

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA

12

ALTERACIONES EN LAS FUNCIONES DEL MACRÓFAGO  
ASOCIADAS A LA PERSISTENCIA DEL VIRUS SINCIETAL  
RESPIRATORIO

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS  
P R E S E N T A :  
M. en C. MARÍA ANTONIETA GUERRERO PLATA



MÉXICO, D.F.

2001

30019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*"...una fuerza que parece ser negativa, pero que de hecho te muestra como realizar tu destino. Esta prepara tu espíritu y tu voluntad, porque hay una gran verdad sobre este planeta: quien quiera que tú seas, o lo que sea que tú hagas, cuando realmente deseas algo es porque ese deseo se originó en el alma del Universo."...*

*"Y, cuando tú deseas algo con la fuerza de tu corazón, todo el Universo conspira para ayudarte a lograrlo."*

*Paulo Coelho. "El Alquimista"*

... *Carolina Plata* y *Efrén Guerrero*, por cuidarme siempre dándome libertad... por enseñarme que la fortaleza del espíritu permite agrandar las alas que nos conducen a volar y alcanzar cualquier sueño pero sin despegar jamás los pies de la tierra

A mis hermanos: *Xóchitl, Pedro, Juany, Sandra* y *Claudia*...

... A mis sobrinos... mis niños. *Arantxa, Montserrat, Arturo* y *Fernando*...

.. A mis cuñados: *Elvira, Arturo* y *Fernando*...

. Con mi corazón a todos ellos por ser lo más importante y fundamental en mi vida, por ser mi familia y apoyarme en todo y siempre

*Agradezco y dedico también esta tesis a mi Tutora de Doctorado.*

***DRA. BEATRIZ GOMEZ GARCIA***

*a quien debo mi formación académica a lo largo de todos los años que trabajé en su laboratorio y quien fue siempre y en todo momento mi incondicional apoyo y además amiga.*

Un agradecimiento especial y con cariño a *Jesús Nuñez e Ignacio Palacios* por su desinteresada ayuda dentro y fuera del laboratorio a lo largo de todos estos años... Por su inmejorable y esencial trabajo de apoyo en el laboratorio.

A *Sr. Pauline* por su valioso apoyo, sus consejos y buena disponibilidad de ayuda durante mi alojamiento en Londres.

A la Dra. *Haydeé Torres* por su amistad y por su ayuda siempre oportuna.

A la Lic. *Teresa García* por la incondicionalidad de esa amistad que nos une.

A mis queridos *Carlos, Gerardo y Rafael* por "tomar el riesgo" y aceptar trabajar conmigo.

A *Eva* con agradecimiento por toda su ayuda y disponibilidad en los trámites académicos, pero sobre todo por su amistad.

Al *Dr. Miguel Morales* por su valioso ayuda con las fotografías incluidas en este trabajo.

A *Claudia Garay* por su excelente asistencia técnica en la parte experimental de esta tesis.

A mis compañeras de laboratorio: *Rosa Elena, Rocío y Laura*.

A la *Dra. Rosana Pelayo* por la crítica revisión del manuscrito de esa tesis y sus valiosas sugerencias.

Al *Dr. Vianney Fco. Ortiz Navarrete* por su valiosa contribución y sus acertadas críticas durante la realización de este trabajo de tesis.

Al *Dr. Mario César Salinas Carmona* y al *Dr. Enrique Ortega* por asesoría como miembros del comité tutorial.

A la *Dra. Tracy Hussell* por su valiosas observaciones hechas a la parte experimental de este trabajo.

A mi querida *Ethel Villanueva*, mi eterno agradecimiento por ese apoyo incondicional para alcanzar mis metas... Por los valiosos consejos.

Al *Dr. Raúl Aguilar Roblero* por la confianza y por el apoyo otorgados, para lograr prolongar mi estancia fuera del país y lograr terminar la parte experimental de esta tesis.

A todos los *miembros del jurado de examen*, por contribuir con su rápida revisión del manuscrito, a que la escritura de esta tesis se concluyera este año

*Con profundo cariño y agradecimiento a las personas que han marcado mi vida, dejando en mí sus enseñanzas que habré de aplicar en mi futura vida académica...*

*Dra. Beatriz Gómez García*, por haber depositado en mí su confianza y fé ciegas... Por haber sido fundamental en mi desarrollo y crecimiento académico

*Dr. Enrique Ortega Soto*, por su apoyo incondicional desde el inicio de mis estudios de posgrado.

*Dr. Vianney Ortiz Navarrete*, por su generosidad, su rigidez académica y sobretodo por darme la oportunidad de trabajar con él.

A *Prof. Peter J.M. Openshaw*, por su inagotable generosidad que lo caracterizó durante mi estancia en su laboratorio.

A la *Prof. Ita Askonas* con toda mi admiración, por mostrarme el amor que puede llegar a profesársele a una carrera.

***Agradezco a las siguientes instituciones por las becas concedidas,  
sin las cuales no me hubiera sido posible realizar mis estudios de  
doctorado:***

Al Consejo nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por distinguirme como becaria durante mis estudios de Doctorado en México y en el extranjero.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por distinguirme como becaria durante mis estudios de Doctorado y concederme los apoyos adicionales para la realización de mi estancia pre-doctoral en Londres, G. B.

Al Programa Universitario para la Investigación en Salud (PUIS) por el apoyo otorgado para realizar mi estancia pre-doctoral en Londres, G. B.

A la FUNDACION UNAM por el apoyo otorgado dentro del Programa de Becas a Estudiantes Distinguidos para Realizar Estancias de Estudios en el Extranjero.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por los apoyos financieros otorgados durante mis estudios de Doctorado

Al CONACyT por la beca otorgada durante la fase final del Doctorado mediante el proyecto 31112-M.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por la beca otorgada durante la escritura de mi tesis doctoral mediante el proyecto N206400)



**ALTERACIONES EN LAS FUNCIONES DEL  
MACROFAGO ASOCIADAS A LA  
PERSISTENCIA DEL VIRUS SINCITAL  
RESPIRATORIO**

# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1. Aspectos generales del virus sincitial respiratorio.....	2
2. Los macrófagos y su importancia en la infección por RSV.....	4
3. Aspectos inmunes e inmunopatológicos de la infección por el RSV.....	10
4. Persistencia viral por RSV.....	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS.....	16
MATERIAL Y METODOS	
1. Virus.....	17
1.1. RSV cepa Long.....	17
1.2. Virus recombinante de vaccinia que expresa la proteína de matriz del RSV (rVV-M2).....	17
1.3. Influenza A/X31.....	17
2. Líneas celulares.....	17
2.1. P388D1.....	17
2.2. MΦP.....	17
2.3. L929.....	18
2.4. P815.....	18
2.5. A20.....	18
2.6. MDCK.....	18
2.6. HEp-2.....	18
3. Hibridomas.....	18
3.1. 2.4G2.....	18
3.2. SF1-11-1-1.....	19
3.3. 34-4-20S.....	19
3.4. 28-14-8S.....	19
3.5. B27M1.....	19
4. Animales.....	19
5. Producción de virus.....	19
5.1. Propagación de RSV.....	19
5.2. Propagación de rVVM2.....	20
5.3. Propagación de influenza virus A/X31.....	20
6. Titulación de virus por ensayo de placa.....	20
6.1. Virus sincitial respiratorio (RSV).....	20
6.2. Virus recombinante VVM2.....	21
7. Titulación de virus de influenza por ensayo de hemaglutinación.....	21

7.1. Obtención de eritrocitos.....	21
7.2. Hemaglutinación.....	21
<b>8. Amplificación del gene que codifica para la proteína N del RSV a través de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....</b>	<b>21</b>
8.1. Extracción de RNA celular total ..	21
8.2. RT-PCR.....	22
<b>9. Determinación de antígeno de RSV por tinción de inmunoperoxidasa.....</b>	<b>23</b>
<b>10. Microensayo para la determinación de proteínas.....</b>	<b>23</b>
<b>11. Actividad fagocítica mediada por receptores Fcγ.....</b>	<b>24</b>
11.1. Obtención de eritrocitos.....	24
11.2. Sensibilización de eritrocitos.....	24
11.3. Titulación del anticuerpo anti-DNP.....	24
11.4. Opsonización de eritrocitos.....	24
11.5. Ensayo colorimétrico para cuantificar la actividad fagocítica mediada por receptores Fcγ.....	25
<b>12. Determinación de la expresión de receptores Fcγ de superficie.....</b>	<b>25</b>
<b>13. Determinación de TNF-α extracelular.....</b>	<b>26</b>
<b>14. Determinación de la concentración de IL-6 extracelular.....</b>	<b>26</b>
<b>15. Determinación de la concentración de IL-1β extracelular ..</b>	<b>27</b>
<b>16. Establecimiento del cultivo persistente P388D1Per.....</b>	<b>27</b>
<b>17. Determinación de antígeno viral por citometría de flujo.....</b>	<b>28</b>
17.1. Proteínas de superficie de RSV.....	28
17.2. Doble tinción de proteínas intracelulares de RSV y virus de influenza.....	28
<b>18. Determinación de la expresión en superficie de las moléculas MHC I y II.....</b>	<b>29</b>
<b>19. Presentación de antígeno.....</b>	<b>29</b>
19.1. Inmunización de animales.....	29
19.2. Producción de células citotóxicas virus-específicas.....	30
19.3. Preparación de células blanco para los ensayos de citotoxicidad.....	30
19.4 Ensayos de citotoxicidad.....	30
<b>20. Análisis estadístico.....</b>	<b>31</b>

## RESULTADOS

<b>1. Confirmación de la presencia y expresión del RSV en células MΦP ..</b>	<b>32</b>
1 1. Expresión de RNA del RSV en células del cultivo MΦP ..	32
1 2. Expresión de antígeno de RSV en células del cultivo MΦP ..	32
<b>2. Actividad fagocítica.....</b>	<b>33</b>
2 1. Determinación de la actividad fagocítica mediada por receptores Fcγ en los MΦP ..	33
2 2. Determinación de la expresión de receptores FcγRII/RIII en la superficie de los macrófagos MΦP y MΦ ..	36
<b>3. Producción de citocinas pro-inflamatorias.....</b>	<b>37</b>
3 1 IL-1β ..	37
3 2 IL-6 ..	38
3 3 TNF-α ..	39
<b>4. Establecimiento de la persistencia del RSV en macrófagos (cultivo nuevo) ..</b>	<b>40</b>
4 1 Establecimiento y monitoreo de la infección persistente en macrofagos ..	40

<b>Presentación de antígeno.....</b>	<b>42</b>
1. Expresión de moléculas del MHC en la superficie de los macrófagos persistentemente infectados con RSV .....	42
2. Efecto de la persistencia del RSV sobre los macrófagos para presentar antígeno viral a CTLs virus específicas . .....	44
3. Efecto de la persistencia del RSV en macrófagos para presentar antígeno de una infección viral secundaria... ..	44
<b>DISCUSIÓN. ....</b>	<b>47</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>53</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>56</b>

# ABREVIATURAS

BSA	Albúmina sérica bovina
BBS	Solución amortiguadora de boratos
Da	Dalton
DGVB <sup>2+</sup>	Solución amortiguadora dextrosa-gelatina-veronal
DMSO	Dimetil sulfóxido
2,4'-DNP	2,4'-Dinitrofenol
ELISA	Inmunoensayo enzimático
EIA/RIA	Inmunoensayo enzimático/Radioinmunoensayo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Hb	Hemoglobina
IL-	Interleucina-
rIL-	IL- recombinante
IFN- $\gamma$	Inteferón gamma
KDa	Kilodalton
m o.i.	Multiplcidad de infección
MEM/10	Medio mínimo esencial suplementado
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de de fosfatos
PFA	Paraformaldehído
rTNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa recombinante
RPMI/10	RPMI suplementado
SFB	Suero fetal bovino
2,4,6'-TNBS	2,4,6'-Trinitrobenzensulfónico
2,4,6'-TNP	2,4,6'-Trinitrofenol
TBE	Solución Tris-base EDTA

## RESUMEN

El virus sincitial respiratorio (RSV) se considera a nivel mundial como la causa principal de enfermedades del tracto respiratorio inferior en niños menores de dos años, originando bronquitis y neumonías severas.

Entender la respuesta inmune a la infección por RSV es uno de los principales objetivos en el estudio de este virus. Dentro de la respuesta inmune, así como en los mecanismos inmunopatológicos de la infección por el RSV destaca la participación del macrófago. Los macrófagos son las principales células inmunoelectoras de las vías respiratorias y están expuestos al RSV durante el curso natural de la infección. Las frecuentes reinfecciones que caracterizan a la infección con el RSV y a las cuales se atribuye la hiperreactividad bronquial, así como los cuadros de bronquitis crónica y las secuelas de asma desarrolladas después de cuadros de bronquiolitis aguda, son algunas de las evidencias para proponer que la persistencia por RSV se presenta en humanos.

En el presente trabajo se determinaron las alteraciones en el macrófago a causa de una infección persistente del RSV en un modelo de persistencia *in vitro*. Dentro de las actividades biológicas del macrófago se incluyó la determinación de la actividad fagocítica mediante un ensayo colorimétrico, los resultados indican que la infección persistente incrementa esta actividad del macrófago hasta en un 460 % lo cual podría estar relacionada con el aumento en la expresión de los receptores Fc para IgG determinados mediante citometría de flujo. También se consideró el estudio de la producción de citocinas proinflamatorias incluyendo la interleucina-1 beta e interleucina-6, las cuales fueron determinadas por ensayos de ELISA. La producción de estas citocinas se incrementó hasta en un 100% y un 137 % respectivamente. El factor de necrosis tumoral- $\alpha$  se determinó mediante su actividad citotóxica en células L929. Los datos revelan una disminución en la actividad de esta proteína por efecto de la persistencia. Finalmente, se determinó la capacidad de la célula persistente para procesar y presentar antígeno viral mediante ensayos de citotoxicidad. Los resultados indican que las células persistentemente infectadas con RSV son capaces de presentar antígeno viral eficientemente a células T citotóxicas específicas.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten especular sobre la posible asociación de las alteraciones observadas en el macrófago por efecto de la persistencia y los procesos inmunopatológicos en la infección por este virus.

