre 0.9 a 2.07 y se juntaron. A la mezcla de las fracciones se les cuantificó la concentración de proteínas por el método de Lowry.

5.8 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

Los extractos celulares se obtuvieron de células HEP-2 sin infectar o infectadas a MOI de 1. Tres lotes de células HEP-2 se infectaron con el RSV, después de 6 horas *post*-infección a cada lote se le dio el tratamiento siguiente: al primer lote se le adicionó una concentración 1:5 de suero preinmune, al segundo se le adicionó suero anti-RSV con título de

1×10^6 unidades neutralizantes/ml a una concentración 1:5; y al tercero se le añadió solamente el medio empleado para diluir el suero (Ver esquema de infección e incubación con anticuerpo).

Además como control negativo se utilizaron células sin infectar crecidas en presencia de suero anti-RSV. Cada ensayo se hizo con 1×10^6 células. Una vez desprendidas las células de la caja por tripsinización se centrifugaron a 3000 rpm, el botón celular se lavó con amortiguador de fosfatos PBS y se rompieron con el amortiguador de extracción frío, la suspensión celular se agitó en vortex durante 3 minutos, se transfirió a un microtubo y se centrifugó en microfuga (Eppendorf 5414) por 5 minutos a temperatura ambiente, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Lowry.

5.9 INMUNOBLOT

Para los ensayos de inmunoblot se emplearon los extractos celulares obtenidos previamente, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras, cada carril contenía 50-100 μ g de proteína total desnaturalizada a 100°C durante 5 minutos, para depositar la muestra en los pozos se utilizó el amortiguador de carga y se corrieron con el amortiguador de corrida, aplicando una corriente de 80-120 volts (ISCO modelo 493). Una vez finalizado el corrimiento las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m (Bio-rad), utilizando una cámara de transferencia semi-seca (Owl modelo HEP-1) y una solución amortiguadora de transferencia, en donde se aplicó una corriente de 500 miliampers durante 2 horas. Posteriormente la membrana se incubó con una solución de rojo de Ponceau durante 10 minutos y se enjuagó con ácido acético al 5%, con la finalidad de comprobar que las proteínas se transfirieron a la membrana. La membrana se incubó con una solución de leche descremada al 5%.

Posteriormente la membrana se dejó en agitación toda la noche con las Ig-G's purificadas a una concentración 1:5 en leche descremada. A continuación se aplicó el conjugado anti-Ig-G de conejo peroxidado obtenido en burro (Amersham) diluido 1:1000 con la solución de bloqueo y se dejó incubando con la membrana por espacio de 1 hora con agitación constante. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavó nuevamente con la membrana tres veces y se incubó con la solución reveladora.

5.10 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Para los ensayos de inmunofluorescencia se emplearon placas de 8 pozos, tratadas con poli-L-lisina para favorecer la adhesión celular, el exceso de esta solución se retiró y lavó con PBS. En cada pozo se crecieron 10,000 células HEp-2 durante 24 horas. Las células se infectaron con RSV y se incubaron con suero anti-RSV bajo las condiciones ya descritas. Transcurrido el tiempo de infección (6 horas) e incubación con el anticuerpo (10, 20 minutos o 6 horas), las células se fijaron con metanol durante 5 minutos y con acetona 30 segundos, ambas soluciones deben encontrarse a -20°C . La placa se bloqueó toda la noche con suero total de burro 1:2 diluido en PBS. Posteriormente se lavó dos veces sumergiéndola durante 5 minutos para cada lavado en albúmina sérica bovina (ASB) 0.1%, tween 20 al 0.05% en PBS, y se incubó durante 1 hora a 37°C con las Ig-G's anti-RSV purificadas a una concentración 1:100 en solución de lavado. Transcurrido el tiempo de incubación la placa se lavó dos veces con PBS de lavado durante 10 minutos y se incubó por espacio de 30 minutos a 37°C con el anti-Ig-G de conejo fluoresceinado producido en burro (Amersham). Posteriormente la placa se lavó con PBS y se observó con el microscopio de inmunofluorescencia.

5.11 CITOMETRÍA DE FLUJO

Para el ensayo de citometría se emplearon 1×10^6 células infectadas y tratadas con anticuerpo bajo las condiciones ya descritas previamente en la sección de extractos celulares. Las células se incubaron durante 2 horas a 4°C con agitación constante en tubos de microcentrifuga con 500 μl de medio completo más 100 μg de suero anti-RSV por tubo. Posteriormente las células se centrifugaron por 15-30 segundos en microfuga y se lavaron dos veces con una solución fría recién preparada de ASB al 0.1% en PBS, esto con la finalidad de evitar la contaminación. Posteriormente se fijaron durante 30 minutos a 4°C con paraformaldehído al 0.5% en PBS pH 7.5. Las células se lavaron nuevamente y se incubaron durante 30 minutos con ASB 0.1% a 4°C . Después de lavar las células se incubaron durante 2 horas a 4°C con agitación con el segundo anticuerpo fluoresceinado diluido 1:100 en la solución de lavado. Las células marcadas con fluoresceína, se lavaron y se observaron en el microscopio de fluorescencia, si la marca era satisfactoria se analizaron por citometría de flujo empleando el FACScan Becton-Dickinson programa LYSYS II. Los controles empleados para estos ensayos consistieron en células HEp-2 normales sin fijar, estas células sirvieron para seleccionar la población celular a estudiar con el criterio de que fueran homogéneas en tamaño y granularidad. También se emplearon como control células sin infectar e incubadas con suero anti-RSV. Otro control importante empleado es el de isotipo, en este caso fueron células infectadas e incubadas con suero *pre*-inmune de conejo.

6. RESULTADOS

6.1 CINÉTICA DE INFECCIÓN

Con la finalidad de establecer condiciones óptimas para estudiar el efecto de incubar células HEp-2 infectadas con el RSV con suero anti-RSV, decidimos en primer término establecer el tiempo *post*-infección en el cual se detectaban antígenos virales totales en las células infectadas y no se observaron cambios en la morfología de las células, ni la presencia de virus extracelular. Estas dos determinaciones nos permitirían conocer, por un lado, el tiempo en el cual se detectan los antígenos virales en las células infectadas, y así conocer el tiempo en el cual deberíamos de iniciar la incubación del cultivo infectado con el suero anti-RSV; y por otro lado saber el tiempo en el cual el cultivo comienza a producir virus extracelular infeccioso y además conocer cuándo se comienzan a dañar las células por el mismo proceso de infección.

Los resultados de la determinación de los antígenos virales en las células, así como la presencia del virus extracelular se muestran en la Tabla 1. El seguimiento de los antígenos virales en las células infectadas se realizó a partir de las dos horas hasta las 24 horas *post*-infección. Los antígenos virales se detectaron por inmunofluorescencia a partir de las 4 horas *post*-infección, a las 6 horas se incrementó la intensidad de la fluorescencia y a las 12 horas alcanzó el máximo de intensidad. Por lo que respecta a la producción de los virus infecciosos en el sobrenadante del cultivo, estos pudieron detectarse a partir de las 22 horas con un título de $10^{3.07}$ TCID₅₀/ml, y a las 24 horas el título fue de $10^{3.66}$ TCID₅₀/ml. Con estos resultados decidimos iniciar la incubación de las células infectas con el suero anti-RSV a las 6 horas *post*-infección, debido a que a este tiempo ya se detectan suficientes antígenos virales en las células infectadas.

Tabla 1. Cinética de antígenos virales y producción de virus infeccioso en células HEP-2.

| Horas <i>Post</i> -infección | INMUNOFLUORESCENCIA | TITULO VIRAL(TCID50/ml) |
|------------------------------|---------------------|-------------------------|
| 2 | - | ND |
| 4 | + | ND |
| 6 | ++ | ND |
| 8 | ++ | ND |
| 12 | +++ | ND |
| 18 | +++ | ND |
| 22 | +++ | 10 ^{3.07} |
| 24 | +++ | 10 ^{3.66} |

(ND) Virus infeccioso no detectado en sobrenadantes. Los signos + y - indican intensidad de fluorescencia. (-) Antígenos no detectados. (+) Antígenos detectados. Los puntos suspensivos indican que también se realizaron determinaciones a las 10, 14, 16 y 20 hrs.

6.2 DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES EN CÉLULAS

INCUBADAS CON SUERO ANTI-RSV.

Una vez establecidos los tiempos *post*-infección a los cuales se visualizan los antígenos virales totales en las células infectadas, decidimos realizar ensayos de inmunofluorescencia para determinar si la incubación con suero anti-RSV de células HEP-2 infectadas con el RSV alteraba la distribución de los antígenos virales presentes en las células infectadas.

Se decidió trabajar a las 12 horas *post*-infección para tener la seguridad que las células infectadas no se rompían; aunque el periodo de latencia fue de 22 horas. Los antígenos detectados en estas células muestran una distribución homogénea en la célula (Figura 3A).

En la figura 3B se muestra un patrón de inmunofluorescencia semejante al del control positivo, lo cual indica que la incubación con el suero preinmune no altera la distribución de los antígenos virales.