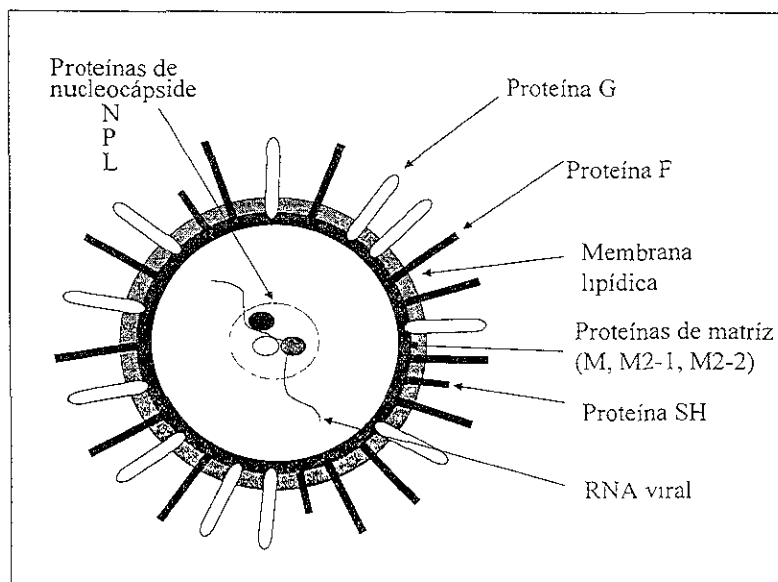
# INTRODUCCIÓN

## 1. ASPECTOS GENERALES DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO

El virus sincicial respiratorio (RSV) la principal causa de enfermedades del tracto respiratorio bajo, principalmente en los infantes durante su primer año de vida, siendo los niños entre los 2 y 6 meses los que presentan el porcentaje de incidencia mas alto (Tercier J. 1983, Sayo M, et al 1994, Boeck K, 1996). Las epidemias causadas por este virus ocurren a nivel mundial principalmente durante las estaciones de invierno, con una mayor incidencia durante los meses de enero y febrero (Nwankwo M., et al 1988, Dawson K., et al 1989)

El RSV pertenece al género Pneumovirus dentro de la familia *Paramyxoviridae*. Posee una envoltura que consiste en una bicapa lipídica, derivada de la membrana plasmática de la célula huésped. Es un virus pleomórfico, con un diámetro de 150 y 300 nm (Collins D et al., 1996, Lamb R 2001) y presenta un genoma no segmentado que consta de una cadena de RNA de polaridad negativa con 15,222 nucleótidos de peso molecular estimado entre 5.0 y 5.62 x10<sup>6</sup> Da (Lambert D. et al., 1980, Huang Y et al., 1982, Huang Y et al., 1983; Dickens L et al., 1984, Collins P et al., 1984, Barik S., 1992, Collins P et al., 1996). La secuencia de los 10 genes contenidos en dicho genoma se conoce totalmente El genoma sirve como plantilla para la transcripción de 10 mRNAs poliadenilados, dando origen a las 11 proteínas del virus, nueve de las cuales se encuentran en el virión (N, P, L, F, G, SH, M, M2-1 y M2-2) y dos son no estructurales (NS1 y NS2), es decir que sólo se encuentran en células infectadas La proteína **F** o de fusión (70 kDa/ 574 a.a.) se localiza en la envoltura y participa en la penetración y formación de sincitios, su precursor inactivo F<sub>0</sub> es modificado postraduccionalmente por la furina y probablemente otra proteasa no identificada. (Boht G et al 2000, Sugrue R et al 2001) dando lugar a las subunidades F1 y F2, unidas entre sí por un puente disulfuro La proteína **G** o glicoproteína (90 kDa/ 298 a.a.) también se encuentra en la superficie del virión y ha sido identificada como la proteína responsable de la unión del virus a la célula huésped. La tercer proteína localizada en la membrana viral es la proteína **SH** o hidrofóbica (7.5-40 kDa/ 64 a.a.) cuya función específica se desconoce; sin embargo se sugiere que participa en la unión, penetración y desnudamiento del virus o en la morfogénesis del virión (Collins P et al, 1996) y su coexpresión con las proteínas F y G aumenta la capacidad de fusión del virus, jugando un papel crítico en la formación de sincitios (Hemmavay B et al. 1994) La proteína **N** o nucleoproteína (43.4 kDa/ 391 a.a.) tiene una función estructural y se encuentra estrechamente unida al RNA genómico. La proteína **P** o fosfoproteína (27.1 kDa/ 241 a.a.) y la proteína **L** (250 kDa/ 2165 a.a.) juegan un papel en la transcripción y replicación del RNA viral y también se encuentran unidas al RNA viral En cuanto a la proteína **M** o de matriz (28.7 kDa/ 256 a.a.) se piensa que tiene dos funciones generales, como la de mantener la nucleocápside transcripcionalmente inactiva antes de su empaquetamiento y mediar la asociación de esta con la envoltura. El gene M2 contiene dos marcos abiertos de lectura (ORFs), ORF1 el cual codifica para la proteína **M2-1** (22.1 kDa/194 a.a.) la cual es un factor de elongación antiterminador de la transcripción, aumenta la frecuencia de lectura de las regiones intergenicas produciendo RNAm poliestrómicos (Lamb R

& Collins P 1999) y también se encuentra unida al RNA viral pero no se encuentra involucrada en la replicación viral (Cuesta I et al 2000, Sutherland K Et al 2001). El ORF2 codifica para la proteína M2-2 (11 kDa/90 a.a.) detectada en células infectadas y se cree tiene una función regulatoria dentro del balance entre la transcripción y replicación viral (Bermingham A. & Collins P 1999). Por último, la función de las proteínas NS1 (o 1C) (15.6 kDa/ 139 a.a.) y NS2 (o 1B) (14.6 kDa/ 124 a.a.) aún se desconoce (Collins P et al, 1996). (Figura 1).



**Figura 1** Diagrama esquemático del RSV. La bicapa lipídica se muestra como un círculo concéntrico gris y debajo de esta membrana están las proteínas de matriz mostradas como un círculo concéntrico más oscuro. Insertadas a lo largo de la membrana viral, se encuentran las proteínas de superficie (F, G y SH). Finalmente, unidas al RNA viral se encuentran las proteínas de la nucleocápside (N, P y L.)

La macromolécula celular que utiliza el RSV como receptor para su unión parece no ser una sola ya que se han propuesto varios candidatos celulares que podrían estar mediando esta interacción con las proteínas del virus. Se ha demostrado que la interacción virus-célula inicialmente esté dada por la unión de la proteína G a glicosaminoglicanos (GAGs) en la superficie de las células blanco (Martinez I & Melero J 2000) o bien por el receptor de la subfamilia de quimiocinas CX3C (CXCR1) el cual reconoce como ligando a la secuencia CWAIK (182-186 a.a.) de la misma proteína viral (Tropp R et al 2001). Por otro lado, se ha reportado también que la unión directa de la proteína F con moléculas de superficie celular como la heparina (Feldman S et al 2000), HR4 y CD14 (Kurt Jones I et al 2000) podría contribuir a la unión e infectividad del RSV. Una vez unido, el virus penetra a la célula fusionándose con



la membrana plasmática del huésped mediante la proteína F. Después de la penetración, la envoltura viral parece ser incorporada a la superficie celular y la nucleocápside es liberada hacia el citoplasma. La transcripción se inicia cuando la polimerasa del virus establece contacto con el RNA viral el cual no presenta cap ni está poliadenilado, este proceso sigue un mecanismo secuencial guiado por las señales de inicio y de paro ubicadas entre los genes, produciéndose la síntesis de los 10 RNAm correspondientes a las 11 proteínas virales. El orden de transcripción de los genes del virus es de 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-(M2-1/M2-2)-L-5'. Durante la replicación, la polimerasa ignora las señales de paro, generando un RNAm o antígenoma que sirve como plantilla para la síntesis de las progenies genómicas virales (Lamb R et al., 2001). El proceso de ensamble se inicia cuando varias unidades de proteína N se unen al nuevo RNA viral y forman la estructura helicoidal la cual se une al complejo de proteínas P-L, formando así la nucleocápside. Las proteínas F y G migran hacia la membrana citoplasmática y aunque se desconoce el mecanismo por el cual el virus es ensamblado en la membrana plasmática, se piensa que la proteína M se agrega a la región interna de la envoltura para mediar la unión de la nucleocápside a la membrana celular. De esta manera se forman los viriones o partículas virales completas que posteriormente serán liberadas al exterior de la célula por el proceso de gemación (Collins P, et al., 1996, Lamb A e al 2001)

El sitio inicial de la replicación del virus es el epitelio del tracto nasal y nasofaríngeo, pero bajo ciertas circunstancias, el virus llega al tracto respiratorio bajo, infectando el epitelio bronquial, bronquiolar y de las células del parénquima pulmonar, causando por lo tanto una variedad de síndromes respiratorios, los cuales varían en severidad desde fiebre común o severa, hasta bronquitis, bronquiolitis y neumonía (Anderson J et al 1989).

## 2. LOS MACRÓFAGOS Y SU IMPORTANCIA EN LA INFECCIÓN POR RSV

Los macrófagos alveolares están estratégicamente localizados para funcionar como el primer sistema de defensa del pulmón contra microorganismos, materia particulada y toxinas del medio ambiente (Laskin D et al 2001) Esta estirpe celular representa una población importante en los alveolos pulmonares, ya que de las células recuperadas en los lavados bronquio alveolares, los macrófagos representan un porcentaje de 95 y 98% (Shapiro S 1999) Durante el curso natural de la infección por el RSV, el macrófago alveolar representa una célula blanco para la infección y es además permisivo a la infección por este virus (Panuska J et al 1990a). Por lo tanto, existe una interacción directa entre el RSV y los macrófagos

Los macrófagos poseen tres propiedades inmunes generales

a) **Actividad fagocítica** Los macrófagos se activan cuando ingieren microorganismos, incrementando su consumo de oxígeno y produciendo reactivos intermedios del oxígeno, liberan varias enzimas y producen factores quimiotácticos para neutrófilos (Humminghake G et al 1985) En el proceso de fagocitosis el macrófago ingiere materiales de más de 1µm de diámetro a través de pseudópodos formados con la participación de filamentos de actina (Speer D 1992) Para la interiorización del material y posterior unión a las membranas, es necesario un punto

inicial de fusión a partir del cual las áreas restantes de las membranas se unan con sus contrapartes. Los receptores Fc $\gamma$  que reconocen el dominio Fc de la inmunoglobulina G se encuentran relacionados con la actividad fagocítica del macrófago, ya que generan señales transmembranales involucradas en la reorganización de los filamentos del citoesqueleto a partir de los sitios de unión con la partícula, y provocando la elongación de la membrana necesaria para la fagocitosis. Otras funciones en que participan los receptores Fc $\gamma$ Rs son: la producción de anión superóxido, la liberación de varias citocinas y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Greenberg S et al 1993).

Los receptores sobre la superficie del macrófago determinan el control de sus actividades, tales como propagación, diferenciación, activación, reconocimiento, endocitosis, migración y secreción. (Auger M. et al 1992). Existe una gran variedad de moléculas receptoras que median la fagocitosis en el macrófago, principalmente los receptores para inmunoglobulinas y para algunos componentes del complemento, aunque otros receptores como los que reconocen oligosacáridos terminados en manosa también pueden participar en la fagocitosis. En la **Tabla 1** se enlistan las principales receptores del macrófago que participan en la fagocitosis (Greenberg S. et al.1993, Frank M. et al. 1999).

**Tabla 1** Principales receptores expresados en macrófagos que están involucrados en la fagocitosis (Greenberg S et al. 1993)

LIGANDO	RECEPTOR
IgG2a e IgG3	Fc $\gamma$ RI (CD64)
IgG1, IgG2b	Fc $\gamma$ RII (CDw32)
IgG1, IgG2a, IgG3	Fc $\gamma$ RIII (CD16)
IgE	Fc $\epsilon$ RII (CD23)
IgA	Fc $\alpha$ RIII
C3b, C4b, iC3b	CR1 (CD35)
iC3b	CR3
Oligosacáridos con residuos de manosa	Receptor manosa

b). **Secreción de factores capaces de activar otros componentes inmunológicos del sistema de defensa en el organismo** (Welliver R et al 1988) Los macrófagos son responsables de la secreción de muchas citocinas que participan en el control de la respuesta inmune amplificando la respuesta local a la infección. El término citocina incluye a las que protegen al organismo de infecciones virales y a las que inician la reacción inflamatoria para proteger de infecciones por microorganismos (Abbas A et al 1995). Su síntesis es estimulada cuando los macrófagos reconocen microbios o sus componentes. Se les denomina monocinas porque son producidas principalmente por células de la serie monocito-macrófago y son un diverso grupo de moléculas que incluyen interleucina (IL-) 1, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\alpha/\beta$  y TNF- $\alpha$  (Auger M et al 1992, Picker L. et al 1999).

Los macrófagos producen IFN- $\alpha$  en respuesta a las infecciones virales y bacterianas, así como al contacto con células extrañas y tumorales. La actividad biológica de esta proteína

está en función de la cantidad producida en respuesta al estímulo (Auger M. et al. 1992). A concentraciones bajas ( $10^{-9}$ M) el TNF- $\alpha$  actúa localmente dentro de la respuesta inflamatoria como un regulador paracrino y autocrino de los leucocitos y células endoteliales, activa neutrófilos, eosinófilos y fagocitos mononucleares. Estimula fagocitos mononucleares y a otros tipos de células a producir citocinas (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  y quimiocinas). Ejerce un efecto protector similar al de interferón contra los virus e incrementa la expresión de las moléculas de clase I y II del MHC, aumentando la lisis de las células infectadas por virus por las células CTLs (Auger M et al 1992, PickerL 1999, Abbas A et al 1995).

Las células de la serie monocito-macrófago son la principal fuente de IL-6. Conocida principalmente como molécula activadora de células B, sobre las que actúa promoviendo su proliferación y diferenciación a células plasmáticas. Actúa además sobre hepatocitos provocando que estos sintetizen varias proteínas plasmáticas, como el fibrinógeno, que contribuyen a la respuesta de fase aguda (Auger m et al 1992, Gray D. 1994, Abbas A et al 1995). Además de estas propiedades bien identificadas, experimentos *in vitro* sugieren que la IL-6 puede ser un co-estimulador de las células T y de los timocitos. Finalmente, se ha reportado que posee actividad trófica para neuronas (Van Snick J 1990, Hirano T 1992).

La IL-1 es una proteína de 17 kDa la cual posee una amplia variedad de actividades biológicas y juega un papel central en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria. Aunque la producción normal de IL-1 es obviamente crítica para la iniciación de la respuesta normal del huésped por daño o infección, la inapropiada o prolongada producción de IL-1 a sido implicada en la producción de una variedad de condiciones patológicas desde fiebre hasta cuadros inflamatorios severos. En el sistema inmune la IL-1 funciona como una señal de diferenciación o maduración para varias subpoblaciones de linfocitos. Además, la IL-1 afecta un gran número de células blanco no linfocíticas, activando las reacciones del sistema de defensa a la infección, la cual incluye fiebre y la migración de neutrófilos. La IL-1 activa linfocitos T los cuales proliferan y secretan IL-2. IL-1 es liberada principalmente por macrófagos y monocitos (Dmawello Ch 1989, Dmawello Ch 1994)

c). **Presentación de antígeno a través de las moléculas clase I y II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).** Las moléculas del MHC proveen al organismo con un sistema de defensa contra la presencia de antígenos derivados de proteínas extrañas. Los genes que codifican para las moléculas del MHC clase I y II están en grupos separados en el brazo corto del cromosoma 6 en humanos y cromosoma 17 en ratón. Hay tres clases de loci en humanos denominados antígenos de leucocitos humanos (HLA)-A, HLA-B, y HLA-C; en ratón, H-2K, H-2D, y H-2I. Existen tres genes para el MHC clase II en humanos, denominados HLA-DR, HLA-DQ, y HLA-DP, en ratón corresponden a los genes I-A e I-E.

Las moléculas clase I contienen dos cadenas, una cadena  $\alpha$  codificada por el MHC y una cadena  $\beta$  (beta 2 microglobulina - $\beta$ 2-m-) no codificada dentro del MHC. La cadena  $\beta$ 2-m no tiene dominio transmembranal y permanece asociada a la célula debido a su interacción no covalente con la región extracelular  $\alpha$ -3 de la cadena pesada, la cual a su vez contiene un sitio de unión para el receptor CD8 de los linfocitos T. Los dominios  $\alpha$  1 y  $\alpha$  2 se pliegan para

Formar un nicho al que se unen y presentan los péptidos antigénicos. Una hoja beta plegada forma la base del nicho y las paredes están conformadas por dos hélices alfa, las cuales son distales a la membrana e interactúan con el receptor de las células T de las CTL. Las moléculas MHC II están compuestas por una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$  unidas en forma no covalente. Cada cadena esta subdividida en una región extracelular, una región transmembranal y una región citoplásmica. Los dominios distales de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  forman el surco donde el péptido se une.

La expresión constitutiva de las moléculas clase I y II es diferente en distintos tipos celulares. Las moléculas clase I están presentes en la mayoría de las células nucleadas, mientras que las moléculas clase II son expresadas en células presentadoras de antígeno (APC) como, linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, y células endoteliales. Las citocinas derivadas de células T, especialmente interferón (IFN)- $\gamma$ , pueden modular la velocidad de la transcripción constitutiva de los genes clase I y II. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> cooperadores reconocen antígenos unidos a moléculas MHC clase II y amplifican la respuesta inmune por producción de citocinas que promueven la proliferación y diferenciación de los linfocitos T y B, además de macrófagos. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTL) reconocen antígenos extraños tales como péptidos virales unidos a las moléculas MHC clase I y lisan a las células infectadas, por lo tanto proveen un importante mecanismo de defensa contra microorganismos intracelulares.

Las moléculas clase I unen péptidos predominantemente de proteínas propias, proteínas virales que infectan a la célula o proteínas citosólicas liberadas por bacterias o protozoarios. Genes localizados en la región II del MHC codifican para proteínas de una partícula grande multicatalítica, el proteasoma, el cual contribuye en la vía de la generación de los péptidos de proteínas citosólicas, junto con otras dos proteasas (aminopeptidasa-puromicina sensible y bleomicina hidrolasa) que terminan de procesar algunos péptidos después de su paso por el proteasoma (Stoltze L. et al 2000). Tres subunidades  $\beta$  del proteasoma (X, Y y Z) son sustituidas por las unidades LMP2, LMP7 y MECL-1, las cuales son inducibles por IFN- $\gamma$  para dar lugar a la formación del inmunoproteasoma, alterando las actividades catalíticas de esta partícula, aumentando la presentación de al menos algunos antígenos (Fruh K & Yang Y 1999). Los genes transportadores en el procesamiento de antígenos (TAP) codifican para las proteínas transportadoras de péptidos TAP1 y TAP2, las cuales juegan un papel en el transporte de péptidos del citosol al retículo endoplásmico (RE), donde se lleva a cabo la unión del péptido al nicho formado por la cadena pesada del MHC I. Además, la unión del péptido estabiliza la asociación de esta con la cadena  $\beta$  recién sintetizada, en presencia de las proteínas chaperonas calnexina, tapasina y calreticulina. Ya una vez formado el complejo estable MHC-I-péptido, este se exporta a la superficie para la presentación a células T CD8<sup>+</sup>. Aunque los antígenos exógenamente sintetizados son generalmente asociados con MHC II, hay excepciones cuando bacterias y protozoarios entran a la célula por fagocitosis y las proteínas producidas por estos organismos logran el acceso a la vía citosólica de procesamiento de antígeno y subsecuentemente estimulan a las células T CD8<sup>+</sup> y la lisis celular.

Las moléculas MHC clase II unen péptidos predominantemente generados en el sistema endosomal-lisosomal de la célula. Los péptidos son derivados de las proteínas de

superficie de la célula, proteínas solubles, o proteínas de virus, bacterias, o parásitos protozoarios que invaden o son fagocitados por la célula. Previo a la unión del péptido, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del MHC clase II recién sintetizadas se asocian con una proteína transmembranal, la cadena invariante (Ii) en el RE para formar un complejo que por sí mismo es incapaz de unir péptidos. Este complejo contiene tres dímeros de MHC II  $\alpha\beta$  asociados con un trímero de cadenas Ii. Siguiendo el tránsito del complejo  $\alpha\beta Ii$  a través del aparato de Golgi, las señales del dominio citoplásmico de la cadena Ii conduce al complejo a la vía endosomal-lisosomal, donde la cadena Ii es proteolíticamente degradada, al menos parcialmente por catepsinas (S y B) y asparagil endopetidases (AEP), dejando un pequeño fragmento [péptido de la cadena Ii asociado a MHC II (CLIP)] unido a los dímeros  $\alpha\beta$ . La interacción en un compartimento especializado parecido al lisosoma (MIIC) de los complejos  $\alpha\beta$ CLIP con otro dímero  $\alpha\beta$  llamado HLA-DM, remueve al CLIP residual y permite a las moléculas MHC II unir al péptido generado lisosomalmente. Las moléculas MHC II cargadas con péptido salen del compartimento y son expresadas sobre la superficie de la célula para ser reconocidas por las células T CD4+. (Margulies D 1999, Germann R. 1999, Peters V & Sperber K 1999, Watts C. 2001, Cresswell P & Lanzavecchia 2001, Yewdell J. & Bennink J 2001)

La interacción RSV-macrófago se ha estudiado *in vitro* utilizando distintos modelos experimentales. Los reportes que existen demuestran los efectos del RSV sobre algunas funciones del macrófago después de una infección aguda. En la **Tabla 2**, se resumen los resultados obtenidos en 9 investigaciones relacionadas, los cuales serán discutidos en la sección correspondiente. En dicha tabla se observa que la concentración de TNF- $\alpha$  en macrófagos alveolares se incrementó por la infección con RSV, en cambio disminuyó en las células de sangre periférica humana. La concentración de IL-1 e IL-6 también se incrementó. De tres reportes la concentración de IL-8 aumentó en dos de ellos. La fagocitosis no mediada por receptores Fc $\gamma$ R se vió disminuída, así como la producción de los reactivos intermediarios metabólicos del oxígeno. Asimismo, la actividad bactericida se ha observado que disminuye en monocitos infectados por el virus (Raza M. *et al* 2000). Finalmente la expresión de la región del MHC HLA-DR se vió incrementada (Franke G. *et al* 1994, Franke G. *et al* 1995, Becker S. *et al* 1991, Cirino N. *et al* 1993, Midulla F. *et al* 1993, Panuska J. *et al* 1995, Roberts N. *et al* 1986, Arnold R. *et al* 1995).

Por otra parte, se tienen datos *in vivo* de la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 en secreciones nasofaríngeas en infantes y niños pequeños (19 días a 16 meses) infectados por el virus, donde la producción de TNF- $\alpha$  aumenta en la fase aguda de la enfermedad y declina posteriormente hasta cantidades casi indetectables. En niños menores de 5 meses la IL-6 también registra una actividad más alta durante la fase aguda de la infección disminuyendo después, pero en niños mayores permanece el incremento alcanzando un pico al inicio de la convalecencia. Dichas observaciones sugieren que las citoquinas son producidas *in vivo* en infantes y niños en respuesta a la infección primaria por RSV y pueden estar involucradas en la patogénesis de la enfermedad (Matsuda K. *et al* 1995).

TABLA 2. Diferentes efectos por infección aguda *in vitro* del RSV en macrófagos

MACRÓFAGOS	TNF- $\alpha$	IL-1	IL-6	IL-8	IL-10	INF-1	F.I.	A.B.	R.O.I.	HLA-DR
Alveolares murinos (Balb/c)	↑	↑	↑			↑	↓		↓	
Alveolares humanos	↑		↑	↑						
Alveolares humanos										↑
Alveolares humanos	↑	↑								↑
Alveolares humanos	↑	SC		↓	↑					
Sangre periférica humanos		↑								
Sangre periférica humanos	↓		↑	↑						
Línea celular monocítica (THP1)								↓		

NOTA: ↑=aumento. ↓=disminución. SC=Sin cambio, F.I = Fagocitosis inespecífica (no mediada por receptores Fc $\gamma$ ), INF-1= Interferón tipo 1 A.B = Actividad bactericida. ROI= Reactivos intermediarios metabólicos del oxígeno,HLA-DR=Región del complejo principal de histocompatibilidad clase II. 1 Franke G et al 1994, 2 Franke G et al 1995, 3 Becker S et al. 1991, 4 Cirino N et al 1993, 5 Achilla F et al 1993, 6 Pamuska J et al 1995, 7 Roberts N et al. 1986, 8 Arnold R. et al 1995 , 9 Raza M et al 2000.

Cabe mencionar también reportes con el virus sincitial respiratorio bovino (BRVS), con alta similitud con el RSV humano. Olchowy T. y cols. en un modelo de infección aguda en macrófagos alveolares de terneras reportan una disminución en la fagocitosis inespecífica y en la fusión fagosoma-lisosoma. Por otro lado, observan un aumento en la expresión de los receptores Fc $\gamma$  y en la actividad fagocítica mediada por receptores Fc $\gamma$ R, sin encontrar un cambio significativo en la producción de los reactivos intermediarios del oxígeno (Olchowy T et al 1994).

### 3. ASPECTOS INMUNES E INMUNOPATOLÓGICOS DE LA INFECCIÓN POR EL RSV

Los resultados de la respuesta inmune a la infección por RSV en modelos experimentales como en la rata del algodón y ratón, así como en humanos, son contradictorios. Algunas observaciones indican que la respuesta inmune es protectora, en cambio otras sugieren que no solo protege sino que además ocasiona inmunopatología, principalmente en el pulmón y esto es válido tanto para la respuesta inmune humoral como para la celular.

Las observaciones que sugieren efecto protector por la respuesta humoral son las siguientes:

1. Anticuerpos antivirales IgG, IgM, IgA (Nadal D et al 1990, Ananaba G et al 1991, Falsey A. et al 1992, Soh N et al 1992, Openshaw P 1995b) confieren a infantes protección parcial a la infección, sin embargo, la protección no es suficiente para evitar que se presenten cuadros severos de neumonía y bronquitis (Bangham et al 1986 (a), Bangham et al 1986 (b))
2. La inmunidad dada por anticuerpos maternos también produce protección aunque parcial (Englund J 1994), ya que la bronquiolitis y neumonía asociada a RSV ha ocurrido más frecuentemente en los primeros cuatro meses de vida cuando los anticuerpos maternos transmitidos están en sus más altos niveles (Kapikian A et al 1969).

Respecto a la inmunidad celular también se tienen resultados que implican protección.

1. En pacientes cuya inmunidad celular es deficiente el virus se encuentra en forma persistente (Nadal D et al 1990, Openshaw P et al 1995a, Gaddum R et al 1996)
2. La eliminación de células T CD4<sup>+</sup> en ratones antes de la infección por RSV ha resultado en una prolongada replicación del virus (Garofalo R et al 1996).
3. Las células T CD8<sup>+</sup> están implicadas en la eliminación de células infectadas, principalmente durante la infección primaria por el RSV (Nadal D et al 1990, Kulkarni A et al 1993a, Garofalo R et al. 1996) y en forma pasiva en la eliminación del RSV persistente en animales inmunodeficientes (Kampen J et al. 1992)

Por otra parte, las observaciones que sugieren daño ocasionado por la respuesta inmune pueden resumirse en los resultados obtenidos en los años 1966-1967 al intentar vacunar a

niños con virus inactivado con formalina (Jeffcoate T 1969, Kim H. et al 1969, Kapikian A et al 1969), ya que los niños que recibieron la vacuna mostraron cuadros más severos a la reinfección que los niños que no habían sido vacunados. En un principio, el efecto fue atribuido a la respuesta inmune humoral debido principalmente a la reacción de complejos inmunes (IgG + antígeno) ya que se involucraron a los anticuerpos de origen materno (Jeffcoate T 1969, Nadal D et al 1990), pero conforme se ha estudiado al respecto, se ha considerado a la respuesta inmune celular como la responsable del excesivo proceso inflamatorio observado en el intento de vacunación. Dentro de este contexto, se indica que las células T CD4<sup>+</sup> (Th2) causaron el incremento de la enfermedad antes mencionado (Alwan W et al 1994), ya que en la infección natural después de la vacunación la producción de IL-4 se incrementó, siendo esta una interleucina de acción inflamatoria generada por las células Th2 (Anderson L et al. 1994, Openshaw P 1995b). Además, en modelos experimentales *in vivo*, después de una reinfección y en ausencia de células T CD4<sup>+</sup>, el daño histopatológico en el pulmón de ratones BALB/c se ha visto reducido (Connors M et al 1994). Por otro lado, se ha demostrado una respuesta inflamatoria eosinofílica *in vivo* como consecuencia de la liberación de citocinas tipo Th2, proceso en el que se encuentra involucrada la proteína G del RSV (Openshaw PJM et al. 1995b, Alwan WH. et al 1994). Recientemente, Tripp R y cols. han atribuido una actividad quimiotáctica a esta misma proteína, lo que pudiera contribuir a la respuesta inflamatoria contra el virus (Tripp R et al 2001).

Utilizando el modelo murino, se ha demostrado que las células T CD8<sup>+</sup> también se encuentran involucradas en la respuesta inmunopatológica al RSV causando gran daño en el pulmón principalmente durante la infección primaria. La proteína M2 es la más importante en el proceso de la inducción de las células T citotóxicas (CTLs) contra el RSV, ya que contiene el epitopo inmunodominante (a.a 82-90) el cual es presentado en el contexto de moléculas del MHC clase I (K<sup>b</sup>) (Openshaw PJM et al 1990, Kulkarni A et al 1993b, Kulkarni A et al 1995). La inducción o transferencia de CTLs específicas a ratones sanos resulta en una acelerada eliminación del virus. Sin embargo, la inmunopatología aumenta significativamente: los animales experimentan una patología exacerbada con severa hemorragia en el pulmón, infiltrado neutrofílico y una dramática pérdida de peso. (Cannon M et al 1988, Graham B et al 1991, Alwan W et al 1992, Alwan W et al 1991, Openshaw P 1995, Garofalo R et al. 1996, Hussell T 1996, Openshaw PJM et al 2001)

Otro aspecto importante dentro de la inmunopatología de la infección del RSV es la presencia de algunas citocinas. El TNF- $\alpha$  se ha asociado a estos procesos inmunopatológicos mediante varios mecanismos. Un posible mecanismo a través del cual esta proteína pudiera incrementar la severidad de la infección es incrementando la expresión de las moléculas de adhesión en las vénulas, induciendo a la extravasación de las células en el pulmón. El TNF juega un rol importante en el reclutamiento de células a tejidos normales o inflamados (Sedgwick J et al 2000), y juega un papel en el reclutamiento de neutrófilos y eosinófilos (Lukacs N et al 1995), quizás por la producción incrementada de quimioquinas. Otro mecanismo propone que la incrementada producción de TNF *in vivo* puede conducir a una muerte celular extensa en el epitelio respiratorio, postulando que la administración de anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  pudiera disminuir la severidad de la infección en los pacientes con cuadros de bronquiolitis (Hussell T et al 2001). La inducción de la IL-13 por el RSV también se ha asociado a efectos patológicos, ya



que se le involucra en el incremento de las respuestas alérgicas y en los procesos inflamatorios del tipo del asma (Lukacs N. et al. 2001). Finalmente, la producción de quimiocinas, principalmente la MIP-1 $\alpha$  (Garofalo R. et al 2001, Haeblerle H et al. 2001) e IL-8 (Bont L. et al 1999) se han visto asociadas a cuadros severos de inflamación y daño pulmonar por su contribución en el reclutamiento celular.

#### 4. PERSISTENCIA VIRAL POR RSV

Durante la persistencia, los virus pueden permanecer dentro de un organismo por largos períodos de tiempo, iniciando el proceso de infección como una infección aguda, para progresar a infección latente o crónica, donde es necesario que se cumplan tres condiciones fundamentales: a) el virus debe ser capaz de infectar a células huésped sin originar efecto citopático o un daño excesivo, b) debe tener algún mecanismo para mantener el genoma viral en la célula infectada y c) tiene que lograr evadir el sistema inmune del organismo evitando su detección y consecuente eliminación (Oldstone M., 1990; Oldstone M., 1991; Oldstone M et al., 1993; Martín A, et al., 1994; Ahmed R., et al., 1996).

El genoma viral logra persistir en un organismo cuando se integra a la célula huésped utilizando diferentes mecanismos o puede permanecer en forma episomal de manera extracromosómica. Entre los virus que causan infección persistente en humanos se pueden mencionar los siguientes: a) **virus con DNA**: adenovirus, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus herpes simplex 1 y 2, herpes virus humano 6, virus de varicela zoster, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis D, virus del papiloma, parvovirus B19, poliomavirus BK, poliomavirus JC. b). **virus con RNA**: virus de la hepatitis C, virus del sarampión, virus de la rubéola c). **Retrovirus**. virus de inmunodeficiencia humana, virus tipo I y II de la leucemia humana de células T. (Haywood A 1986, Oldstone M., 1989, Ahmed R., et al., 1996).