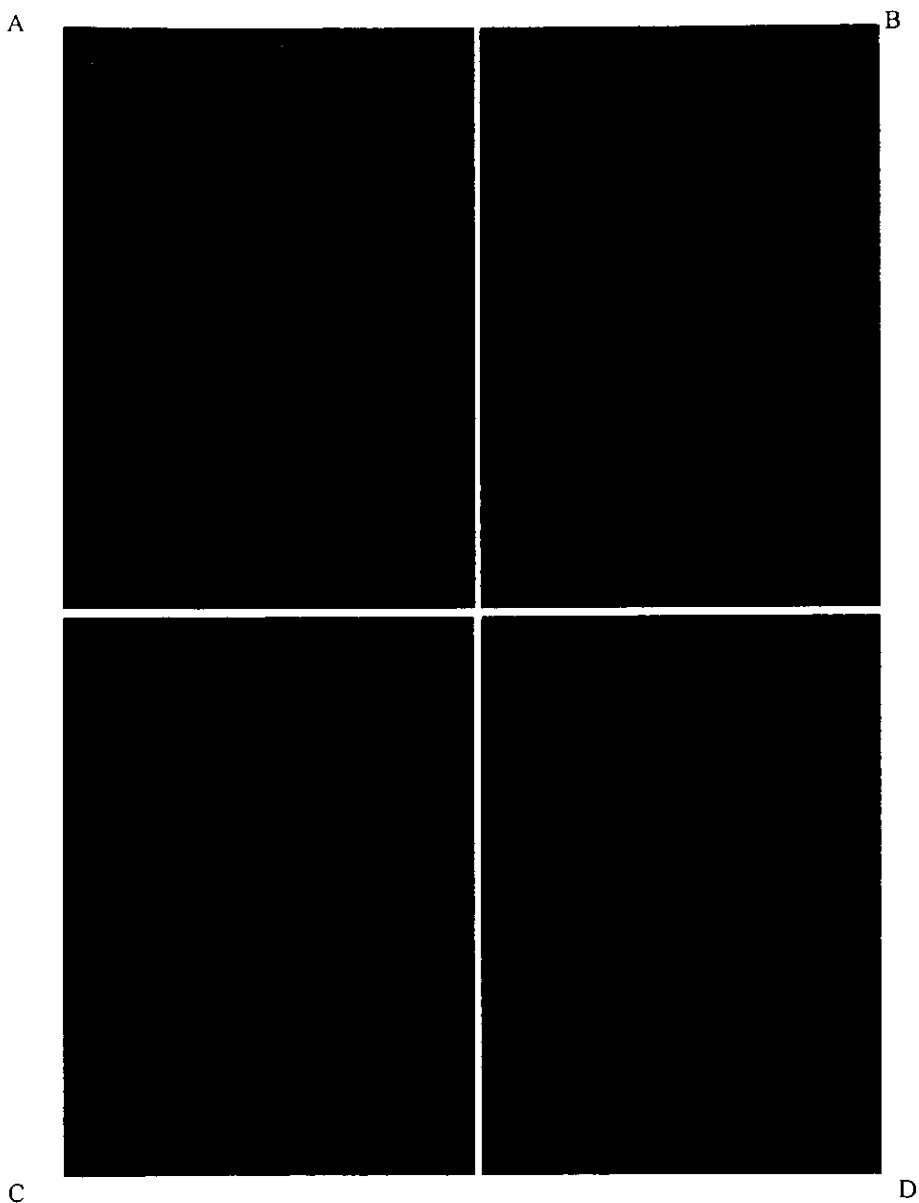


Figura 3. Inmunofluorescencia indirecta de células HEp-2 infectadas con el RSV a MOI de 1 a las 12 horas post-infección (40X). 3A) Control positivo. 3B) Células infectadas por 6 horas e incubadas 6 horas con suero preinmune de conejo. 3C) Células infectadas por 6 horas e incubadas 6 horas con suero anti-RSV con título neutralizante 2.5×10^6 TCID₅₀/ml 1:5. 3D) Control negativo de células sin infectar e incubadas con suero anti-RSV.

En la figura 3C se aprecian dos aspectos interesantes; primero se detecta una disminución en la intensidad de fluorescencia de las células con respecto al control positivo (3A) y además los antígenos virales muestran una distribución diferente a la mostrada en el control positivo, es decir los antígenos virales no se distribuyen homogéneamente y además los antígenos virales se observan únicamente en el citoplasma y el núcleo está libre de antígenos. En la figura 3D se observa que el suero anti-RSV no se une inespecíficamente a las células (control negativo).

Los resultados de este ensayo indican que la incubación con el suero anti-RSV altera la concentración y distribución de los antígenos virales de las células HEp-2 infectadas con el RSV, por lo anterior decidimos realizar incubaciones con el suero anti-RSV a tiempos cortos, para conocer si también a tiempos cortos existen cambios en la concentración y distribución de los antígenos virales.

6.3 EFECTO DE ANTICUERPOS ANTI-RSV EN LA REDISTRIBUCIÓN DE LOS ANTÍGENOS VIRALES.

La siguiente pregunta que nos planteamos fue que si la incubación en tiempos cortos (10 o 20 minutos) con suero anti-RSV en células infectadas por RSV produciría redistribución o “capping” de los antígenos virales presentes en las células. Para ello, realizamos ensayos de inmunofluorescencia de células infectadas por 6 horas e incubadas en presencia de suero anti-RSV por 10 o 20 minutos. Los resultados se muestran en la figura número 4. En la figura 4A que corresponde al control positivo se observa una abundante concentración de antígenos virales, los cuales se encuentran homogéneamente distribuidos en la célula; esta misma distribución se muestra en la figura 4 C, que corresponde al control de células infectadas e incubadas con suero preinmune por 20 minutos, esto indica que el suero preinmune no tiene ningún efecto sobre la distribución de los antígenos virales. En la figura

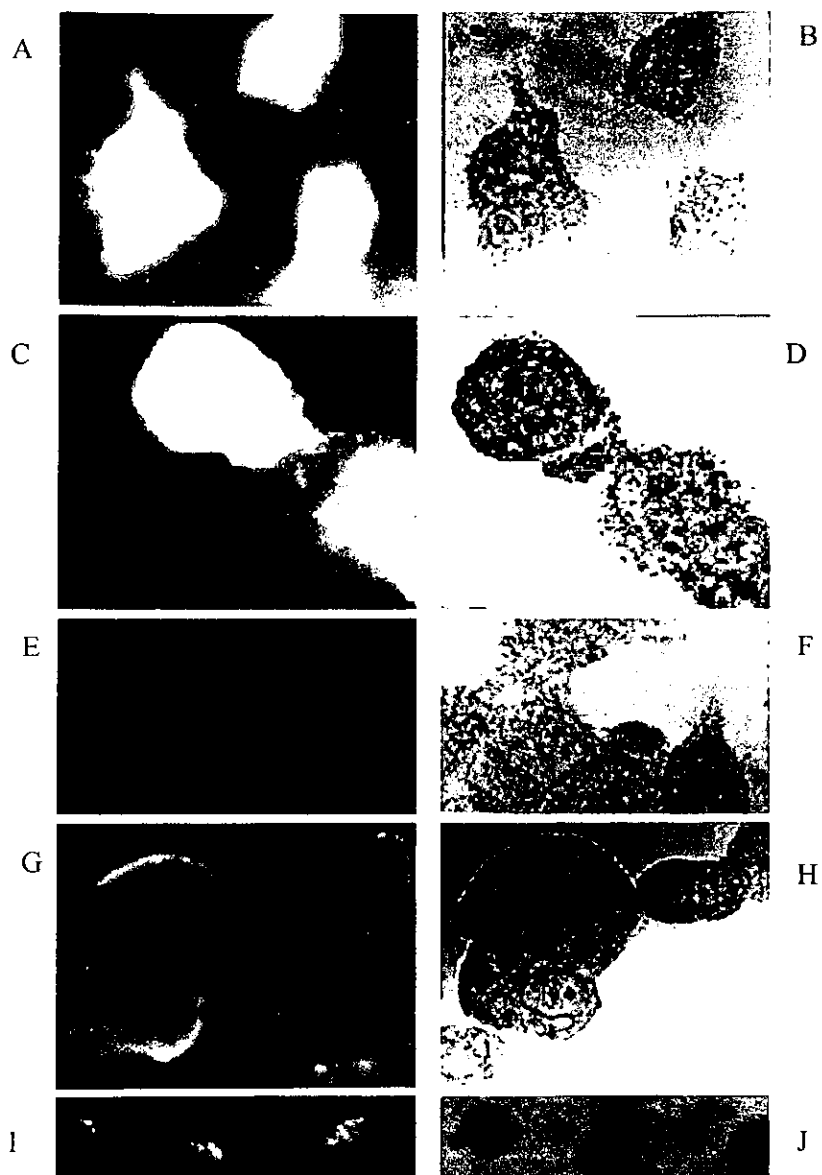


Figura 4. Efecto del anticuerpo anti-RSV en la redistribución de los antígenos virales del RSV en células HEp-2 (40X). Inmunofluorescencia indirecta de células HEp-2 infectadas con el RSV a MOI de 1 a las 6 horas postinfección. 4A) Células infectadas. 4C) Células infectadas e incubadas con suero preinmune de conejo por 20 minutos. 4E) Células no infectadas e incubadas con suero anti-RSV 1:5 por 20 minutos. 4G) Células infectadas e incubadas con suero anti-RSV 1:5 por 10 minutos. 4I) Células infectadas e incubadas con suero anti-RSV 1:5 por 20 minutos. Las figuras B, D, F, H y J corresponden a las células con luz visible.

4E que corresponde al control negativo se observa que no existe ninguna unión inespecífica del suero anti-RSV sobre las células.

A los 10 minutos de incubación con el anticuerpo (figura 4G) se pueden observar básicamente dos cambios importantes en la presencia de los antígenos virales en comparación con el control positivo, el primero es que la concentración de los antígenos virales se ve disminuida; y el segundo cambio es que los antígenos virales comienzan a dirigirse hacia uno de los polos de la célula. Estos dos cambios observados en la distribución de los antígenos virales por el efecto del suero anti-RSV, se vieron considerablemente acentuados a los 20 minutos de incubación con el suero (figura 4I), a este tiempo los antígenos virales se encuentran prácticamente ausentes de la región central de la célula y los antígenos virales que si se observan se encuentran concentrados en uno de los polos de la célula.

Estos resultados indican que la incubación con suero anti-RSV por tiempos cortos en células infectadas ocasiona una redistribución de los antígenos virales presentes en las células infectadas.

6.4 CUANTIFICACION DE LOS ANTÍGENOS VIRALES EN LA MEMBRANA CELULAR POR ENSAYOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO.

Los ensayos de inmunofluorescencia mostraron que la incubación de las células infectadas con el suero anti-RSV altera la concentración y distribución de los antígenos virales presentes en las células infectadas e incubadas con el suero anti-RSV, por esta razón decidimos cuantificar los antígenos virales por ensayos de citometría de flujo. El ensayo de

citometría se realizó tres veces de manera independiente, los resultados obtenidos se muestran en la figura 5 y con los valores obtenidos se construyó la tabla 2.

Los resultados obtenidos en el primer ensayo mostraron baja intensidad promedio de la fluorescencia (IPF) en todas las determinaciones. Sin embargo el valor de la media de la intensidad de fluorescencia de las células infectadas e incubadas con suero anti-RSV (12.64 IPF) es inferior al valor obtenido en células a las 6 (15.2 IPF) y a las 12 horas (16.5 IPF) *post*-infección. Además los resultados del primer ensayo mantienen la misma tendencia que los otros dos.

En un segundo ensayo, se observaron valores de IPF considerablemente mayores comparados con el primero.

Si comparamos los valores de IPF en este segundo ensayo de las células infectadas a las 6 y 12 horas indica que hubo un aumento importante de antígenos virales en la membrana celular, el aumento en la IPF fue del 30%. Por otra parte al analizar el valor de IPF de las células infectadas por 6 horas e incubadas 6 horas más en presencia de suero anti-RSV observamos un valor muy semejante al obtenido en las células infectadas a las 6 horas (2593 y 2662 respectivamente), además representa una reducción del 30% de la IPF comparada con las células infectadas a las 12 horas (3655). Por lo que respecta al control de isotipo el valor de IPF (3323) es muy similar al de las células infectadas por 12 horas, lo cual indica que el suero preinmune no tiene ningún efecto en los antígenos virales. Finalmente el valor de IPF (87) del control negativo indica que el suero anti-RSV no se une inespecíficamente a las células.

El tercer ensayo realizado presenta un comportamiento semejante al ensayo anterior.

Los valores de IPF de las células infectadas a las 6 y 12 horas (284 y 507) indican que hubo un incremento del 44% en la IPF. Si comparamos el valor de IPF de las células infectadas

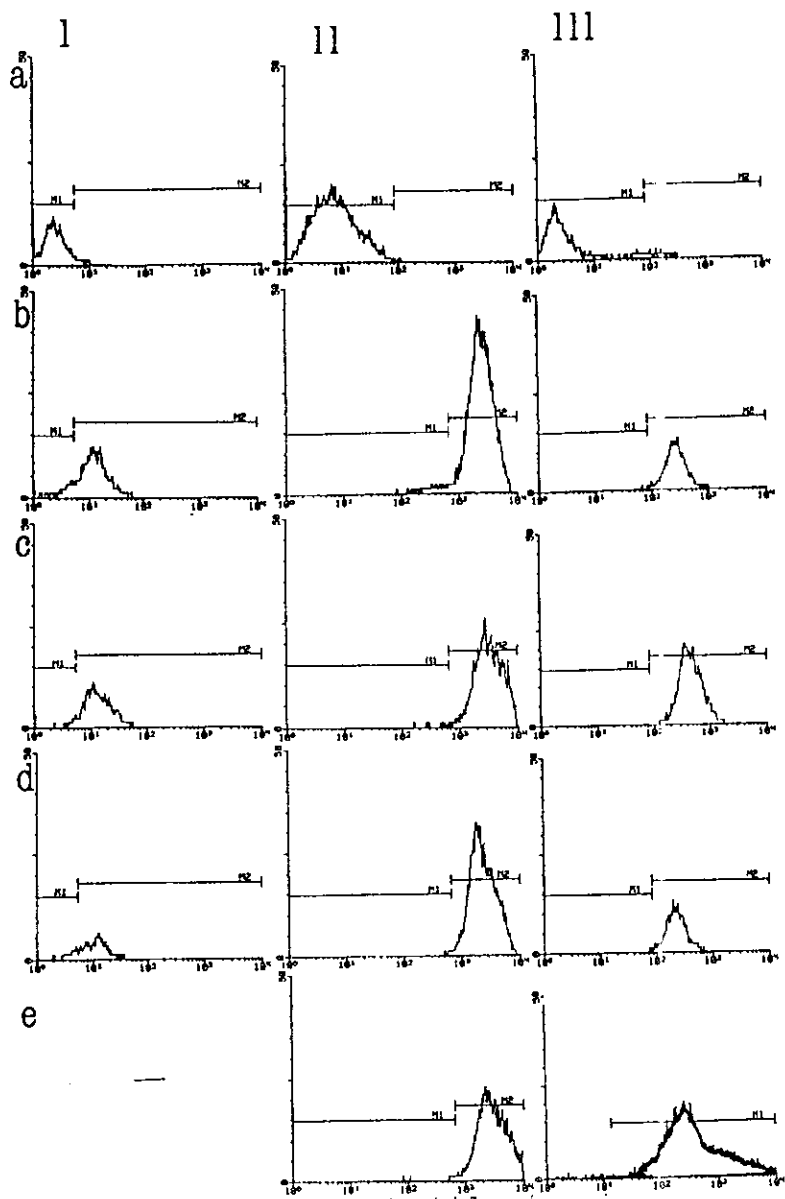


Figura 5. Ensayos independientes (I, II, III) de citometría de flujo de células HEp-2 infectadas con el RSV e incubadas con suero anti RSV 1:5 con título neutralizante 2.5×10^6 TCID₅₀/ml. a) Células sin infectar e incubadas con suero anti-RSV. b) Células infectadas por 6 horas. c) Células infectadas por 12 horas. d) Células infectadas por 6 hrs y después de este tiempo se incubaron 6 horas en presencia de suero anti-RSV. e) Igual a d pero incubadas en presencia de suero preinmune

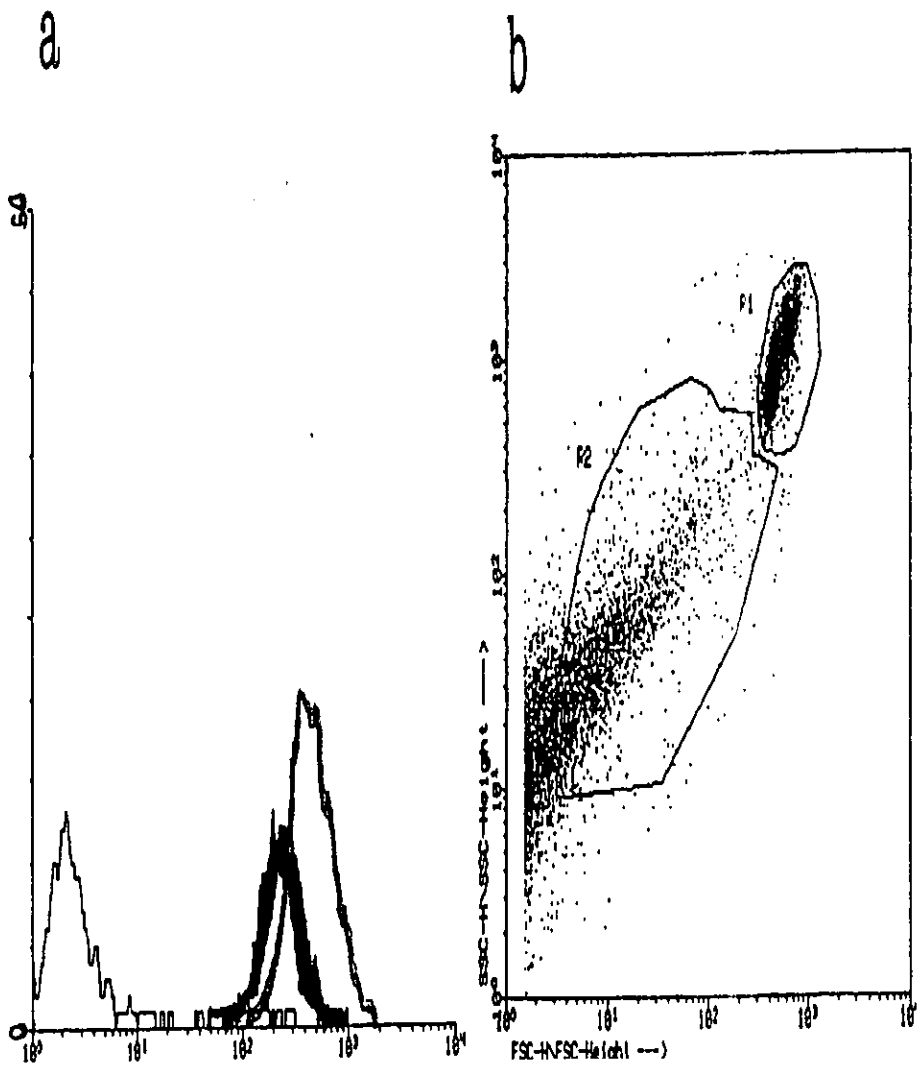


Figura 6a. Sobreposición de las gráficas de citometría de flujo del panel III de la figura 5. En negro células sin infectar, en azul células infectadas a las 6 horas, en rojo células infectadas a las 12 horas, en verde células infectadas por 6 horas e incubadas 6 horas más en presencia de suero anti-RSV. 6b. Indica la población celular a ser analizada en el ensayo de citometría. R2 indica la población celular muerta o dañada y que es heterogénea en granularidad y tamaño. R1 indica la población celular viable y que es homogénea en cuanto a granularidad y tamaño; y por lo tanto es la población a ser analizada.

por 6 horas e incubadas 6 horas más en presencia de suero anti-RSV con las células infectadas por 6 horas (284) y con las células infectadas por 12 horas (507); los valores indican una intensidad de fluorescencia similar al de las células infectadas a las 6 horas y muestra una disminución del 54% con respecto al de las 12 horas.