La persistencia del RSV *in vivo* se ha sugerido tras las frecuentes reinfecciones del RSV en infantes inmunocompetentes y la posibilidad de que esta exista la respaldan algunas evidencias como las reportadas por Krivitskaia V y cols donde detectan la persistencia del RSV en pacientes con bronquitis obstructiva crónica y bronquitis recurrente (Krivitskaia V et al 1992, Krivitskaia V et al 1996) Así como también al detectar antígeno viral en forma de cuerpo de inclusión en osteoclastos, tanto en biopsias como en células cultivadas de lesiones de pacientes con la enfermedad de Paget (Mills B et al 1981, Mills B. et al 1984, Mills B et al 1987) En modelos animales se han diseñado modelos experimentales de persistencia *in vivo* en cobayos. En los que se ha mostrado que las proteínas y el RNA genómico del RSV persisten en células del pulmón después de la resolución de la bronquiolitis aguda. Se sugiere al macrófago como célula blanco de persistencia y que la infección de estas células por el virus puede contribuir a la patogénesis de la inflamación bronquiolar crónica (Hegeler R et al 1994) Streckert H y cols. reportan persistencia del genoma del RSV en cobayos después de 6 meses de la infección, a pesar de encontrar altos títulos de anticuerpos neutralizantes (Streckert H et al 1996) Dakhama y cols demuestran además que el RSV puede persistir en forma infecciosa y replicarse en cobayos inmunocompetentes. Durante dicha infección persistente, obtienen títulos elevados de

anticuerpos IgG1 (equivalente a la IgE de ratón) RSV-específicos, los cuales juegan un rol predominante en las respuestas alérgicas en estos animales. En el humano, se ha demostrado la producción elevada de anticuerpos IgE RSV-específicos en niños con bronquiolitis aguda. Por lo tanto, se podría sugerir que el RSV pudiera actuar como alérgeno y que además la persistencia crónica de RSV en el pulmón junto con la respuesta de IgE RSV-específicos pueden ser factores importantes en la patogénesis de asma en niños infectados con RSV (*Dakhama A et al 1997*). Finalmente, Ostler T y cols. han sugerido que la constante presencia de células CD8<sup>+</sup> localizadas en el pulmón de ratones infectados con RSV, se debe a la persistencia de virus o de antígeno viral en las células del tejido alveolar (*Ostler T. et al. 2001*) entre los cuales un candidato para que el RSV persista pudiera ser el macrófago.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro del curso natural de la infección por RSV destaca la participación del macrófago (Collins P 1996) por ser una célula permisiva a la infección (Panuska J et al 1990). Las alteraciones observadas en estas células después de la infección aguda por el RSV, demuestran la participación del macrófago dentro de los procesos inflamatorios presentes en individuos infectados con el virus (Becker S et al. 1991, Cirino N et al 1993, Midulla F et al 1993, Panuska J et al 1995). Algunos procesos inmunopatológicos de la infección por RSV como la hiperreactividad bronquial, se han encontrado asociados con la continua exposición a antígeno de este virus en los alveolos, lo cual sugiere persistencia de RSV (Ostler T et al 2001) Dentro de los alveolos, los macrófagos alveolares representan una población mayoritaria y es además una estirpe celular que se encuentra involucrada en la respuesta inmune innata y específica (Gendelman H & Morahan P 1992) Por lo tanto, un candidato para que el RSV pueda persistir *in vivo* dentro del pulmón y además contribuir a la patología característica de este virus, es el macrófago

En el presente trabajo se determinan las alteraciones en el macrófago a causa de una infección persistente del RSV en un modelo de persistencia *in vitro* y se sugiere la probable asociación entre dichas alteraciones con algunos procesos inmunopatológicos observados a causa de esta infección viral

# OBJETIVOS

## Objetivo General

Determinar el efecto de la persistencia del virus sincitial respiratorio (RSV) sobre algunas funciones del macrófago.

## Objetivos Específicos

1. Confirmar la infección persistente del RSV en el cultivo de células P388D1.
2. Determinar las siguientes funciones del macrófago en un cultivo persistentemente infectado con RSV en forma comparativa con células sin infectar

- a) Actividad fagocítica (fagocitosis mediada por receptores  $Fc\gamma R$ )*
- b) Expresión de Receptores  $Fc\gamma RII/RIII$*
- c) Producción de  $TNF-\alpha$*
- d) Producción de IL-6*
- e) Producción de IL- $1\beta$*
- f) Expresión de moléculas del MHC clase I*
- g) Expresión de moléculas del MHC clase II*
- h) Procesamiento y presentación de antígeno mediante moléculas del MHC*

# MATERIAL Y MÉTODOS

## VIRUS

### 1. RSV cepa Long. (ATCC VR-26)

Aislada por Chanock en 1963 de un niño con infección aguda del tracto respiratorio bajo. Donado por el Dr. M. Trudel (*Instituto Armand Frappier, Ville de Laval, Canadá*). El virus fue propagado en células HEP-2 y la infectividad viral fue determinada por ensayos de placa en células HEP-2.

### 2. Virus recombinante de vaccinia que expresa la proteína de matriz del RSV (rVV-M2)

Virus de vaccinia recombinante que codifica para la proteína M2 del RSV. La secuencia de esta proteína fue insertada en el vector de vaccinia pAB174 (*Openshaw P J M. et al 1990*). El virus fue propagado en células HEP-2 y el título viral fue determinado por ensayos de placa en células HEP-2.

### 3. Influenza A/X31

Virus recombinante que contiene los genes de hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (N) de la cepa A/Aichi/2/68 (H3N2) y sus genes restantes de A/PR/8/34 (*Bacz M et al 1980*). El virus fue gentilmente donado por el Prof Alan Douglas (*National Institute for Medical Research, London UK*). El título viral fue determinado mediante ensayos de hemaglutinación.

## LINEAS CELULARES

### 1. P388D1 (ATCC TIB 63) (ECACC Ref No 85011439)

Obtenida por Dwe y Potter, derivada de un neoplasma linfóide (P388) inducido en un ratón DBA/2 (H-2<sup>d</sup>) con metilclorantreno. Presenta características morfológicas y funcionales similares a las del macrófago. Esta línea se obtuvo de dos fuentes diferentes, una del ATCC donada a nuestro laboratorio por el Dr. A. Tingle (*Universidad de Columbia Británica, Vancouver, Canadá*) y utilizada para establecer el cultivo MΦP. La otra del ECACC fue obtenida directamente del proveedor y se utilizó para establecer el cultivo P388D1<sub>Per</sub>. Los cultivos se propagaron en medio RPMI/10 y una vez alcanzada la confluencia celular, la monocapa fue disociada por pipeteo. Para fines prácticos, en el texto posterior se refirió a las células de acuerdo a su fuente MΦ (ATCC) y P388D1 (ECACC).

### 2.2 MΦP

Línea de macrófagos persistentemente infectados con RSV cepa Long. El cultivo fue previamente establecido y caracterizado en el laboratorio de Virología (*Saizumeo R et al 2001*). Brevemente, la línea celular P388D1 se infectó con el RSV a una m.o.i. de 10, las células que sobrevivieron se propagaron en RPMI-10 y posteriormente para incrementar el porcentaje de células infectadas en el cultivo, se hizo una super-infección a una multiplicidad de infección

mas alta (m.o.i de 5 0) Las células de este cultivo se mantuvieron por pases consecutivos 1:2 aproximadamente dos veces a la semana y la presencia de virus se ha monitoreado en forma rutinaria.

### 2.3. L929 (ATCC, CCL1)

Obtenida por Sanford, Earle y Likely La cepa parental fue derivada de tejido areolar y adiposo de ratón C3H/An. y la clona 929 fue establecida de la 95va generación de la cepa parental. Esta línea presenta una morfología similar a fibroblastos, así como el receptor para TNF- $\alpha$  y  $\beta$  Fue gentilmente proporcionada por el Dr. Alejandro Zentella (*Instituto de Fisiología Celular, UNAM*). Las células fueron propagadas en medio D-MEM suplementado con 10% de SFB y antibióticos (D-MEM/10), las monocapas celulares se disociaron con una solución de verseno/tripsina 0.1%.

### 2.4. P815 (ATCC TIB 64)

Mastocitoma cultivado de un tumor de ratón DBA/2. H-2<sup>d</sup>. Las células fueron propagadas en medio RPMI/10 en suspensión a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml.

### 2.5. A20 (ATCC TIB 208).

Línea derivada de un linfoblastoma de células B de ratón BALB/c. Las células fueron propagadas en medio RPMI/10 en suspensión a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml.

### 2.6 MDCK (Madin & Darby Canine Kidney) (ECACC Ref. No. 84121903)

Línea celular de células epiteliales derivada de riñón de perro. La línea celular fue donada por la Dra. Gwen Anderson (*Imperial College at St. Mary's, Londres, G B.*) y fue propagada en medio D-MEM/10 para subcultivos. Una vez alcanzada la confluencia celular, la monocapa fue lavada tres veces con PBS y disociada con tripsina (0.1% en PBS)

### 2.7 HEp-2 (ATCC, CCL 23)

Establecida por Moore, Sabachewsky y Toolan después de inducir la propagación de células de carcinoma epidermoide de laringe humana en ratas inmunosuprimidas. Las células fueron propagadas en medio RPMI/10 para subcultivar. Una vez alcanzada la confluencia celular, la monocapa fue lavada tres veces con PBS y disociada ya sea con tripsina (tripsina 0.1% /EDTA 5 3 mM) o con solución no enzimática (*Sigma C #5914*)

## 3. HIBRIDOMAS

### 3.1 2 4G2 (ATCC, HB 197)

El hibridoma se obtuvo fusionando células de mieloma P3U1 con células esplénicas de ratas Sprague-Dawley las cuales fueron inmunizadas con la línea celular de macrófagos murinos J774. El hibridoma secreta un anticuerpo monoclonal de rata (IgG2a) que reacciona con los receptores Fc $\gamma$ RII/RIII de ratón. El hibridoma fue mantenido en medio MEM/10. El anticuerpo fue proporcionado por el Dr. Enrique Ortega (*Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM*)

## 2. (SF1-1.1.1) (ATCC HB-159)

La línea fue producida al fusionar células del mieloma SP2/0 con células de bazo de un ratón SJL/J inmunizado con células de bazo de ratón BALB/c. Esta línea secreta un anticuerpo monoclonal (IgG2a) que reconoce específicamente H-2K<sup>d</sup>. Las células se propagaron en medio RPMI/10 y el sobrenadante se recolectó en presencia de azida de sodio (0.02%) y se mantuvo a 4°C hasta su utilización. Las células fueron gentilmente proporcionadas por la Dra. Natalia Martín (Centro Médico Nacional Siglo XXI) y el Dr. Vianney Ortiz-Navarrete (CINVESTAV-IPN).

## 3. 34-4-20S (ATCC HB-75)

Esta línea secreta un anticuerpo monoclonal (IgG2a) que reconoce específicamente moléculas H-2D<sup>d</sup>. Las células se propagaron en medio RPMI/10 y el sobrenadante se recolectó y se mantuvo a 4°C hasta su utilización. El sobrenadante celular fue proporcionado por el Dr. Vianney Ortiz-Navarrete (CINVESTAV-IPN).

## 3.4 28-14-8S (ATCC HB-27)

Esta línea secreta un anticuerpo monoclonal (IgG2a) que reconoce específicamente moléculas H-2L<sup>d</sup>. Las células se propagaron en medio RPMI/10 y el sobrenadante se recolectó y se mantuvo a 4°C hasta su utilización. Las células fueron proporcionadas por el Dr. Vianney Ortiz-Navarrete (CINVESTAV-IPN)

## 3.5. B27M1 (ATCC HB-157)

Esta línea secreta un anticuerpo monoclonal (IgG2a) que reconoce específicamente moléculas HLA-B27, -B7. Las células se propagaron en medio RPMI/10 y el sobrenadante se recolectó y se mantuvo a 4°C hasta su utilización. El sobrenadante celular fue gentilmente proporcionadas por el Dr. Vianney Ortiz-Navarrete (CINVESTAV-IPN).

## 4. ANIMALES

Ratones hembras BALB/c (H-2<sup>d</sup>) de aproximadamente 8-12 semanas fueron utilizados para la producción de las CTLs virus-específicas. Los animales fueron mantenidos y sacrificados de acuerdo a los lineamientos de los biotecnos del Imperial College (Londres, G.B.).

## 5. PRODUCCIÓN DE VIRUS

### 5.1 Propagación de RSV

La propagación de RSV se hizo en monocapas semi confluentes de células HEp-2. Las células se infectaron con el RSV a una multiplicitad de infección ( $m.o.i.$ ) de 10 en medio DMEM sin suero, después de 2 horas de adsorción a 37°C/5% CO<sub>2</sub>, el sobrenadante se retiró y se reemplazó por medio de DMEM suplementado con 2% de FBS y 1% de antibióticos. La cosecha viral se realizó después de transcurridas 48 horas de infección o hasta observar efecto citopático en el 80 % de la monocapa celular. El contenido de las botellas se recolectó con ayuda de un gendarme para desprender las células aun adheridas y se centrifugó 11

sobrenadante se distribuyó en alícuotas de 1 ml, agregándoles  $MgSO_4$  a una concentración final de 0.1 M para estabilizar la infectividad del virus (Ferne B & Gerin J 1982) y se almacenaron en nitrógeno líquido.

## 5.2. Propagación de rVVM2

El rVVM2 se propagó en  $3 \times 10^6$  células HEp-2 en un volumen total de 25 ml en una botella de 75 cm<sup>2</sup>, las células se mantuvieron toda la noche a 37°C/5% CO<sub>2</sub> en RPMI/10. Las células fueron infectadas a una m.o.i. de 10 en 3-5 ml de medio libre de suero. Después de incubarse durante 2 horas a 37°C/5% CO<sub>2</sub>, la incubación se prolongó hasta que el efecto citopático fuera evidente (células redondeadas) aproximadamente 48 horas. Las células se desprendieron con ayuda de un gendarme, se centrifugaron a baja velocidad y el botón celular se resuspendió en 2 ml de una solución de Tris-HCl 10 mM pH 8.8 y se congeló a -70°C. Se descongeló y se sonicó por 2 minutos. Los restos celulares se centrifugaron nuevamente y se recolectó el sobrenadante. El proceso anterior se repitió una vez más y se combinaron ambos sobrenadantes. Se hicieron alícuotas de 50 µl y se mantuvieron a -70°C. Debido a que las partículas se adhieren fuertemente entre sí, el contenido de las alícuotas se sonicó antes de usarse.