Con los datos de este último ensayo, en el cual se acentúa la diferencia en la concentración de los antígenos virales de la membrana, se realizó el solapamiento de las gráficas que se muestran en la figura 6. En esta figura la gráfica correspondiente a las células infectadas e incubadas con el suero anti-RSV muestra un desplazamiento hacia la izquierda con relación a la gráfica de las células infectadas a las 12 horas. Además la curva de la gráfica del tratamiento con el anticuerpo prácticamente se sobrepone a la curva de la infección a las 6 horas. Otra observación importante es que el tamaño de la gráfica con el anticuerpo muestra una reducción en la altura comparada con la de las 12 horas.

Los resultados de citometría de flujo nos indican que la incubación con suero anti-RSV de células infectadas con RSV disminuyen la concentración de los antígenos virales de membrana entre un 30-50%.

Tabla 2. Cuantificación de antígenos virales presentes en la membrana de células HEP-2 por citometría de flujo.

| ENSAYO | 1 | 2 | 3 |
|--------------------------|--------|-------|-------|
| a) Cel.Normales+anti-RSV | | 7.25* | 87* |
| | 6.5* | | |
| b) 6 horas | 15.2* | 2662* | 284* |
| c) 12 horas | 16.05* | 3655* | 507* |
| d) Anti-RSV | 12.64* | 2593* | 237* |
| e) Preimmune | - | 4.33* | 9.45* |

(*) LOS VALORES CORRESPONDEN A LA INTENSIDAD PROMEDIO DE FLUORESCENCIA POR CÉLULA ANALIZADA. a= células sin infectar e incubadas en presencia de suero anti-RSV. b= células infectadas a las 6 horas. c= células infectadas a las

12 horas. d= células infectadas por 6 horas e incubadas en presencia de suero anti-RSV por 6 horas más. e= células infectadas e incubadas en presencia de suero preimmune.

6.5 DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS VIRALES POR ENSAYOS DE INMUNOTRANSFERENCIA.

1.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS ANTÍGENOS VIRALES EN TRES DISTINTAS FRACCIONES CELULARES.

Con la finalidad de detectar la fracción celular en la cual se encontraba la mayor concentración de antígenos virales se realizó un inmunoblot con tres distintas fracciones celulares; además este mismo ensayo nos permitiría conocer que proteínas virales podrían ser detectadas con las Ig-G del suero hiperimmune. La especificidad de las Ig-G anti-RSV utilizadas para detectar las proteínas virales en el extracto celular se determinó con el virus purificado por gradiente de sacarosa el cual se utilizó para inmunizar los conejos. Los resultados se muestran en la figura 7, el carril 2 es el virión purificado por gradiente de sacarosa, donde se detectan 7 bandas con pesos moleculares de 200, 90, 70, 60, 50, 40, 30 y 20 kDa. En el carril 3 de células sin infectar no se detecta ninguna banda, lo cual indica que no hay reconocimiento inespecífico. El carril 4 es la fracción celular total de células HEp-2 infectadas con el RSV a MOI de 1 a 24 horas post-infección, donde se observan 6 bandas. El carril 5 corresponde a la fracción celular soluble, donde se observan las mismas 6 bandas obtenidas en el extracto total. Esto indica que en estos dos carriles se detecta la mayor proporción de antígenos virales detectados por nuestro suero. El carril 6 corresponde a la fracción celular de membranas donde solamente se detectan 3 bandas y a una concentración menor que la obtenida en los carriles previos. Este ensayo demuestra que el extracto celular

soluble es la fracción en la cual se detecta por nuestro suero la mayor proporción de antígenos virales.

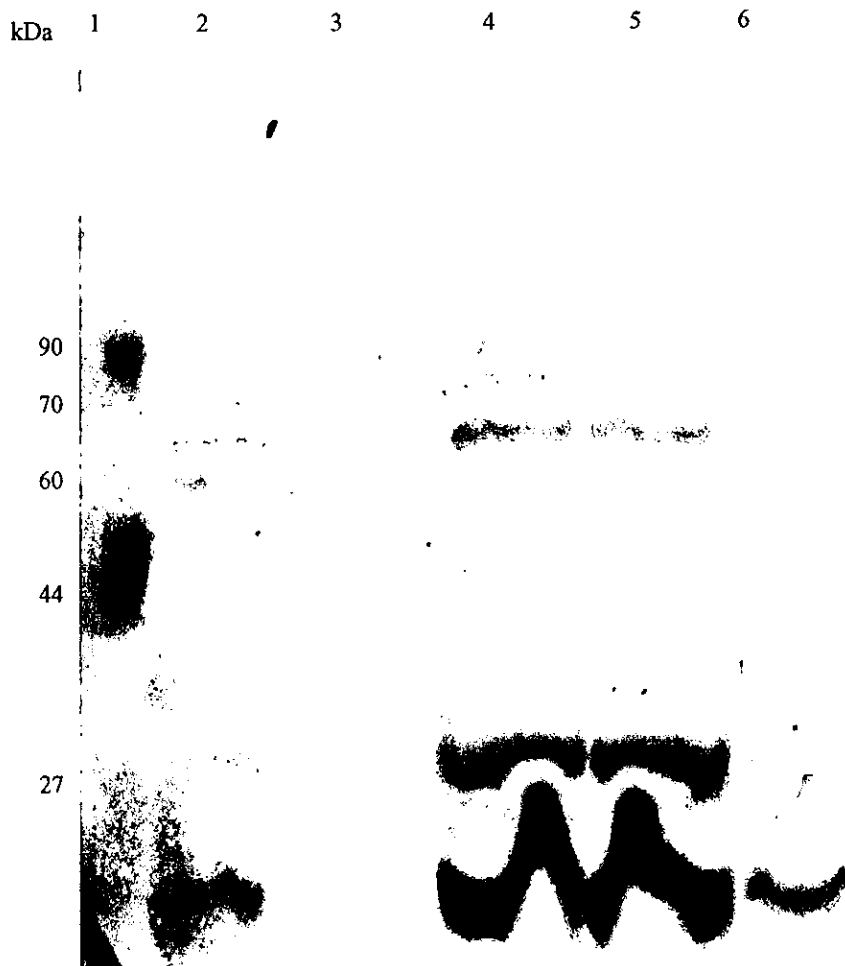


Figura 7. Inmunoblot de proteínas de células HEP-2 infectadas con RSV a MOI de 1 y reveladas con Ig-G anti-RSV. Carril 1 Marcador estándar de peso molecular. Carril 2 virus purificado por gradiente de sacarosa. Carril 3 Células sin infectar. Carril 4 extracto celular total a las 24 horas post-infección. Carril 5 fracción celular soluble de células 24 horas post-infección. Carril 6 fracción celular de membranas de células 24 horas post-infección. Todos los carriles fueron cargados con 50 microgramos de proteína total.

6.7.-INMUNOTRANSFERENCIA DE CÉLULAS INFECTADAS E INCUBADAS CON SUERO ANTI-RSV: EFECTO DE LA DOSIS DEL SUERO ANTI-RSV.

Una vez establecidas las condiciones de los ensayos de inmunotransferencia se utilizó esta técnica para determinar el efecto que tiene la incubación con suero anti-RSV en células infectadas en cuanto a la presencia de las proteínas virales en extractos solubles de células infectadas. La incubación con el suero anti-RSV se hizo a tres diferentes concentraciones. Los resultados se muestran en la figura 8. Los resultados del ensayo muestran que en el carril del virión purificado por gradiente de sacarosa se observan de manera clara 6 bandas con pesos moleculares de 200, 90, 70, 60, 40 y 30 kDa; además se observan de manera muy tenue otras bandas de diferentes pesos moleculares, que pueden corresponder a proteínas degradadas. A las 6 horas de infección en el carril 4 se observan 5 bandas de 90, 70, 60, 40 y 30 kDa. A las 12 horas de infección (carril 5) se detectan las mismas 6 bandas detectadas en el virión. En las células infectadas por 6 horas e incubadas 6 horas con suero preinmune (carril 6) se detectan las mismas 6 bandas visualizadas en el virión y en las células infectadas a las 12 horas; lo cual indica que el suero preinmune no tiene efecto sobre la síntesis de los antígenos virales. En el carril de las células infectadas por 6 horas e incubadas con suero anti-RSV a una concentración de 1:10 (carril 7) se detectan las mismas 5 bandas observadas en el carril de las células infectadas por 6 horas. Este mismo efecto se observa en el carril de células infectadas por 6 horas e incubadas en presencia de suero anti-RSV a una concentración de 1:7. Finalmente a la máxima concentración de suero anti-RSV empleado se detectan tres bandas con peso molecular de 60, 40 y 30 kDa y las que desaparecen son de 200, 90 y 70 kDa. Los resultados muestran que existe una

correlación inversa entre la concentración del suero anti-RSV y la concentración de los antígenos virales detectados, a mayor concentración de suero menor cantidad de antígenos virales detectados.

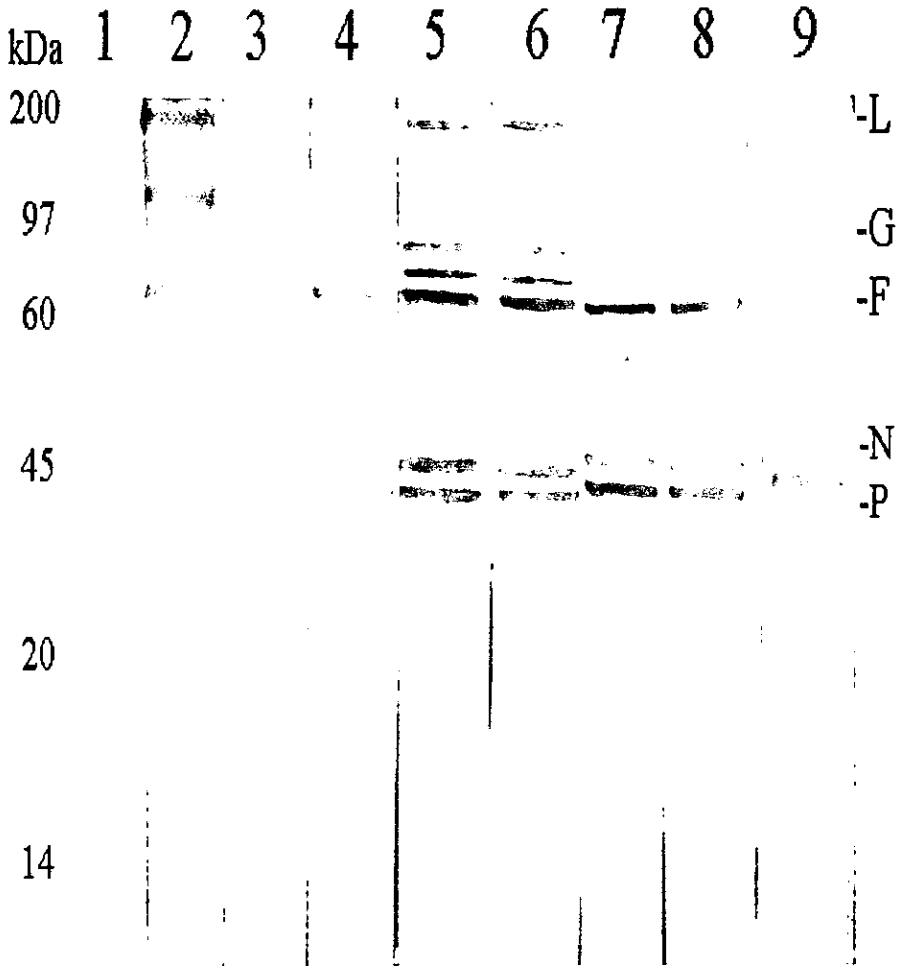


Figura 8.- Inmunoblot de proteínas de células HEP-2 infectadas con el RSV a MOI de 1. Carril 1 marcador de peso molecular. Carril 2 virus purificados por gradiente de sacarosa. Carril 3 células no infectadas e incubadas con suero anti-RSV. Carril 4 y 5 células infectadas con RSV a las 6 y 12 horas post-infección respectivamente. Carril 6 células infectadas con RSV e incubadas con suero pre-inmune. Carril 7, 8 y 9 células infectadas e incubadas con suero anti-RSV a una concentración 1:10, 1:7 y 1:5 respectivamente.

6.8 ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO DEL ENSAYO DE INMUNOTRANSFERENCIA.

La concentración de los antígenos virales en las diferentes bandas se determinó a través del análisis densitométrico utilizando el programa Kodak Omat Digital Analysis Sistem y los resultados se muestran en la tabla No. 3

VALORES OBTENIDOS DEL ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO DEL ENSAYO DE INMUNOTRANSFERENCIA

| Marcador de estandar de peso molecular | Virus Purificado | Células sin infectar | Células infectadas a las 6 hrs. | Células infectadas a las 12 hrs. | Células infectadas e incubadas con suero preimmune | Células infectadas + suero anti-RSV 1:10 | Células infectadas + suero anti-RSV 1:7 | Células infectadas + suero anti-RSV 1:5 |
|--|------------------|----------------------|---------------------------------|----------------------------------|--|--|---|---|
| 200 | 6750 | | | 5450 | 5013 | | | |
| 90 | 24320 | | 5262 | 17204 | 15005 | 8150 | 6345 | |
| 70 | 7835 | 328 | 2766 | 7545 | 7855 | 10931 | 4302 | |
| 60 | 25220 | 175 | 5159 | 10469 | 10047 | 13322 | 8005 | 6959 |
| 40 | 10921 | | 15451 | 26686 | 24313 | 18143 | 12773 | 8414 |
| 30 | 4317 | | 6298 | 12453 | 11138 | 10621 | 8389 | 5329 |

Los resultados del análisis densitométrico revelan que del extracto de células infectadas a las 6 horas se detectan 5 bandas, mientras que a las 12 horas aparece una más 6 bandas con peso molecular de 200, 90, 70, 60, 40 y 30 kDa. Estas bandas coinciden perfectamente con las detectadas en el carril del virión purificado. En el extracto de células infectadas e incubadas en presencia de suero preimmune se detectan las mismas 6 bandas que en las células infectadas a las 12 horas y además con prácticamente la misma concentración, lo cual indica que la incubación con el suero preimmune no altera la síntesis de los antígenos virales. Por lo que respecta a los extractos de células infectadas e incubadas en presencia de suero anti-RSV se observa que a la concentración de 1:10 desaparece la banda de 200 kDa, se reduce la concentración de 15-50% de 3 bandas (90, 40 y 30 kDa) comparado con el extracto de células infectadas por 12 horas. En la concentración de suero anti-RSV 1:7 no se observa la banda de 200 kDa y se reduce en 1.5-3 veces la concentración de las restantes 5 bandas detectadas en la concentración de suero anti-RSV 1:10. Finalmente a la máxima

concentración de suero anti-RSV empleado (1:5) desaparecen otras dos bandas de 90 y 70 kDa y en las otras tres bandas se reduce los valores de densidad óptica de 2-3 veces.

Estos resultados indican que células infectadas con RSV e incubadas con suero anti-RSV se reduce la concentración de 3 bandas con pesos moleculares aparentes de 60, 40 y 30 kDa; y desaparecen tres bandas (200, 90 y 70 kDa), que por el peso molecular podrían corresponder a las proteínas virales L, G y F.

7. DISCUSIÓN:

En este trabajo se abordó el estudio de inmunomodulación de los antígenos del RSV por anticuerpo antiviral. Este fenómeno se ha reportado con virus de envoltura y con genoma viral de DNA y RNA *in vivo* e *in vitro* (76, 77, 78).

Las técnicas que se emplearon para determinar el efecto del anticuerpo antiviral sobre los antígenos virales fueron: inmunofluorescencia indirecta, citometría de flujo (FACS) e inmunotransferencia.

Los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron a tiempos de incubación cortos y largos; los resultados de la incubación a tiempos cortos demuestran que a los 10 minutos se observa disminución en la intensidad de fluorescencia y los antígenos virales se desplazan a un sólo sitio de la célula formando casquetes (capps), los cuales se visualizaron en el 30% de las células infectadas. A los 20 minutos de incubación los casquetes son claramente evidentes y todos los antígenos se concentraron en un solo sitio de la célula; además a este tiempo el porcentaje de células que presentan casquetes se incremento al 60%. Al incubar por tiempos largos (6 horas), en la muestra problema se observa menor intensidad de fluorescencia y diferente distribución de los antígenos virales; sin embargo no se detecta capping.

Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta se realizaron con células permeabilizadas permitiendo así la determinación de la totalidad de los antígenos virales. Los resultados pueden resumirse de la siguiente manera. La intensidad de fluorescencia disminuye al incubar las células infectadas con el anticuerpo antiviral por tiempos cortos y largos; en cambio capping solo se observa al incubar por tiempos cortos. El hecho de que el capping no se observe a tiempos largos podría deberse a que en el momento en que se hace la

observación la concentración de suero anti-RSV en el medio no es suficiente para aglomerar los antígenos virales. Es probable que en el transcurso de 20 minutos a 6 horas de incubación la concentración de anticuerpo anti-RSV disminuyó gradualmente debido a que forman capping y estos complejos antígeno-anticuerpo son expulsados al medio o bien pueden ser internalizados y degradados. La expulsión del complejo antígeno-anticuerpo al medio extracelular así como su internalización y degradación se ha reportado en otros sistemas virales de modulación de antígenos por el anticuerpo.

Nuestros resultados de inmunofluorescencia son congruentes con los reportados en rabia y sarampión. En células de neuroblastoma infectadas con rabia e incubadas con el anticuerpo se reporta que a los 10 minutos de incubación, el anticuerpo indujo la formación de capping y al prolongar la incubación por 120 minutos los complejos antígeno-anticuerpo fueron expulsados al espacio extracelular.

En sarampión se reporta que células HeLa infectadas e incubadas con anticuerpo durante 30 minutos se presentó capping en 30-50% de las células; sin embargo al incubar por más tiempo se comprobó el desplazamiento de los antígenos virales a un sólo sitio de la célula. La heterogeneidad del capping en la población celular puede deberse a su estado metabólico como lo sugieren Oldstone y Joseph (61, 77). En este mismo sistema se comprobó que la modulación del antígeno por el anticuerpo, no se observa al tratar con inhibidores de polimerización de microtubulos (oligomicina D, colchicina, citocalasina D), estas observaciones indican que para que se presente el fenómeno se requiere que la célula se encuentre metabólicamente activa.