## 5.3. Propagación de Influenza virus A/X31

El virus de influenza se propagó en monocapas confluentes de células MDCK en botellas de 25 cm<sup>2</sup>. La monocapa se lavó dos veces con PBS y se infectó con ~8 HAU en 500 µl de medio D-MEM sin suero. La monocapa se incubó por una hora a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se adicionaron 5 ml de medio D-MEM con 2 mg/ml de tripsina-TPCK (*Sigma # T 1426*) y las células se incubaron por aproximadamente 48 horas o cuando el efecto citopático fue visible en aproximadamente el 80% de las células. Transcurrido este tiempo, la monocapa se disgregó con la ayuda de un gendarme y el contenido de la botella se centrifugó a 400 g por 5 minutos. El sobrenadante fue distribuido en alícuotas de 500 µl y almacenado a -82°C. Este proceso se repitió una vez más utilizando el virus producido como inóculo (diluido 1:500) y el título viral obtenido fue de aproximadamente 1600 HAU/50 µl

## 6. TITULACIÓN DE VIRUS POR ENSAYO DE PLACA (PFU/ml)

### 6.1. Virus Sincitial Respiratorio (RSV)

El virus infeccioso fue cuantificado en monocapas de células HEp-2 en placas de 6 pozos. Diluciones seriadas de RSV en 500 µl de RPMI 1640 sin suero fueron adsorbidas por 1 hora a 37°C en agitación constante. El inóculo fue retirado y se agregaron 3 ml de RPMI 1640 conteniendo 0.3% de agar Indubiosa A-37 (*Biosera UK*) y 2.5% de STB. Después de 6-7 días de incubación a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>, las células fueron fijadas con 4 ml de formaldehído al 10% en PBS por 1 hora dentro de una campana de extracción. Los pozos fueron lavados con agua de grifo y el agar fue retirado y se esterilizó antes de desecharse. Los pozos fueron teñidos con 700 µl de una solución cristal violeta al 2% en 30% de MeOH. Las placas fueron contadas con la ayuda de un microscopio.  $PFU/ml = (\# \text{ de placas}) (\text{factor de dilución})^{-1}$



## 6.2. Virus recombinante VVM2

El virus rVVM2 fue titulado sobre monocapas de células HEp-2 en placas de 24 pozos ( $5 \times 10^3$  células/pozo). El virus fue inoculado en diluciones seriadas 1:10 en medio RPMI libre de suero en un volumen total de 200  $\mu$ l. Después de dos horas de incubación a 37°C/5% CO<sub>2</sub>, se agregaron 1.8 ml de medio RPMI/10 y las placas se incubaron por 24 horas. Posteriormente, se removió el sobrenadante y se adicionaron 300  $\mu$ l de carbol-fucsina y las placas se incubaron por 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. El colorante se retiró y el exceso del mismo se lavó con agua de grifo. Las placas se contaron con la ayuda del microscopio.  $PFU/ml = (\# \text{ de placas}) (\text{factor de dilución}) (5)$  *Nota de bioseguridad:* Las placas de titulación fueron mantenidas dentro de un recipiente parcialmente cerrado durante los tiempos de incubación.

## 7. TITULACIÓN DE VIRUS DE INFLUENZA POR ENSAYO DE HEMAGLUTINACIÓN (HAU/ml)

### 7.1. Obtención de eritrocitos

Se recolectaron 10 ml de sangre de humano grupo 'O' en solución de Alsevers para prevenir la coagulación (relación 1:1). Las células se lavaron 3 veces en solución de Alsevers centrifugando a 1800 g por 5 minutos y se resuspendieron en 15 ml de la misma solución. En estas condiciones los eritrocitos pueden almacenarse a 4°C hasta por 4 semanas. Con estos eritrocitos se preparó una suspensión al 10% en PBS, misma que fue diluida hasta una concentración del 0.5 % (solución de trabajo preparada el mismo día del ensayo).

### 7.2 Hemaglutinación

La titulación del virus de influenza se llevó a cabo en placas de fondo en "U", haciendo diluciones seriadas desde 1:10 hasta 1:2560 en 50  $\mu$ l de PBS por pozo. Como control negativo se usó 50  $\mu$ l de PBS. Posteriormente, se adicionaron 50  $\mu$ l de la suspensión de eritrocitos (0.5%) a cada pozo. El contenido de los pozos se mezcló con la ayuda de una micropipeta y la placa se incubó a temperatura ambiente por dos horas. La hemaglutinación se interpretó como la formación de una malla uniforme en el pozo. Como reacción negativa se consideró la formación de un botón celular en el fondo del pozo. El título corresponde al recíproco de la dilución más alta que muestra aglutinación y representa 1 HAU/50  $\mu$ l del virus.

## 8. AMPLIFICACIÓN DEL GENE QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA N DEL RSV A TRAVÉS DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

### 8.1 Extracción de RNA celular total

La extracción se hizo modificando el método de Chomezynski y Sacchi (*Chomezynski P & Sacchi N 1987*)

Las células del cultivo persistente y del no infectado se resuspendieron por pipeteo, se colocaron en un tubo Eppendorf y se centrifugaron por 5 segundos en la microfuga (15 000 rpm). El botón celular se lavó 3 veces con PBS y a las células obtenidas se les agregó 250  $\mu$ l

la solución D (*Isotiocianato de guanidina 4M, N-lauril sódico 0.5%, citrato de sodio 2mM pH 7.0* se adiciona *1mM de 2-mercaptoetanol en el momento de uso*), se agitó en vórtex durante 10 segundos y la mezcla se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 500  $\mu$ l de fenol saturado en agua, 500  $\mu$ l de acetato de sodio 2M (pH 4.0) y 100  $\mu$ l de cloroformo-alcohol isoamílico 25:1. Se agitó en vórtex por 10 segundos y se centrifugó por 10-15 minutos en la microfuga a temperatura ambiente. Se obtuvo el sobrenadante y se adicionaron 500  $\mu$ l de isopropanol frío. La mezcla se mantuvo toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$  para precipitar la mayor cantidad de RNA y se centrifugó por 10 minutos en la microfuga. La pastilla obtenida, se lavó dos veces con 200  $\mu$ l de etanol al 75% y se disgregó suavemente con la punta de la micropipeta, ya una vez hechos los lavados, la pastilla se dejó secar. Por último, el precipitado final se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua tratada con dietil pirocarbonato (agua-DEPC) para eliminar las posibles RNAsas. Posteriormente para verificar que el RNA obtenido no estuviera degradado, se hizo una electroforesis con un gel de agarosa al 1.2% en solución amortiguadora TBE 1X, adicionando 0.5 mg/ml de bromuro de etidio. De cada muestra se tomaron 3  $\mu$ l del RNA obtenido y 3  $\mu$ l del colorante de muestra (*EDTA 0.2 M/ 25% ficoll 400/ 0.1% azul de bromofenol*). El gel se corrió en solución amortiguadora TBE 1X a 80 Voltios durante 40 minutos. Para determinar la concentración de RNA obtenido, se hizo una dilución de la muestra 1:100 en TBE 1X y se hicieron las lecturas correspondientes a 260 nm, cada lectura se multiplicó por el factor de dilución (100) y luego por 20, ya que 1 D.O. corresponde a 20 mg/ml de RNA. Las muestras se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2. RT-PCR

En un tubo Eppendorf de 650  $\mu$ l se colocaron: 3-5  $\mu$ g de la muestra de RNA para amplificar, 4  $\mu$ l de amortiguador de reacción 5X, 2  $\mu$ l de 100 mM dithiothreitol, 2  $\mu$ l de la mezcla de deoxinucleósidos trifosfato (dNTP) (10 mM de cada dNTP), 0.5  $\mu$ l (20 U) de inhibidor de RNasa y el volumen final se completó a 20  $\mu$ l con agua-DEPC. Después de la adición de 50  $\mu$ l de aceite mineral, la mezcla se incubó por 5 minutos a  $80^{\circ}\text{C}$  y enfriada inmediatamente en hielo, después se agregaron 20 pmol del *iniciador 2* y se incubó a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. La mezcla fue enfriada por 5 minutos en hielo y después se le agregó 1  $\mu$ l (200 U) de transcriptasa reversa, la mezcla fue incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos y después a  $99^{\circ}\text{C}$  por 2.5 minutos.

A un volumen aproximado de 20  $\mu$ l el cual corresponde al producto total de transcripción, se le agregó 8  $\mu$ l del amortiguador 10X para PCR, 40 pmol de los dos iniciadores para el gen N (sentido y antisentido) y 0.5  $\mu$ l (25 U) de la Taq polimerasa (*Thermus aquaticus*). La mezcla se cubrió con 50  $\mu$ l de aceite mineral para evitar su evaporación durante la amplificación y el tubo se introdujo en el termociclador de DNA (*PERKIN-ELMER*) hasta completar 35 ciclos de amplificación (cada ciclo,  $94^{\circ}\text{C}$  por 1 min ;  $65^{\circ}\text{C}$  por 1.5 min ;  $72^{\circ}\text{C}$  por 1 min y  $72^{\circ}\text{C}$  por 7 min ). Posteriormente, se confirmó la amplificación para lo cual se tomaron 10  $\mu$ l del producto obtenido y se corrió un gel de agarosa de manera similar que para la extracción del RNA. La banda de DNA esperada fue de 278 pb. El peso molecular de la banda amplificada se calculó de acuerdo a los marcadores de peso molecular estándar. El resto se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los iniciadores que se utilizaron fueron diseñados para amplificar una

región entre los nucleótidos 858-1135 del gen N del RSV humano (*Cane P. et al. 1991*). Los iniciadores 1 y 2 corresponden a las siguientes secuencias:

Iniciador 1' (RNAm sentido) 5'GGAACAAGTTGTTGAGGTTTATGAATATGC3'

Iniciador 2' (RNAm antisentido) 5'CTTCTGCTGTCAAGTCTAGTACACTGTAGT3'

## 9. DETERMINACIÓN DE ANTÍGENO DE RSV POR TINCIÓN POR INMUNOPEROXIDASA

1x10<sup>5</sup> células de los cultivos MΦ o MΦP fueron dispuestas en portaobjetos de 8 pozos (Nunc # 177445) en medio RPMI/10. Una vez adheridas a la superficie del portaobjetos, las células fueron fijadas con 200 µl/pozo de una solución de metanol 100%/ 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 20 minutos a temperatura ambiente. Las células fijadas fueron lavadas con PBS/1% BSA e incubadas con 100 µl/pozo de anticuerpo anti-RSV hecho en cabra (*Brogenesis # 7950-0004*) diluido 1:200 en PBS/1% BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de un lavado adicional, se agregó un anticuerpo anti-cabra acoplado a peroxidasa (*Sigma # A-5420*) diluido 1:500 en PBS/1% BSA y se incubó nuevamente a temperatura ambiente por 30 minutos. La preparación se lavó nuevamente y se adicionaron 100 µl/pozo del sustrato (0.5 mg/ml de DAB en PBS + 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La reacción se detuvo después de 20 minutos lavando con PBS/1% BSA y se observó en un microscopio invertido. Al menos 300 células en diferentes campos fueron contadas en cada preparación.

## 10. MICROENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Se utilizó el método colorimétrico de Bradford cuya intensidad esta en función de la concentración de aminoácidos (a a), ya que el colorante se une principalmente a residuos de a.a. basicos (especialmente arginina) y aromáticos, obteniéndose el cambio de color azul brillante de Coomassie G250 en respuesta a varias concentraciones de proteínas (*Bradford M 1976*).

El microensayo se hizo agregando 50 µl/pozo de detergente (0.05% Triton-X100 en agua destilada) sobre las células contenidas en la placa de 96 pozos, de cada uno de ellos se tomaron 10 µl y se transfirieron a otro pozo limpio, como blanco se utilizó 10 µl de detergente y a todos los pozos se les agregó 200 µl/pozo del reactivo de color (diluido 1:5 en agua destilada). Paralelamente, se realizó una curva patrón diluyendo BSA en concentraciones conocidas en 0.05% Triton X-100. La lectura de la placa se hizo 5 minutos después de iniciada la reacción en un lector de ELISA (*BIOTLK # EI 307C*) a 495 nm. Las lecturas obtenidas se extrapolaron a la curva patrón y se multiplicaron por la cantidad de microlitros totales, calculando así la concentración de proteínas (mg/ml) en cada pozo.

## 11. ACTIVIDAD FAGOCITICA MEDIADA POR RECEPTORES Fc $\gamma$

El ensayo colorimétrico utilizado para determinación de este parámetro se basa directamente en la actividad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina (Hb) contenida en los eritrocitos fagocitados por el macrófago, la cual cataliza la aparición de un producto colorido a partir de la 3,3'-Diaminobencidina (DAB) en presencia de peróxido de hidrógeno. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de Hb.

### 11.1. Obtención de eritrocitos

En condiciones de esterilidad se obtuvieron 20 ml de sangre de carnero. Inmediatamente después se mezcló con la solución de Alsevers en proporción de 1:1.5 y 0.02 % de azida de sodio. Los eritrocitos se conservaron a 4°C por un periodo no mayor de 6 semanas.

### 11.2. Sensibilización de eritrocitos

La sensibilización de los eritrocitos se basó en la reacción dada entre el hapteno 2,4,6'-TNBS y los grupos amino libres de las proteínas en la superficie de los eritrocitos. Bajo las condiciones ligeramente alcalinas del proceso, se libera un grupo sulfónico quedando unido covalentemente a la célula. Para la sensibilización se disolvieron 3.2 mg de TNBS en 3.5 ml de BBS para mezclarse con 400  $\mu$ l del paquete globular de los eritrocitos de carnero, los cuales fueron previamente lavados 2 veces con DGVB<sup>2+</sup> (resuspendiendo el botón celular en 5 ml de DGVB<sup>2+</sup> y centrifugando 5 minutos a 1500 r.p.m. en cada lavado). La suspensión se mantuvo en oscuridad agitándose suavemente durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para retirar el exceso de TNBS libre, se hicieron nuevamente 2 lavados con DGVB<sup>2+</sup>. El botón celular resultante se resuspendió a una concentración del 2% en DGVB<sup>2+</sup>.

### 11.3. Titulación del anticuerpo anti-DNP.

Tomando en cuenta que gran parte de los anticuerpos específicos dirigidos contra el hapteno 2,4'-DNP tienen reacción cruzada con los grupos 2,4,6'-TNP, se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-DNP denominado 4F8 (obtenido y proporcionado por el laboratorio del Dr. Enrique Ortega). El anticuerpo fue titulado mediante ensayos de hemaglutinación utilizando placas de 96 pozos con fondo en "V" donde se hicieron diluciones seriadas del anticuerpo en DGVB<sup>2+</sup> en un volumen final de 25  $\mu$ l. A cada dilución se agregaron 25  $\mu$ l de la suspensión de eritrocitos previamente sensibilizados, el contenido de los pozos se mezcló cuidadosamente y se dejó sedimentar. Los eritrocitos aglutinados se sedimentaron en forma de malla en cambio los no aglutinados como botón en el fondo de pozo. Los controles fueron 25  $\mu$ l de DGVB<sup>2+</sup> y 25  $\mu$ l de eritrocitos no sensibilizados. El título se calculó de acuerdo a la última dilución que presentó aglutinación.

### 11.4. Opsonización de eritrocitos

La primera dilución no aglutinante del anticuerpo 4F8 se consideró como la concentración adecuada para la opsonización (*Wright S 1986*), de esa manera se evitó la formación de agregados celulares que difícilmente podrían fagocitarse. La opsonización se llevó a cabo mezclando la suspensión de eritrocitos sensibilizados con la cantidad de anticuerpo según el título obtenido. La mezcla se incubó en agitación constante y protegida de la luz por 30

minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los eritrocitos se lavaron dos veces con DGVB<sup>2-</sup> y el botón se resuspendió a una concentración del 1% en medio RPMI. Los eritrocitos se opsonizaron para cada ensayo y el volumen que se utilizó estuvo en función de los requerimientos del ensayo a realizar.