Ensayos con células de riñón infectadas con el virus de seudorabia sugieren la participación del citoesqueleto en la formación de capping, ya que el porcentaje de células que presenta capping se reduce cuando se utilizan inhibidores de la polimerización de microtúbulos.

Además también se comprobó que el 47% de las células mostraron capping de los antígenos a los 30 minutos; dos horas después de la incubación, los complejos antígeno-anticuerpo fueron expulsados al medio extracelular. En los complejos expulsados se comprobó la presencia de la F-actina, lo cual indica la participación de los microtubulos (61).

En ensayos con el RSV en células HEP-2 y HeLa se comprobó que el citoesqueleto participa en el ensamble de la partícula viral, ya que se ha demostrado que transporta las proteínas de la nucleocápside a la parte interna de la membrana celular; sin embargo no se descarta que otras proteínas virales estén implicadas en este proceso (79, 80). Con base en los reportes anteriores, es muy probable que las proteínas del citoesqueleto estén participando de manera activa en el desplazamiento de los antígenos virales observado por nosotros.

La concentración de los antígenos virales en la membrana celular se determinó por ensayos de citometría de flujo. Los valores de intensidad promedio de fluorescencia obtenidos en dos diferentes ensayos muestran un incremento del 30-40% a las 12 horas de infección con respecto a los observados a las 6 horas (3655 vs 2662, 507 vs 284); lo cual indica un incremento en la concentración de los antígenos virales en la membrana celular. En cambio cuando las células infectadas por 6 horas se incubaron otras 6 horas con anticuerpo se observo que el valor promedio de intensidad de fluorescencia, es similar al observado a las 6 horas de infección (2593 vs 2662, 237 vs 284). Estos resultados indican que la concentración de antígenos virales en estos dos tratamientos no cambió en forma significativa. Los resultados de citometría de flujo demuestran claramente que la incubación con el anticuerpo anti-RSV de células infectadas disminuye de manera significativa la concentración de los antígenos virales de la membrana celular.

La similitud en los valores de intensidad de fluorescencia observados podría explicarse de dos maneras posibles: que la síntesis de proteínas virales se haya detenido o reducido al momento de iniciar la incubación con el suero anti-RSV; o que exista una constante síntesis y/o eliminación de los antígenos virales que se encuentran presentes en las células infectadas.

La concentración de las bandas detectadas en el ensayo de inmunotransferencia se analizó por densitometría y permitió obtener un valor confiable del peso molecular de las proteínas virales así como de su concentración. En este análisis encontramos que a la concentración de suero anti-RSV 1:5 desaparecen (o no son detectadas por nuestro sistema) tres bandas con peso molecular de 200, 90 y 70 kDa, que podrían corresponder a las proteínas virales L, G y F, respectivamente. Por otra parte se observa que disminuye la concentración de otras tres proteínas con peso molecular de 60, 40 y 30 kDa, estas proteínas por el peso molecular corresponderían a las formas no procesadas de F y G (60 y 30 kDa); la proteína N (40 kDa) o a P y M (32 y 30 Kda). También hay que mencionar que a la concentración 1:10 de suero anti-RSV utilizada se observa en dos de las bandas (70 y 60 kDa) un aumento en la densidad óptica con respecto al control; esto podría explicarse de la siguiente manera: debido a la incubación con el anticuerpo se halla detenido la síntesis y/o glicosilación de alguna(s) proteína(s) virales y este incremento se deba a la suma de proteínas truncadas o no glicosiladas y proteínas completas.

La confirmación exacta de la identidad de las proteínas virales que desaparecen y disminuyen en su concentración requiere del análisis de ensayos de inmunotransferencia utilizando anticuerpos específicos contra cada proteína viral.

Los resultados de inmunotransferencia demuestran correlación entre la disminución de la concentración de los antígenos virales (a tal grado que desaparecen tres bandas) y la

concentración de suero anti-RSV utilizada. Nuestros resultados coinciden con los reportados en sarampión e influenza (57, 67, 68, 78) donde se encontró que a mayor concentración de suero antiviral empleado para incubar las células infectadas menor concentración de antígenos virales detectados.

Los ensayos de inmunotransferencia y de citometría de flujo realizados a tiempos largos y con suero anti-RSV 1:5 son congruentes; en inmunotransferencia desaparecen tres bandas, que por el peso molecular podrían corresponder a las proteínas L, F y G; y por citometría de flujo disminuye la concentración de las proteínas F y G.

Los resultados de la desaparición de tres proteínas y la disminución en la concentración de otras tres puede deberse al hecho de que al desaparecer la proteína L, la cual tiene actividad de polimerasa, se ocasionaría la disminución en la síntesis de todas las proteínas virales.

La interacción antígeno-anticuerpo en la membrana celular en experimentos con virus influenza, parainfluenza, seudorabia y estomatitis vesicular sugiere que dicha interacción ocasiona cambios conformacionales en los dominios citoplasmáticos de los antígenos de membrana de tal manera que puedan quedar expuestos residuos de aminoácidos (serina, tirosina y treonina) susceptibles de ser fosforilados y dicha fosforilación puede interferir en la transcripción y/o traducción viral. (63, 81, 82, 83).

Los dominios citoplasmáticos de las glicoproteínas F y G presentan residuos de aminoácidos susceptibles a ser fosforilados (F: VVKKR-KAKAP-NGYPK-TTGQS-NMGYIS; y G: MSKNK-DQRTA-KTLER-TWDTL-NHLLF-ISSCL-YKLNK-KSV, donde Y, S y T son tirosina, serina y treonina). Esto nos puede sugerir que muy probablemente estos residuos de aminoácidos jueguen un papel importante en la

disminución de la concentración de los antígenos virales que observamos en las inmunofluorescencias y en las inmunotransferencias.

8. CONCLUSIONES:

Con los resultados obtenidos en este trabajo se pueden realizar las siguientes conclusiones:

- a) La incubación de células HEp-2 después de 6 horas post-infección con suero policlonal anti-RSV por tiempos cortos (10-20 minutos) originó una disminución en la concentración de los antígenos virales presentes en la célula y una redistribución (capping) de estos.
- b) La incubación con suero policlonal de estas mismas células por tiempos largos (6 horas) provocó tres cambios importantes de los antígenos virales; (1) que estos se encontraran ausentes en la región central de la célula; (2) que la cantidad de antígenos virales presentes en la membrana celular se redujera prácticamente en un 50%; y (3) que la concentración de los antígenos virales en los extractos celulares se redujera, a tal grado que llevó a la desaparición de tres de las proteínas virales.

9. APÉNDICE

MEDIO DE CRECIMIENTO:

Se disuelven en un litro de agua destilada 12.2 grs de medio MEM, 2.2 grs de Hepes y 2.2

grs

de Bicarbonato de sodio.

Se ajusta el pH a 7.2-7.4 y se filtra por membrana de 0.22 μm .

El medio se suplementa con 10% de suero fetal bovino, (inactivado a 56°C durante 30 minutos), 100 UI/ml de penicilina, 100 μg de estreptomycinina y 1% de glutamina.

MEDIO DE INFECCIÓN:

El medio de infección es igual al medio de crecimiento, la única diferencia es que este lleva solamente 2.5% de suero fetal bovino.

SOLUCIÓN PARA CONGELAR VIRUS:

Se prepara una solución al 2 M de sulfato de magnesio y se esteriliza por autoclave a 120 libras de presión durante 20 minutos. Para que esta solución pueda ser empleada como medio de congelamiento, hay que diluirla 10 veces, es decir llevarla al 0.2 M, empleando para esto la suspensión viral que se va a congelar.

PRECIPITACIÓN DE VIRUS:

A la suspensión viral a precipitar 8% p/v de polietilenglicol 8000.

Se disuelve perfectamente el PEG y se deja incubando a 4°C toda la noche.

AMORTIGUADOR TEN

0.5 M de Tris, 1 mM EDTA y 0.15 M NaCl, se esteriliza por autoclave.

SOLUCIONES PARA PURIFICACIÓN DE Ig-G's.

Solución de lavado: Amortiguador de fosfatos 0.5M pH 8.0 (fosfato de sodio monobásico 0.5M y fosfato de sodio dibásico 0.5M).

Solución de lavado: Amortiguador de fosfato 0.1M pH 8.0.

Solución de elusión: ácido acético 0.1M y NaCl 0.15M.

Solución de neutralización: 100 µl de TrisHCl 1M pH 8.0.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS PBS

NaCl 130 mM, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 6 mM y KH₂PO₄ 1 Mm. Esterilizar por autoclave.

AMORTIGUADOR DE LISIS PARA EXTRACTOS CELULARES

10 mM TrisHCl pH 7.5, 140 mM NaCl, 1% tritón X-100, 1% desoxicolato de sodio. La solución debe mantenerse a 4°C.

AMORTIGUADOR DE CARGA PARA PROTEINAS:

2% SDS, glicerol 10%, Tris HCl pH 6.8 80 mM, azul de bromofenol 0.01% y 2-β-mercaptoetanol al 5%.

AMORTIGUADOR DE CORRIDA PARA ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS:

Tris base 0.25M, glicina 0.192M y SDS 0.1%.

AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS:

25 mM de Tris HCl, 192 mM de glicina y 20 % de metanol pH 8.3.

SOLUCIÓN DE ROJO DE PONCEAU:

20 ml del reactivo(SIGMA) disuelto en 180 ml de H₂O.

SOLUCIÓN DE INCUBACIÓN DE MEMBRANA:

leche descremada (SVELTESS) al 5% en PBS y Tween 20 al 0.3%.

SOLUCIÓN REVELADORA DE LA MEMBRANA:

4.8 mg del 4 cloro-naftol, 1,6 ml de metanol frío, 8 ml de TrisHCl 10mM pH 7.5-NaCl 0.14M y 4 µl de H₂O₂ al 30%.

SOLUCIÓN DE POLI-L LISINA:

poli-L-lisina 10 µg/ml.

SOLUCIÓN DE LAVADO PARA IFA:

Albúmina Sérica Bovina 0.1%, tween 20 al 0.05% en PBS.

SOLUCIÓN DE FIJACIÓN DE CÉLULAS PARA FACS:

Paraformaldehído al 0.5% en PBS pH 7.5.

MATERIALES Y REACTIVOS

LINEA CELULAR

- Células HEp-2 (ATCC CCL 23) Carcinoma epidermoide de laringe humano. Donadas al laboratorio por el Dr. Michael Trudel (Instituto Armand Frappier, Ville de Laval, Cánada).
- Virus Sincitial Respiratorio, Cepa Long (ATCC VR 26). Donado al laboratorio por el Dr. Michael Trudel (Instituto Armand Frappier, Ville de Laval, Cánada).

ANTICUERPOS COMERCIALES

- Anticuerpo policlonal de burro anti-conejo conjugado con FITC (Amersham N1034).
- Anticuerpo policlonal de burro anti-conejo conjugado a peroxidasa (Amersham NA934).

ADYUVANTES:

- Adyuvante completo de Freund (Sigma No. F-4258)
- Adyuvante incompleto de Freund (Sigma No. F-5506)

MATERIAL DESECHABLE

- Botellas para cultivo de tejidos de 150 cm² (Costar No. 3151)
- Botellas para cultivo de tejidos de 25 cm² (Costar No. 3050)
- Cajas de petri para cultivo de tejidos de 100 mm (Costar No.3100)
- Cajas de petri para cultivo de tejidos 60 mm (Falcon No. 3002)
- Camara para inmunofluorescencia de 8 pozos (Nunc No. 177445)
- Placas para cultivo de tejidos de 96 pozos (Falcon No.3072)
- Placas EIA/RIA de 96 pozos (Costar No. 3590)
- Puntas para micropipetas 20-200 µl (Gibco-BRL 14867-014), 200-1000 µl (Gibco-BRL 14868-012)
- Raspadores (Costar No. 3008)
- Tubos 12X75 mm para lectura de FACS (Falcon No. 2054)

MEDIO Y SUPLEMENTOS PARA CULTIVO

- MEM (Gibco-BRL No.12100-046)
- Suero fetal bovino (Bioexport No.201) irradiado.

- Hepes (Sigma No. H-0763)
- Bicarbonato de sodio (Productos quimicos Monterrey No. 1290)
- Penicilina G (Sigma No. P-3032)
- Sulfato de estreptomicina (Sigma No. S-6501)
- L- Glutamina (Sigma No. G 7029)

REACTIVOS QUIMICOS

- Acetona (Química dinámica No.A0500)
- Acido acético (J.T.Baker No.9507)
- Acido etilendiaminotetracético EDTA (J.T.Baker No.8993)
- Acrilamida (BIO-RAD No. 161-0100)
- Albúmina sérica bovina (Sigma No. A-4503)
- Azul tripano (Sigma No.T-0776)
- Carbonato de sodio (J.T.Baker No.790)
- Citrato de sodio (J.T.Baker No. 3646)
- Cloruro de potasio (Merck No. L 10657ON)
- Cloruro de sodio (Merck No. L 206160R)
- 4 Cloro Naftol (Sigma No. C8302)
- Fosfato de potasio dibasico (J.T.Baker No.3828)
- Fosfato de sodio monobasico (J. T. Baker No.3818)
- Hidróxido de sodio (Merck No.6498)
- Tripsina de pancreas bovina (Sigma No. 1989)
- Trisma Base (Sigma T-7149)
- Azul de Bromofenol (Sigma No. B 6896)
- Beta-Mercapto etanol (Gibco BRL No. 21985-023)
- Desoxicolato de sodio (Sigma No. D 5670)
- Glicerol (Merck No. M 32034)
- Glicina (Sigma No. G 4567)
- Leche descremada (Sweetles)
- Metanol (EM No. Cas 67-56-1)
- Paraformaldehido (Sigma No. P 6141)
- Peroxido de hidrógeno (Anachem B 2103)
- Polietilenglicol (Sigma No. P2263)
- Poli-L lisina (Sigma No. P2636)
- Rojo de Ponceou (Sigma No. P 7767)
- SDS (Sigma No. L 3761)
- Sulfato de Magnesio (Sigma No. M7506)
- Tris HCl (Sigma No. T 6791)
- Triton (Sigma No. 9284)
- Tween 20 (Sigma No. P 13 79)

10. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Gardner PS. Respiratory syncytial virus infections. *Postgrad Med J.* 1973; 49:788-791.
- 2.- Hogg CJ, Wright AL, Martínez FD, Ray CG, Taussig LM, Lebowitz MD. Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life. *Am J Epidemiol.* 1991;133:1135-1151.
- 3.- Parrott RH, Kim HW, Arrobio JO, et al. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection. Infections and disease with respect to age, immunologic status, race and sex. *Am J Epidemiol.* 1973; 98:289-300.
- 4.- Simoes EA. Respiratory syncytial virus infection. *THE LANCET.* 1999; 354: 847-852.
- 5.- Dowell SF, Anderson LJ, Gary HE, *et al.* Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. *J Infect Dis.* 1996; 174: 456-462.
- 6.- Garcia-Barreno B, Palomo C, Peñas C, *et al.* Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus f and g glycoproteins. 1989. *Journal of virology.* 63: 925-932.
- 7.- Anderson L J, Hierholzer JC., Tsou., et al . Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis.* 1985;151:626-633.
- 8.- Gimenez HB, Hardman N., Keir HM., Cash P. Antigenic variation between human respiratory syncytial virus isolates. *J Gen Virol.* 1986;863:870.
- 9.- Hendry RM., Talis AL., Godfrey E., Anderson LJ., Ferni BF., McIntosh K. Concurrent circulation of antigenically distinct strains of respiratory syncytial virus during community outbreak. *J Infect Dis.* 1986;153:291-297.
- 10.- Mufson MA., Orvell C., Rafner B., Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 1985;66:211-2124.
- 11.- Johnson PR., Olmsted RA., Prince GA. Antigenic relatedness between glycoproteins human of respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation of contributions of F and G glycoproteins of immunity. *J Virol.* 1987;61:3163-3166.
- 12.- Weber MW, Mulholland EK, Greenwood BM. Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. *Trop Med Int Health.* 1998; 3:268-280.
- 13.- Sistema nacional de vigilancia epidemiológica. Secretaría de salud. México. 2000. 17: 4-19.

14.- Garenne M, Ronsmans C, Campbell H. The magnitude of mortality from acute respiratory infections in childrens under 5 years in developing countries. *World health stat* .1992; 45: 180-191.

15.- Bachi T., Howe C. Morphogenesis and ultrastructure of respiratory syncytial virus. *J Virol*. 1973; 12:1173-1180.

16.- Joncas J., Berthiaume L., Pavilanis P. The structure of respiratory syncytial virus. *Virology*.1969;38:493-496.

17.- Norrby E., Marusyk H., Orvell C. Ultrastructural studies of multiplication of respiratory syncytial virus. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1970;78-268.

18.- Dickens LE, Collins OL., Wertz GW. Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus. *J Virol*. 1990;52:364-369.

19.- Barik S. The structural of the 5' terminal cap of the respiratory syncytial virus mRNA. *J Gen Virol*.1993;74:485-490.

20.- Collins PL.,Olmsted RA., Spriggs MK., Johnson PR., Buckler-Withe AJ. Gene-overlap and site-specific attenuation of transcription of the viral polymerase gene of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci*. 1987;84:5134-5138.

21.- Collins PL., Mottet G. Oligomerization and post-tranlational processing of glycoproteins G human respiratory syncytial virus: altered O-glycosilation in the presence of brefeldin A. *J Gen Virol*. 1992;73:849-863.

22.- Wertz GW., Kreiger M., Ball LA. Strucsture cell surface maturation of attachment glycoprotein of human respiratory syncytial virus in a cell line deficient in O-Glycosolation. *J Virol*.1989;63:4767-4776.

23.- Johnson PR., Springss MK.,Olmsted RA., Collins PL. The G glycoproteins of human respiratory syncytial virus of subgrups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Natl Acad Sci*.1987;84:5625-5629.

24.- Collins PL. O glycosilation of glycoprotein G of human respiratory syncytial virus is specified within the divergent Ectodomain. *J Virol*.1990;64:4007-4012.

25.- Walsh EE., Hruska J. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus protein: identificationof the fusion protein. *J Virol*. 1983;47:171-177.

26.- Collins PL.,Huang YT., Wertz WG. Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein human respiratory syncytial virus. *Pro Natl Acad Sci*. 1984;81:7683-7687.

27.- Horvath JF., Lamb RA. Studies on the fusion peptide of a paramixovirus fusion glycoprotein: roles ofconserved residues in cell fusion. *J Virol*. 1992;66:4901-4908.

28.- Johnson PR., Collins PL. The fusion glycoprotein human respiratory syncytial virus of subgroups A and B: sequence conservation provides a structural basis for antigenic relatedness. *J Gen Virol.*1988;69:2623-2628.

29.- Collins PL.,Olmsted RA.,Johnson PR. The small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus: comparison between antigenic subgroup A and B. *J Gen Virol.* 1990;71:1571-1576.