#### 11.5. Ensayo colorimétrico para cuantificar la actividad fagocítica mediada por receptores Fc $\gamma$

En placas de 96 pozos se sembraron  $1 \times 10^5$  células/pozo (M $\Phi$  o M $\Phi$ P) en 100  $\mu$ l de medio RPMI/10, la placa se incubó a 37°C/5% CO<sub>2</sub> por 6-12 horas. Una vez adheridas las células a la superficie de los pozos, se agregaron 25 ml de la suspensión al 1% de los eritrocitos opsonizados. Se incubó nuevamente bajo las mismas condiciones durante 90 minutos, después de los cuales se hizo un lavado sumergiendo la placa por completo en 400 ml de agua destilada (moviendo oscilatoriamente la placa durante 1 minuto sin vaciar su contenido) a fin de romper por choque hipotónico a los eritrocitos no fagocitados. Inmediatamente después se hicieron 2 o 3 lavados con PBS de la misma forma anterior a fin de eliminar la Hb liberada por los eritrocitos rotos, la placa se observó al microscopio para verificar la eficiencia de los lavados. El PBS se eliminó invirtiendo la placa y sacudiéndola rápidamente una sola vez. Se observó nuevamente al microscopio para verificar que las células permanecieran adheridas. Se añadieron 100  $\mu$ l/pozo de la solución de lisis (PBS/0.3% SDS) e inmediatamente después se agregaron 200  $\mu$ l/pozo del sustrato recién preparado (0.4 mg DAB/ 12  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ 1ml PBS). El contenido de los pozos fue homogenizado con una micropipeta multicanal para evitar interferencia en la lectura. Para eliminar pequeñas burbujas, la placa se centrifugó durante un minuto a 1500 r.p.m. Se hizo la lectura en un lector de ELISA a 490 nm 30 minutos después de iniciada la reacción. La actividad fagocítica en los M $\Phi$ P fue expresada en porcentaje tomando como un 100 % la actividad presentada por los M $\Phi$ . Con la finalidad de determinar si las células se conservaban adheridas a la placa durante el ensayo se determinó la concentración de proteínas por pozo antes y después de cada ensayo.

## 12. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES Fc $\gamma$ DE SUPERFICIE

La cuantificación de la expresión de receptores Fc para IgG se realizó a través de ensayos de citometría de flujo utilizando el anticuerpo monoclonal de rata 2.4G2 (IgG2b) anti Fc $\gamma$ RII/RIII marcado con FITC.

$1 \times 10^7$  células M $\Phi$  o M $\Phi$ P fueron teñidas con 3  $\mu$ g del anticuerpo anti-Fc $\gamma$ RII/RIII en un volumen total de 300  $\mu$ l de medio RPMI/10. Las muestras se incubaron durante 2 horas a 4°C en agitación constante. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces utilizando para cada lavado 500  $\mu$ l de PBS/1% BSA frío. Las células se fijaron agregando un ml de una solución de PFA recién preparado (PBS/0.5% PFA) e incubando por 30 minutos a 4°C en agitación constante. Después de lavar 2 veces nuevamente, las células fueron resuspendidas en un ml de PBS/0.1%BSA. Como controles se utilizaron las células de ambos tipos de cultivo pero sin la presencia del anticuerpo. Las muestras fueron adquiridas utilizando un FACScan Becton Dickinson y los datos fueron analizados utilizando el mismo programa de adquisición Lysis II.

### 13. DETERMINACIÓN DEL TNF- $\alpha$ EXTRACELULAR

Para determinar la actividad de esta citocina en el sobrenadante de las células M $\Phi$ N o M $\Phi$ P, se utilizó un ensayo biológico de alta sensibilidad basado en la lisis celular ocasionada por la unión del TNF- $\alpha$  a su receptor expresado en fibroblastos murinos (L929) tratados con actinomicina-D para detener la división celular (*Currents Protocols in Immunology 1991*). La actinomicina-D inhibe la síntesis de RNA ya que se une a DNA y bloquea el movimiento de la RNA polimerasa.

Las células L929 se sembraron en una placa de 96 pozos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pozo en 100  $\mu$ l de medio MEM/10. Después de incubar por 12 horas a 37°C/5%CO<sub>2</sub> y retirar totalmente el medio, se adicionaron 100  $\mu$ l de los sobrenadantes de prueba ( $1 \times 10^5$  células M $\Phi$  o M $\Phi$ P en 300  $\mu$ l de medio RPMI/10, después de 24 horas los sobrenadantes se recolectaron individualmente en tubos eppendorf y se centrifugaron por 5 segundos en la microfuga a fin de evitar la presencia de células en los sobrenadantes, ocasionando falsos positivos). Una vez dispuestos los sobrenadantes, se agregaron 50 ng de actinomicina D/pozo y la placa se incubó por 17 horas a 37°C/5%CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se retiraron los sobrenadantes y se hizo un lavado con 200  $\mu$ l de PBS para después adicionar 50  $\mu$ l/pozo de la solución colorante (0.05% de cristal violeta en 20% de etanol). Las células se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. El colorante se retiró y se hicieron dos lavados llenando los pozos con agua fría y eliminando muy cuidadosamente el agua con una micropipeta, evitando dañar la monocapa celular. La placa se dejó secando toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se agregaron 100  $\mu$ l/pozo de metanol (100%) y se leyó inmediatamente en un lector de ELISA a 595 nm. Como control negativo se utilizó 100  $\mu$ l/pozo de medio RPMI/10 (observándose una confluencia celular del 100%) y como control positivo 100  $\mu$ l/pozo (10 ng/ml) de TNF- $\alpha$  recombinante murino (R & D # 410-MT). El porcentaje de la actividad citotóxica se calculó de la siguiente manera: % = (D.O. Control negativo) (D.O. muestra) / (D.O. control negativo) (D.O. control positivo) X 100.

### 14. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE IL-6 EXTRACELULAR

Esta interleucina se determinó en los sobrenadantes de pases del cultivo M $\Phi$ P y M $\Phi$ , a través de un ELISA de captura, utilizando un anticuerpo conjugado con biotina como anticuerpo secundario.

En una placa de 96 pozos para EIA/RIA se añadieron 50  $\mu$ l/pozo del anticuerpo monoclonal anti IL-6 (PharMingen #18071D) (5  $\mu$ g/ml en solución amortiguadora de captura). La placa se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se retiraron los sobrenadantes y se hicieron 2 lavados (300  $\mu$ l/pozo PBS/0.05% Tween-20, para cada lavado se mantuvo esta solución al menos 1 minuto en contacto con la placa antes de aspirarla y retirarla totalmente sobre el papel secante). Posteriormente, se añadieron 200  $\mu$ l/pozo de una solución bloqueadora (PBS/10%SF<sub>6</sub>) y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Después de hacer nuevamente 2 lavados, se adicionaron 100  $\mu$ l de los controles y de los sobrenadantes de prueba a los pozos correspondientes ( $5 \times 10^4$  células M $\Phi$  o M $\Phi$ P en 300  $\mu$ l de medio RPMI/10 después de 24 horas

Los sobrenadantes de prueba se recogieron de la misma manera que para TNF- $\alpha$ ). La reacción se incubó toda la noche a 4°C y se hicieron 4 lavados. Se agregaron 100  $\mu$ l del anticuerpo monoclonal biotinilado anti IL-6 (*PharMingen #18082D*) (2  $\mu$ g/ml en PBS/10%SFB) y la mezcla se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente y se hicieron 6 lavados. Posteriormente, se agregaron 100  $\mu$ l de streptavidina-peroxidasa (1:300 en PBS/10% SFB) y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de hacer un mínimo de 8 lavados, se adicionaron 100  $\mu$ l del sustrato (150 mg 2,2'-Azimo-bis (3-ethylbenzthiazoline-ácido sulfónico) en 500 ml de ácido cítrico 0.1M pH 4.35 ajustando con NaOH. Antes de usarse se agregaron 10 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% por cada 11 ml de sustrato) y se esperó a que la reacción desarrollara color (10-80 minutos). La reacción se leyó a 405 nm en un lector de ELISA. En el control negativo se utilizaron 100  $\mu$ l de medio RPMI/10. Paralelamente a cada ensayo se hizo una curva patrón de IL-6 (*R & D # 406-ML*) en diluciones seriadas de 20 a 1 ng/ml en medio RPMI/10 donde se extrapolaron los datos obtenidos para determinar la concentración de IL-6 en las muestras.

## 15. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE IL-1 $\beta$ EXTRACELULAR

Para la determinación de esta citocina se empleó un inmunoensayo de ELISA de captura Quantikine™ M (*R & D Systems # MLB00*).

Para la obtención de las muestras, se dispusieron 1x10<sup>5</sup> células (M $\Phi$  o M $\Phi$ P) en 500  $\mu$ l de medio RPMI/10, después de 24 horas los sobrenadantes de prueba se recolectaron de la misma manera que para la determinación de TNF- $\alpha$ . 50  $\mu$ l de cada muestra y controles se agregaron a los pozos de la placa pre-tratada con un anticuerpo monoclonal anti IL-1 $\beta$ . La placa se incubó por dos horas a temperatura ambiente y posteriormente se hicieron cuatro lavados con el reactivo correspondiente. Se agregaron 100  $\mu$ l del anticuerpo policlonal conjugado anti-IL-1 $\beta$  y se incubó nuevamente por dos horas a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados y se agregaron 100  $\mu$ l/pozo del sustrato antes de incubar la placa 30 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz. Por último, se agregaron 100  $\mu$ l del reactivo para detener la reacción y la densidad óptica fue leída a 450 nm. Los datos obtenidos fueron extrapolados a la curva patrón incluida en el ensayo.

## 16. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO PERSISTENTE P388D1*Per*

El cultivo P388D1*Per* (macrófagos persistentemente infectados con RSV) se estableció de acuerdo a las condiciones reportadas por Sarmiento R y colaboradores (*Sarmiento R et al 2001*). Brevemente, 1 X 10<sup>6</sup> macrófagos P388D1 (H-2<sup>d</sup>) fueron infectados con RSV cepa Long a una m.o.i. de 10 por 2 horas a 37°C. Después de la incubación, se agregaron 5 ml de medio RPMI/10. Las células que sobrevivieron se propagaron y subcultivaron. En el pase número 5, el cultivo se super-infectó con RSV a una m.o.i. de 50 y las células que sobrevivieron se subcultivaron en medio RPMI/10. Con la finalidad de incrementar el porcentaje de células infectadas, se hizo una selección de las células que expresaban antígeno de RSV. 4 x 10<sup>6</sup> células de los pases 12-14 del cultivo persistente (P388D1*Per*) se incubaron con 500  $\mu$ l del anticuerpo policlonal biotinilado (*Biogenesis # 920 0101*) diluido 1:100 en solución

amortiguadora (PBS/ASB 0.5%/ EDTA 2mM) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, las células fueron incubadas con 30 µl de microesferas magnéticas acopladas a estreptavidina (Miltengy Biotec # 481-02) por 15 minutos a 4°C. Las células se lavaron nuevamente como se mencionó anteriormente, se resuspendieron en 500 µl de la solución amortiguadora y se pasaron a través de una columna *Mac's MS<sup>+</sup>*™ (Miltengy Biotec # 422-01) en medio de un campo magnético. Las células no teñidas fueron recolectadas como la fracción negativa. Después de 2 lavados con la misma solución, la columna fue retirada del campo magnético y se recolectaron las células correspondientes a la fracción positiva. Las células se lavaron nuevamente con RPMI/10 y se resuspendieron en 30 ml de RPMI/10. Las células sobrevivientes se subcultivaron aproximadamente dos veces a la semana y la persistencia del RSV fue verificada y monitoreada mediante la detección de proteínas virales y la producción de virus extracelular.

## 7. DETERMINACIÓN DE ANTÍGENO VIRAL POR CITOMETRÍA DE FLUJO

### 7.1 Proteínas de superficie de RSV

La determinación de proteínas de RSV (F0 y F2-F1) en la superficie de células infectadas se realizó tanto en células P388D1, P388D1*Per* como en células P388D1 infectadas con RSV a una m.o.i. de 2.0 por 24-48 horas. Se utilizó una mezcla de anticuerpos monoclonales marcados con FITC. 3X10<sup>5</sup> células por muestra fueron incubadas con 100 µl de un anticuerpo monoclonal de rata para bloquear los receptores Fcγ (*Pharmingen* # 553141) diluido 1:500 (en PBS/1% BSA) durante 30 minutos a 4°C. Después de dos lavados con PBS/1% BSA, se agregaron 100 µl de anticuerpos anti-RSV (*Dako IMAGEN* # K6102) diluidos 7.100, las células se incubaron por 30 minutos a 4°C. Finalmente se hicieron 3 lavados con PBS/1% ASB y las muestras se analizaron utilizando el citómetro de flujo Coulter EPICS Elite. De cada muestra se analizaron 30, 000 células.

### 7.2 Doble tinción de proteínas intracelulares de RSV y virus de influenza

La determinación de la expresión de antígeno intracelular se llevó a cabo en células P388D1 y P388D1*Per* mediante ensayos de doble tinción intracelular. Células P388D1 y P388D1*Per* fueron lavadas dos veces con RPMI y posteriormente fueron infectadas con virus de influenza cepa A/X31 (50 HAU por cada 1 X 10<sup>6</sup>) por 90 minutos. Las células fueron lavadas dos veces con RPMI/10 y fueron mantenidas en este medio por 9 horas hasta la determinación de la expresión de antígeno intracelular. Aproximadamente 3 X10<sup>5</sup> células/muestra fueron fijadas con 500 µl de formaldehído al 4% en PBS por 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron lavadas dos veces con 100 µl de PBS/1% BSA. Una vez lavadas las células, las membranas celulares fueron permeabilizadas con 100 µl de una solución de saponina (0.5% de saponina/PBS/1% BSA/0.1% azida de sodio) por 10 minutos. Todos los lavados posteriores y diluciones de anticuerpos se realizaron utilizando la solución de saponina y las incubaciones se hicieron a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas con 100 µl de un anticuerpo monoclonal anti-NP de Influenza (*Serotec* # MCA100) diluido 1:100. Después de dos lavados, las muestras se incubaron con 100 µl de un segundo anticuerpo marcado con FITC (*Sigma* # F1010) diluido 1:250. Pasado el tiempo de incubación las muestras se lavaron nuevamente dos veces y se incubaron con 100 µl de un anticuerpo



monoclonal anti-RSV biotinilado (*Biogénesis* # 7950-0104) diluido 1:100. Después de dos lavados más, la reacción antígeno anticuerpo fue revelada por la adición de 100 µl de estreptavidina conjugada con Q.R. (*Stigma* #S-2899) diluida 1.500. Finalmente, las muestras fueron lavadas dos veces con la solución de saponina y una vez con PBS/1% BSA/ 0.1% de azida de sodio. Las muestras fueron mantenidas a 4°C hasta su adquisición utilizando el citómetro de flujo Coulter EPICS Elite. Para cada muestra al menos 30,000 células fueron consideradas para su análisis utilizando el programa WinMDI (*San Diego CA, USA*).

## 18. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN EN SUPERFICIE DE LAS MOLÉCULAS CLASE I Y II DEL MHC

La expresión en superficie de las moléculas clase I del MHC fue determinada en  $3 \times 10^5$  células tanto del cultivo P388D1 como de P388D1Per. Para la determinación de la expresión de las moléculas clase I, las muestras fueron primero incubadas con 100 µl de inmunoglobulina humana (*Seroglobin. PROBIFASA S.A. de C.V.*) diluida 1:40 en RPMI para bloquear los receptores para Fc. Posteriormente, las muestras fueron incubadas en 100 µl de cada uno de los sobrenadantes de los hibridomas productores de los anticuerpos anti-moléculas clase I del MHC por 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células fueron lavadas dos veces con PBS/0.1% BSA frío y teñidas con un anticuerpo anti-ratón marcado con FITC (*Becton Dickinson* # 9031) diluido 1.25 durante 30 minutos a 4°C. Las células fueron lavadas y fijadas con 100 µl de formaldehído (4% en PBS) por 20 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar dos veces, las células fueron mantenidas a 4°C para su posterior adquisición en el citómetro de flujo Coulter EPICS Elite. Para cada muestra al menos 30,000 células fueron consideradas para su análisis utilizando el programa WinMDI (*San Diego CA, USA*). Para la determinación de las moléculas clase II, las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C con 100 µl de un anticuerpo para bloquear receptores Fcγ (FcBlock) (*PharMingen* # 01241A) diluido 1:200 en PBS/BSA 1%. Después de dos lavados con 200 µl de PBS/BSA 1%, las muestras fueron incubadas nuevamente por 30 minutos a 4°C con 100 µl de un anticuerpo anti I-A<sup>d</sup> acoplado a PE (*PharMingen* # 06035A) diluido 1:250. Como control de isotipo se usó un anticuerpo de ratón IgG2b (*PharMingen* #11035A) diluido 1:250. Por último, las células fueron lavadas, fijadas y analizadas con el mismo procedimiento mencionado anteriormente para la determinación de las moléculas MHC I.

## 19. PRESENTACIÓN DE ANTIGENO

### 19.1. Inmunización de animales

Ratones BALB/c de 8-10 semanas de edad (*Harlan Olac Ltd.*) fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos. Para inmunizar ratones con RSV, los ratones fueron rasurados en la base de la cola. Después de 2 a 24 horas, los animales se infectaron con 10 µl de rVV-M2 ( $10^5$  a  $5 \times 10^7$  PFU/ml), el volumen fue dispuesto en el área rasurada y distribuido en un área de 1 cm<sup>2</sup> y con la ayuda de una aguja se hicieron de 60 a 100 raspaduras muy leves. Después de dos semanas, estos mismos animales fueron infectados intranasalmente con  $3 \times 10^6$  PFU de RSV en un volumen de 50 µl de móculo. Los animales inmunizados con influenza fueron

ligeramente anestesiados con éter y se infectaron con 30 HAU del virus de influenza en 50  $\mu$ l de PBS vía intranasal. Los bazo de los animales inmunizados con RSV o con influenza, fueron utilizados 2-3 semanas después completado el esquema de infección.

### 19.2. Producción de células citotóxicas virus-específicas

Los bazo de los animales inmunizados (ya sea de animales infectados con RSV o con influenza) fueron removidos y disgregados a través de una malla de nylon y los eritrocitos fueron eliminados con una solución de cloruro de amonio. Como células respondedoras, se utilizaron directamente  $1.5 \times 10^7$  células que fueron dispuestas en botellas de cultivo de 25-cm<sup>2</sup> en 10 ml de RPMI/10. Para estimular estas células, se infectaron  $3.8 \times 10^6$  células ya sea con 2.0 PFU RSV por célula o con 1000 HAU de virus de influenza A/X31 por cada  $10^7$  células, y se incubaron por 2 horas a 37°C. Estas células estimuladoras fueron resuspendidas en 5 ml de RPMI/10 y agregadas (sin lavar) a las botellas individuales conteniendo las células respondedoras para completar 15 ml como volumen total por botella. Las botellas fueron incubadas a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> por 5 días para generar las células citotóxicas específicas (respondedoras).

### 19.3 Preparación de células blanco para los ensayos de citotoxicidad

Las células usadas en los ensayos de citotoxicidad fueron P388D1 y P388D1*Per*. Las células P815 (H-2<sup>d</sup>) fueron usadas como control. Las células blanco para las CTL-RSV específicas fueron infectadas a una m.o.i. de 2.0 antes de la suspensión a la concentración de  $10^6$  células por ml en RPMI/10 por 24 horas de incubación. Las células blanco para las CTL-influenza específicas fueron infectadas con el virus A/X31 (500 HAU/ $10^7$  células) o bien pulsadas toda la noche con el péptido de la proteína NP<sub>147-155</sub> de influenza a una concentración de  $10^{-8}$ M. Las células blanco previamente infectadas con RSV o pulsadas con el péptido fueron marcadas durante 1.5 h a 37°C con Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> (10  $\mu$ Ci/ $10^6$  células). Las células blanco infectadas con influenza fueron simultáneamente marcadas con el <sup>51</sup>Cr al mismo tiempo que la infección con el virus A/X31. Todas las células blanco fueron lavadas tres veces con 10 ml de RPMI/10 e incubadas por 1 hora a 37°C previo a los ensayos de citotoxicidad para reducir el fondo en la lisis específica de las células blanco.

### 19.4 Ensayos de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad fueron llevados a cabo por triplicado en una placa de 96 pozos con fondo en "V" usando  $1 \times 10^4$  células blanco marcadas y distintas relaciones blanco efectoras por pozo en un volumen total de 200  $\mu$ l. Después de 6 horas, las placas fueron centrifugadas a 2000 r.p.m. por 2 minutos y 50  $\mu$ l del sobrenadante fueron analizados en un contador gamma (*Top Count Packard*). El porcentaje de lisis específica (L) se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:  $L = [(muestra\ c.p.m. - liberación\ espontánea\ c.p.m.) / (total\ c.p.m. - liberación\ espontánea\ c.p.m.)] \times 100$ , donde el total cpm es la radioactividad liberada por las células blanco tratadas con Triton X-100 (2 % en agua destilada) y la liberación espontánea es obtenida al incubar las células blanco sin CTLs.

## 20. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de las diferencias entre los cultivos de macrófagos no infectados y macrófagos persistentemente infectados con RSV fue hecho usando la prueba de Mann-Whitney. Los valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos cuando ambos grupos fueron comparados.

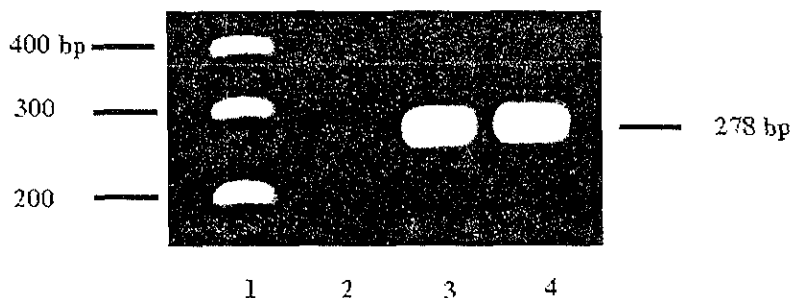
# RESULTADOS

## 1. CONFIRMACIÓN DE LA PRESENCIA Y EXPRESIÓN DEL RSV EN LAS CÉLULAS MΦP

En el trabajo actual, la persistencia del RSV en el cultivo MΦP se monitoreó a través de la determinación de la expresión de RNA y antígenos virales mediante ensayos de RT-PCR e inmunoperoxidasa respectivamente.

### 1.1. Expresión de RNA del RSV en células del cultivo MΦP

Un criterio tomado en cuenta para comprobar la persistencia del RSV en el cultivo MΦP, fue la determinación de la presencia del genoma del virus en las células infectadas a través de la amplificación de alguno de los genes virales por medio de RT-PCR. Se decidió amplificar el gen que codifica para la proteína N del RSV ya que la secuencia de este gen (el cual consta de 1203 nucleótidos), es una de las mas conservadas en el genoma del virus de cepas de aisladas de pacientes. Además, es una secuencia única por lo que se descartó la unión inespecífica de los iniciadores como lo reporta Cane P. y cols (*Cane P et al 1991*). En la figura 1 se observa un gel de agarosa al 1.2% que muestra el cDNA amplificado por RT-PCR correspondiente a un segmento del gen que codifica para la proteína N. el segmento se observa como una banda de 278 pb, (*figura 1*, carril 4) calculada de acuerdo a los pesos moleculares (50-2000 pb), que corresponden al DNA proveniente del plásmido pBR322 (*figura 1*, carril 1). A lo largo del estudio se analizaron distintos pases del cultivo persistente observándose la banda mencionada como la que se observa en un pase representativo del cultivo persistente (*figura 1*, carril 2). Como control negativo se utilizó RNA de células sin infectar (MΦ) y para el control positivo se extrajo el RNA de macrófagos infectados en forma aguda con el RSV a una m.o.i. de 5.0 después de 48 horas de infección (MΦA) (*figura 1*, carril 3)



**Figura 1** Detección del RNAm de la proteína N del RSV en los macrófagos infectados persistentemente con el virus. La banda de 278 pb corresponde al producto amplificado de una secuencia conservada (entre los nucleótidos 858 y 1135) del gen N del RSV. Carril 1. Pesos moleculares 50-2000 pb, Carriles 2-4 RNA extraído de MΦ, MΦA y de un pase representativo (numero 30) del cultivo MΦP, respectivamente.

## 2. Expresión de antígeno de RSV en células del cultivo MΦP

Otro criterio para monitorear la persistencia del RSV en los macrófagos, fue la determinación de expresión de antígeno viral y el porcentaje de células infectadas a través de tinción de inmunoperoxidasa utilizando un anticuerpo policlonal anti-RSV y un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa. Esta tinción se llevó a cabo como sistema de monitoreo realizándolo previo a cada ensayo tanto del estudio de la actividad fagocítica como de la producción de las citocinas pro-inflamatorias. Se analizaron diferentes pases del cultivo RSV persistente (MΦP) a lo largo de todo el estudio a partir del pase 12 hasta el pase 30, obteniéndose un porcentaje constante de células infectadas. Como control negativo se utilizaron células sin infectar (*figura 2C*). Los resultados reflejan la obtención de un cultivo heterogéneo donde existe un porcentaje de células infectadas de aproximadamente un 75 a 80 % (*figura 2 A y B*).

Una vez comprobada la persistencia viral en los macrófagos persistentemente infectados con RSV, se determinó una serie de actividades dispensables para el macrófago con la finalidad de evaluar el efecto de la persistencia del RSV sobre estas células. Las actividades analizadas fueron:

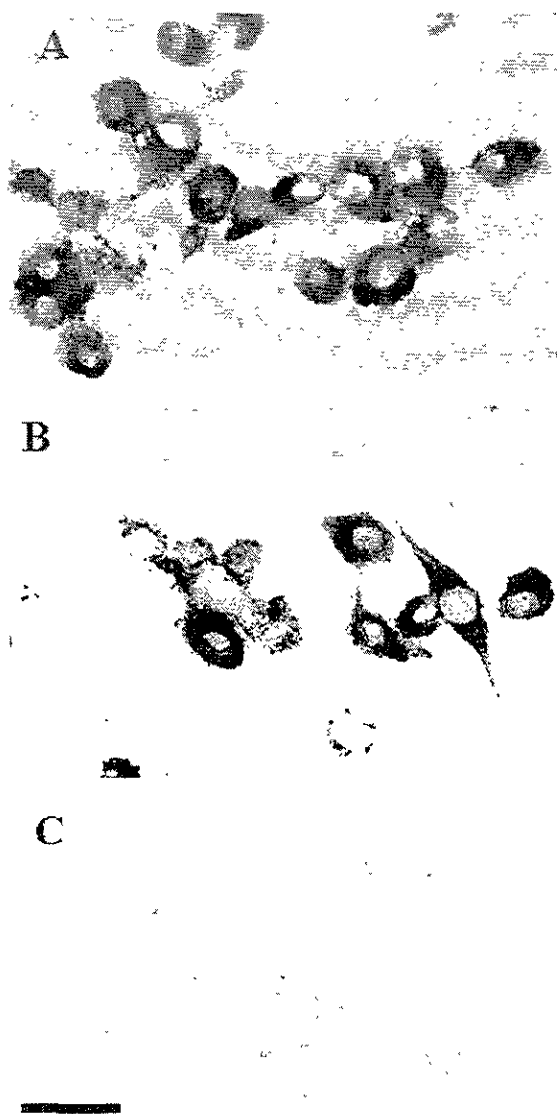
- a) Actividad fagocítica.
- b) Expresión de receptores Fcγ
- c) Producción extracelular de citocinas pro inflamatorias incluyendo: IL-1β, IL-6 y TNF-α.
- d) Expresión de las moléculas clase I y II del MHC.
- e) Presentación de antígeno

En todas las determinaciones, el comportamiento de las células persistentes se comparó con el de los macrófagos sin infectar.

## 2. ACTIVIDAD FAGOCÍFICA

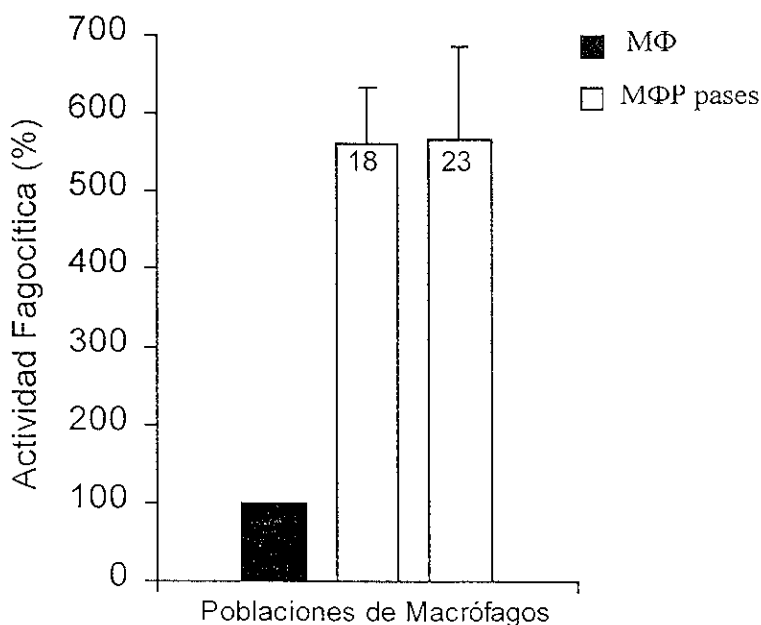
### 2.1 Determinación de la actividad fagocítica mediada por receptores Fcγ en los MΦP

Para la determinación de este parámetro se realizaron 4 ensayos con un total de 8 pases del cultivo persistente. La fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG fue cuantificada midiendo la actividad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina por medio de un ensayo colorimétrico. Después de disponer las células en los pozos y después de realizar cada ensayo, se determinó la concentración de proteínas (mg/ml) por el método de Bradford analizando un pozo de cada pase del cultivo de MΦP y de células MΦ para confirmar que la cantidad de células fueran las mismas en todos los pozos después de los lavados realizados durante la medición de la actividad fagocítica. Los datos fueron expresados como porcentaje de fagocitosis definida.



**Figura 2.** Expresión de proteínas virales en los macrófagos persistentemente infectados con RSV. Células de MΦP y MΦ fueron fijadas y tratadas con anti-RSV y la reacción antígeno anticuerpo fue revelada usando un conjugado de peroxidasa como segundo anticuerpo. (A y B). MΦP y (C) MΦ. Barra 50  $\mu$ m.

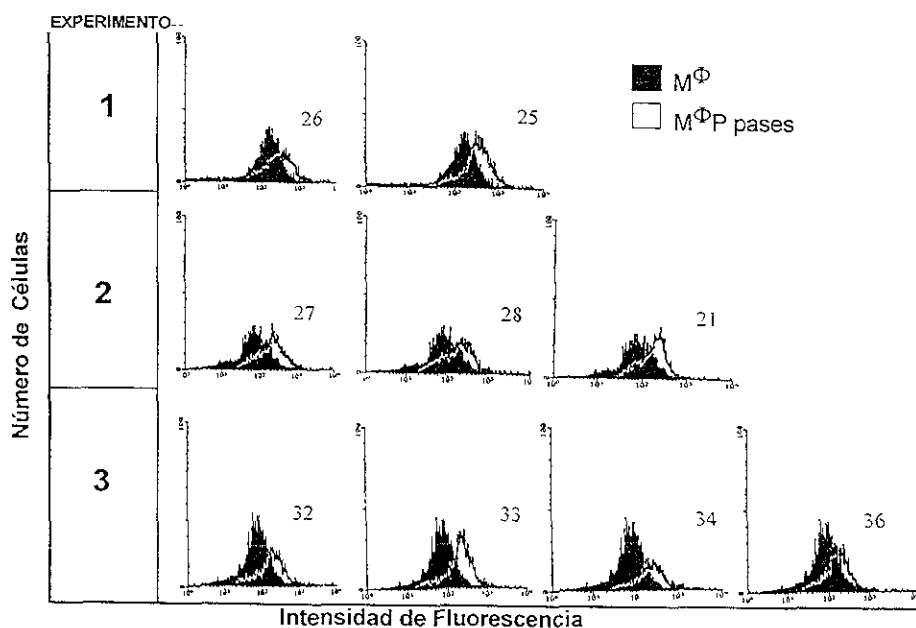
como se mencionó en material y métodos. En la *figura 3* se muestra un experimento representativo de los cuatro que se llevaron a cabo donde se observa que los macrófagos persistentemente infectados mostraron una actividad fagocítica significativamente mas alta que las células no infectadas ( $P < 0.004$ ). El porcentaje de incremento al comparar los macrófagos persistentes y las células sin infectar resultó en un 460 % mas alto.