30.- Olmsted RA., Collins PL. The 1 A protein of respiratory syncytial virus is an integral membrane protein present as multiple, structurally distinct species. *J Virol.*1989;63:2019-2029.

31.- Navarro J., Lopez-Ortin C., Vallanueva N. Location of phosphorylated residues in human respiratory syncytial virus phosphoprotein. *J Gen Virol.* 1991;72:1455-1459.

32.- Stec DS., Hill MG., Collins PL. Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. *Virology.*1991;183:273:287.

33.- Barr J., Chambers P., Pringle CR.,Easton AJ. Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumovirus, paramixovirus, rhabdovirus and filovirus. *J Gen Virol.* 1991;72:677-685.

34.- Garcia J., Garcia-Barreno B., Vivo A., Melero JA. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cell: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and 22K protein. *Virology.* 1992;195:243:247.

35.- Samal SK., Pastey MK., MacPhillips TH., Mohanty SB. Bovine respiratory syncytial virus nucleocapsid protein expressed in insected cells specifically interacts with phosphoprotein and the M2 protein. *Virology;*1993:470:473.

36.- Huang YT., Collins PL., Wertz GW. Characterization of the ten proteins human respiratory syncytial virus: identification of fourth envelope-associated protein. *Virus Res.* 1985;2:157-173.

37.- Walsh EE., Schlesinger JJ., Brandriss MW. Purification and characterization of GP90, one the envelope glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 1984;65:761-767.

38.- Bachi T. Direct observation of the budding and fusion of an enveloped virus by video microscopy of viable cell. *J Cell Biol.* 1988;107:1689:1695.

39.- Huang YT., Wertz GW. The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for least seven mRNA species. *J Virol.* 1982;43:150-157.

- 40.- Dickens LE, Collins OL., Wertz GW. Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus. *J Virol.* 1990;52:364-369.
- 41.- Cannon MJ, Stott EJ, Taylor G. et al. Clearance of persistent respiratory syncytial virus infection in immunodeficient mice following transfer of primed T cells. *Immunology.* 1987; 62: 133-138.
- 42.- Cannon MJ, Openshaw PJM, Askonas BA. Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus. *J Exp Med.* 1988; 168: 1163-1168.
- 43.- Graham BS. Pathogenesis of respiratory syncytial virus vaccine-augmented pathology. *Am F Respir Crit Care Med.* 1995; 152: 63:66.
- 44.- Roberts NJ. Different effects of influenza virus, respiratory syncytial virus and sendai virus on human lymphocytes and macrophages. *Infect Immun.* 1982; 35: 1142-1146.
- 45.- Oldstone MB. Viral persistence (Minireview). *Cell.* 1989; 56; 517-520.
- 46.- McIntosh K. Chanock RM. Viral persistence. In Fields BN Knipe DM. *Field's Fundamental virology.* 3rd ed. New york: Raven Press. 1996.
- 47.- de la Torre JC and Oldstone MB. Anatomy viral persistence: mechanisms of persistence and associated disease. *Advances in virus research.* 1996;46: 311-341.
- 48.- Paul K., Hengartner H and Zinkernagel RM. A non retroviral RNA virus persists in DNA form. *Nature.* 1997; 390: 298-301.
- 49.- Oldstone M and Buchmeier M. Restricted expression of viral glycoproteins in cells persistently infected mice. *Nature.* 1982;300:360-362.
- 50.- Pringle CR. Paramyxovirus and disease. In *molecular basis of virus disease.* WC Russell et al. Cambridge University press, UK. 51-91.
- 51.- Pringle CR. Shirodaria P. Cash DJ et al . Initiation and maintenance of persistent infection by respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 1978; 28: 199-211
- 53.- Goldman MB., O'Bryan TA., Buckthal DJ., Tetor LD.,Goldaman JN. Suppression of measles virus expression by noncytolytic antibody in an immortalized macrophage cell line. *J Virol.* 1995;69:734-740.
- 54.- Fujinami RS., Oldstone MB. Antiviral antibody reacting on the plasma membrane alters measles virus expression inside the cell. *Nature;*279;529-530.
- 55.- Fujinami RS., Oldstone MB. Alterations in expression of measles virus polypeptides by antibody-induced antigenic modulation. *J Immunology.* 1980;125:78-85.

- 56.- Fujinami RS., Norby E., Oldstone MB. Antigenic modulation induced by monoclonal antibodies: antibodies to measles virus hemagglutinin alters expression of other viral polypeptides in infected cells.
- 57.- Barret PN., Koschel K., Carter M., Meulen VT. Effect of measles virus antibodies on a measles SSPE virus persistently infected C6 rat glioma cell line. *J Gen Virol.*1985;66:1411-1421.
- 58.- Schneider-Schaulies S., Liebert UG., Segev Y., et al. Antibody-dependent transcriptional regulation of measles virus in persistently infected neural cells. *J Virol.* 1992;66:5534-5541.
- 59.- Chantler JK., Davies MA. The effect of antibody on rubella virus infection in human lymphoid cells. *J Gen Virol.*1987;68:1677-1288.
- 60.- Abernathy ES., Wang CY., Frey TK. Effect of antiviral antibody on maintenance of longterm rubella virus persistent infection in vero cells. *J Virol.* 1990;64:5183-5187.
- 61.- Favoreel HW., Nauwynck HJ., Oostveldt VP. et al. Antibody-induced and cytoskeleton-mediated redistribution and shedding of viral glycoproteins, expressed on pseudorabies virus-infected cells. 1997;71:8254-8261.
- 62.- Rutter G., Mannweiler K. Antibody-induced redistribution of virus antigens on the surface of influenza virus-infected cells. *J Gen Virol.*1976;33:321-332.
- 63.- Lydy SL., Compans RW. Role of the cytoplasmic domains of viral glycoproteins in antibody-induced cell surface mobility. 1993;67:6289-6294.
- 64.- Sadzot-Delvaux C., Marc P., Lebon L. et al. Antibodies to varicella-zoster virus modulate antigen distribution but fail to induce viral persistence in vitro. 1992;66:7499-7504.
- 65.- Rodriguez JE., Moninger T., Grose C. Entry and egress of varicella virus bloqued by same anti-gh monoclonal antibody. 1993;196:840-844.
- 66.- Rammohan KW., McFarland HF., McFarlin DE. Induction of subacute murine measles encephalitis by monoclonal antibody to virus hemagglutinin. *Nature.*1981;290:588-589.
- 67.- Liebert UG., Schneider-Schaulies S., Baczko K., Meulen VT. Antibody-induced restriction of viral gene expression in measles encephalitis in rats. 1990;64:706-713.
- 68.- Treanor JJ., Tierney EL., Zebedee SL. et al. Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replications in mice. *J Virol.* 1990;64:1375-1377.
- 69.- Levine B., Griffin DE. Persistence of viral RNA in mouse brains after recovery from acute alphavirus encephalitis. *J Virol.* 1992;66:6429-6435.

- 70.- Buchmeier MJ., Lewicki HA., Talbot PJ., Knobler R. Murine hepatitis virus- 4 (Strains JHM)-induced neurologic disease is modulated in vivo by monoclonal antibody. *Virology*. 1984;270:261-270.
- 71.- Alexanderse S., Larsen S., Cohn A., et al. Passive transfer of antiviral antibodies restricts replication of aleutian mink disease parvovirus in vivo. *J Virol*. 1989;63:9-17.
- 72.- Alexanderse S., Stoorgaard T., Kamstrup N., et al. Pathogenesis of aleutian mink disease parvovirus infection: effects of suppression of antibody response on viral mRNA levels and on development of acute disease. *J Virol*. 1994;68:738-749.
- 73.- Gaertner DJ, Jacoby RO, Paturzo FX, et al. Modulation of lethal and persistent rat parvovirus infection by antibody. *Virology*. 1991; 118:1-9.
- 74.- *Methods and techniques in virology*. 1993. Payment P., Trudel M. 3° Ed. Marcel Dekker. USA. 31-35 pps.
- 75.- Meyer RJ., Walker JH. 1987. *Immunochemicals methods in cell and molecular biology*. London academic pres. 215-217 pps.
- 76.- Levine B., Hardwick MJ., Bollinger RC., et al. Antibody-mediated clearance of alphavirus infection from neurons. *Science*. 1991;254:856-860.
- 77.- Joseph BS., Oldstone MB. Antibody-induced redistribution of measles virus antigens on the cell surface. *J Immunology*. 1974;113:1205-1209.
- 78.- Hughey PG., Roberts PC., Compans RW., et al. Effects of antibody to the influenza A virus M2 protein on M2 surface expression and virus assembly. *Virology*. 1995;212:411-421.
- 79.- Ulloa L., Asenjo A., Serra R., Villanueva N. Interactions between cellular actin and human respiratory syncytial virus. *Virus Reserch*. 1988;53:13-25.
- 80.- García-Barreno B., Jorcano JL., Aukenbauer T., et al. Participation of cytoskeletal intermediated filaments in the infectious cycle of human respiratory syncytial virus. *Virus Reserch*. 1988;9:307-322.
- 81.- Doms RW., Ruusala A., Machamer C., et al. Differential effects of mutations in three domains on folding, quaternary structure, and intracellular transport of vesicular stomatitis virus G protein. *J Cell Biology*. 1988;107:89-99.
- 82.- Lin-Jung G., Ruusala A., Cao H., Rose JK. Effects of altered cytoplasmic domains on transport of the vesicular stomatitis virus glycoprotein are transferable to other proteins. *Mol Cell Biol*. 1988;8:2869-2874.

83.- Jing H, Leser PG, Zhang J, Lamb RA. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase cytoplasmic tails control particle shape. EMBO.1997;16:1236-1247.