**Figura 3.** La persistencia del RSV en macrófagos incrementa su actividad fagocítica mediada por receptores  $Fc\gamma$ . Los valores en la ordenada corresponden al porcentaje de actividad fagocítica. La barra oscura representa las células sin infectar. Las barras claras representan distintos pases de las células MΦP ( $P < 0.004$ ). Los números dentro de cada barra corresponden al número de pase analizado. Experimento representativo de cuatro experimentos independientes.

## 2.2. Determinación de la expresión de receptores $Fc\gamma RII/Fc\gamma RIII$ en la superficie de los $M\Phi P$ y $M\Phi$

Con la finalidad de determinar si el aumento observado en la fagocitosis específica del cultivo  $M\Phi P$  estaba dado por un incremento en los  $Fc\gamma R$ , se cuantificaron los receptores  $Fc\gamma RII/III$  expresados en la superficie de los macrófagos a través de citometría de flujo, utilizando un anticuerpo monoclonal de rata marcado con FITC. Se realizaron tres experimentos con un total de 9 pases del cultivo RSV persistente. Como se muestra en la figura 4, se observó un incremento en la expresión de los receptores  $Fc\gamma$  en la superficie de los  $M\Phi P$  cuando se comparó con los macrófagos sin infectar ( $M\Phi$ ). El incremento fluctuó entre un 71 y un 171 % y fue estadísticamente significativo ( $P=0.05$ ).



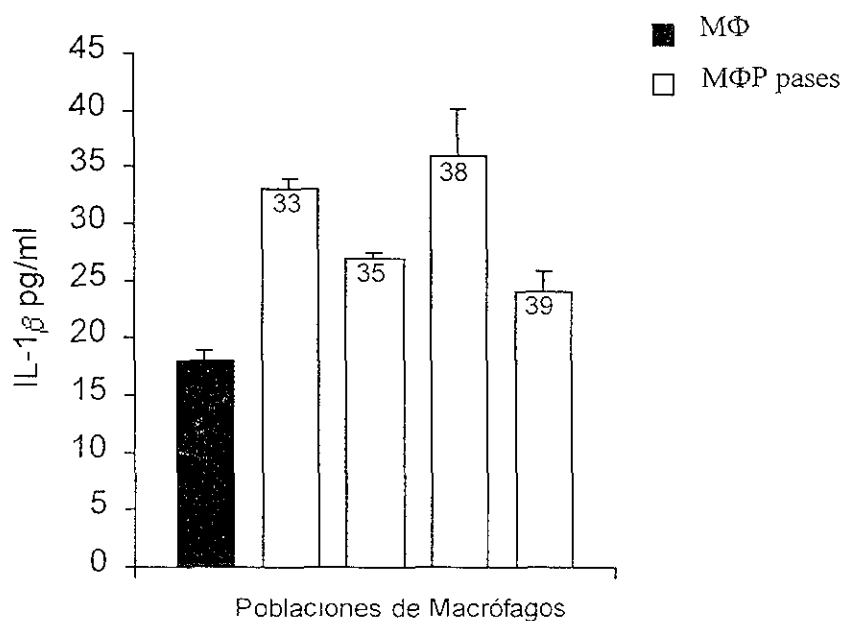
**Figura 4** La persistencia del RSV en macrófagos incrementa significativamente la expresión de receptores  $Fc\gamma RII/III$  en la membrana de los macrófagos. Determinación mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo monoclonal de rata marcado con FITC. Los histogramas rellenos corresponden a los macrófagos sin infectar y los histogramas claros a los diferentes pases analizados del cultivo RSV persistente. Los números en los recuadros corresponden al número de cada experimento realizado.  $P < 0.05$



### 3. PRODUCCIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS

#### 3.1. IL-1 $\beta$

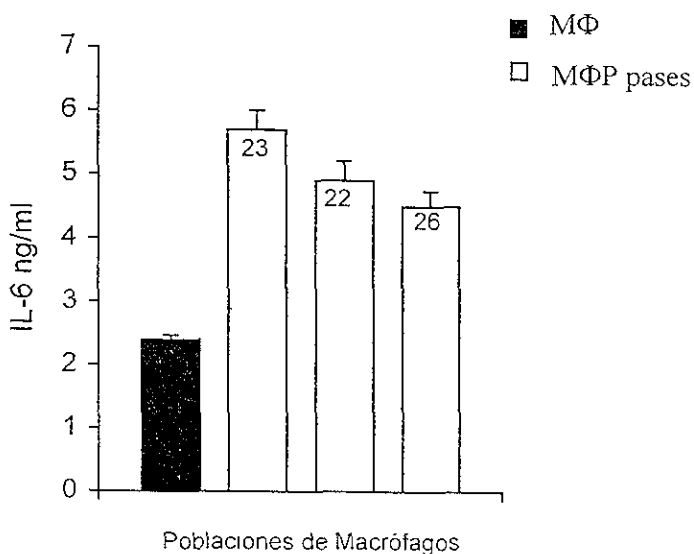
La producción extracelular de la IL-1  $\beta$  se determinó en los sobrenadantes de los cultivos M $\Phi$ P y M $\Phi$  mediante ensayos de ELISA de captura. En la *figura 5* se muestra un experimento representativo de tres experimentos realizados. La concentración de IL-1  $\beta$  expresada en pg/ml fue determinada en diferentes pases del cultivo persistente. Los resultados de esta determinación revelan un incremento significativo en la concentración IL-1  $\beta$  producida por los M $\Phi$ P cuando se comparó con la producción de los M $\Phi$ . El incremento varió entre un 30 a un 100 % ( $P=0.01$ ).



**Figura 5** Incremento en la producción de la IL-1 $\beta$  por efecto de la persistencia del RSV en los macrófagos M $\Phi$ P. Sobrenadantes libres de células de pases de M $\Phi$ P o de células M $\Phi$  fueron recolectados después de 24 horas de incubación y la concentración de IL-1 $\beta$  fue determinada como se describió en material y métodos. La concentración de IL-1 $\beta$  fue calculada de una curva estándar obtenida con IL-1 $\beta$  recombinante murina. Barras oscuras (M $\Phi$ ), barras claras (Pases de células M $\Phi$ P). Los datos representan el promedio de tres determinaciones ( $P=0.01$ ). Los números dentro de las barras representan el número de pase del cultivo M $\Phi$ P analizados en cada ensayo. Los datos corresponden a un experimento representativo de cuatro experimentos independientes.

### 3.2 IL-6

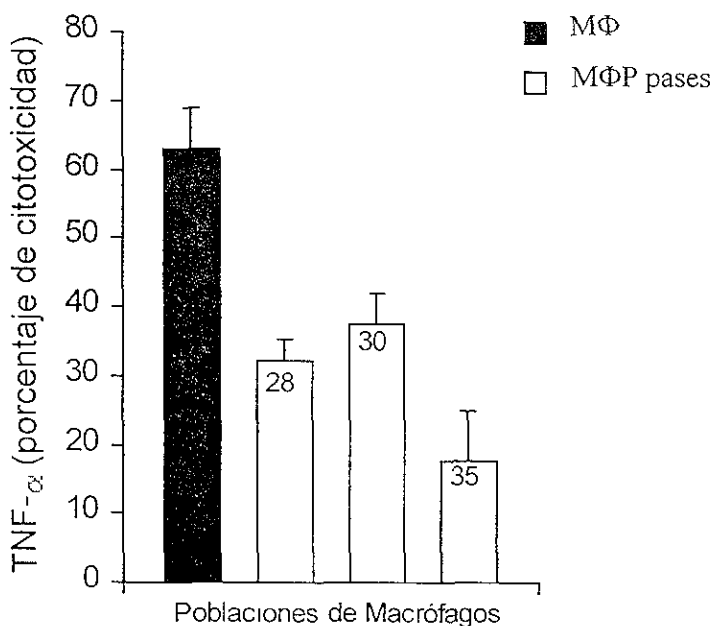
La determinación de esta interleucina en los sobrenadantes de las células infectadas se realizó mediante ensayos de ELISA de captura utilizando dos anticuerpos monoclonales. Los resultados de estos ensayos revelan un incremento significativo en la concentración (ng/ml) de IL-6 producida por los MΦP con respecto a los MΦ. Los datos mostrados en la *figura 6* muestran los valores en D O correspondientes a un experimento representativo de los 3 ensayos realizados. Los valores obtenidos en cada ensayo corresponden al promedio de al menos 3 determinaciones para cada muestra. El incremento varió de un 87 % a un 140 % en los diferentes pases estudiados ( $P=0.017$ ).



**Figura 6.** Incremento en la producción de la IL-6 (ng/ml) en los sobrenadantes de macrófagos persistentemente infectados con RSV. Determinación por ensayos de ELISA de captura. Las barras oscuras representan células sin infectar. Las barras claras representan diferentes pases de MΦP analizados. Los números dentro de cada barra corresponden a diferente número de pase. Los datos mostrados corresponden a un ensayo representativo de tres experimentos independientes ( $P=0.017$ ).

### 3.3. TNF- $\alpha$

La actividad del TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes de los M $\Phi$ P fue determinada a través de ensayos de citotoxicidad en células L929 en presencia de actinomicina D. Los resultados reflejan una disminución en la actividad del TNF- $\alpha$  en los M $\Phi$ P con respecto a los macrófagos sin infectar. En la *figura 7* se muestran los datos correspondientes a un experimento representativo de 6 experimentos. La disminución varió entre un 70% y un 250 % entre los pases analizados. El efecto de disminución fue estadísticamente significativo ( $P=0.02$ )



**Figura 7.** Disminución en la actividad citotóxica del TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes de los macrófagos persistentemente infectados con el RSV. La actividad del TNF- $\alpha$  fue determinada usando células L929 en presencia de actinomicina D. Las barras oscuras corresponden a los sobrenadantes de los M $\Phi$ . Las barras claras representan los sobrenadantes de los M $\Phi$ P. Los números dentro de cada barra corresponden al número de pase analizado ( $P=0.02$ )

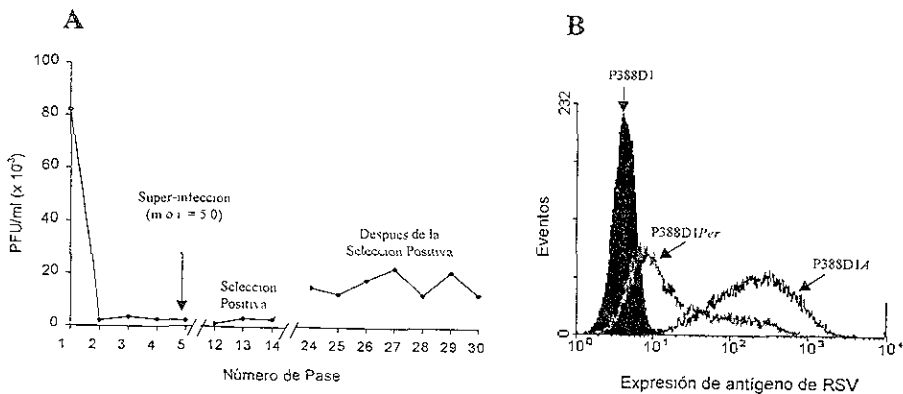
## 4 ESTABLECIMIENTO DE LA PERSISTENCIA DEL RSV EN MACROFAGOS (CULTIVO NUEVO)

Debido a que el cultivo previamente establecido se perdió durante el traslado a Londres donde se había planeado realizar los experimentos que se describen a continuación, fue necesario establecer nuevamente el cultivo de macrófagos persistentemente infectados con RSV. Se utilizó la línea celular P388D1 obtenida de ECACC y se infectó con la cepa RSV Long del laboratorio del Dr. Openshaw de acuerdo a las condiciones reportadas por Sarmiento et al. (Sarmiento R et al. 2001).

### 4.1 Establecimiento y monitoreo de la infección persistente en macrófagos

La persistencia del RSV en macrófagos (P388D1 $_{Per}$ ) fue establecida al subcultivar las células que sobrevivieron después de infectar las células P388D1 con el RSV a una multiplicidad de infección de 1.0. Sin embargo el porcentaje de células positivas fue bajo (alrededor de un 10 %). Con la finalidad de reducir la población de células sin infectar dentro del cultivo persistente, las células del pase número 5, fueron super infectadas a una m.o.i. de 5.0, esperando que las células no infectadas no sobrevivieran a la infección de alta multiplicidad. No obstante que se observó una alta muerte celular (aproximadamente un 80%), el porcentaje de células persistentemente infectadas continuó bajo (15 %). La siguiente estrategia utilizada para incrementar el porcentaje de células infectadas fue la selección positiva de células infectadas mediante el uso de un anticuerpo policlonal anti-RSV biotinilado y microesferas magnéticas acopladas a biotina anticuerpos y una columna en presencia de un campo magnético. Después de la selección el porcentaje se incrementó hasta un 40 % (figura 8B).

La persistencia viral fue confirmada por la producción continua de virus infeccioso extracelular y por la expresión de antígeno viral en las células. Aunque el título de virus extracelular (figura 8A) no fue significativamente diferente del producido en el cultivo anteriormente establecido, un menor porcentaje de células positivas (10-16 % vs 40-80 % respectivamente) fue observado en los pases iniciales del cultivo. De los macrófagos positivamente seleccionados se obtuvo un cultivo con mayor porcentaje de células que expresan antígeno viral (~30-40%). La concentración de virus extracelular también varió, incrementándose de  $1-3.6 \times 10^3$  PFU/ml hasta una concentración de  $1-2.3 \times 10^4$  PFU/ml después de la selección positiva (figura 8B). Es importante mencionar que aunque previo a la separación se observó un porcentaje pequeño de células infectadas con RSV, estas células estuvieron presentes en todos los pases, mostrando que la infección viral puede permanecer a través de los pases. Los pases del 24 al 30 fueron utilizados para realizar las posteriores determinaciones.



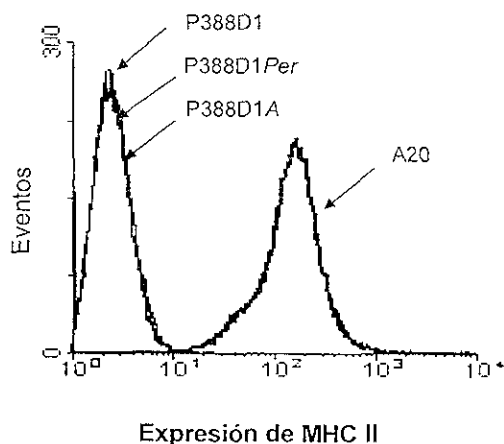
**Figura 8.** Producción de virus infeccioso y expresión de antígeno de RSV de los P388D1Per. **A**, sobrenadantes de diferentes pases del cultivo P388D1Per fueron analizados para determinar la presencia de virus infeccioso por ensayos de placa. **B**, macrófagos persistentemente infectados con RSV (P388D1Per); macrófagos no infectados (P388D1) y macrófagos infectados con RSV 48 horas antes del ensayo (P388D1A) fueron teñidos con anticuerpos monoclonales anti-RSV conjugados con FITC y analizados por citometría de flujo.

## 5. PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO

### 5.1 Expresión de las moléculas del MHC en la superficie de los macrófagos persistentemente infectados con RSV

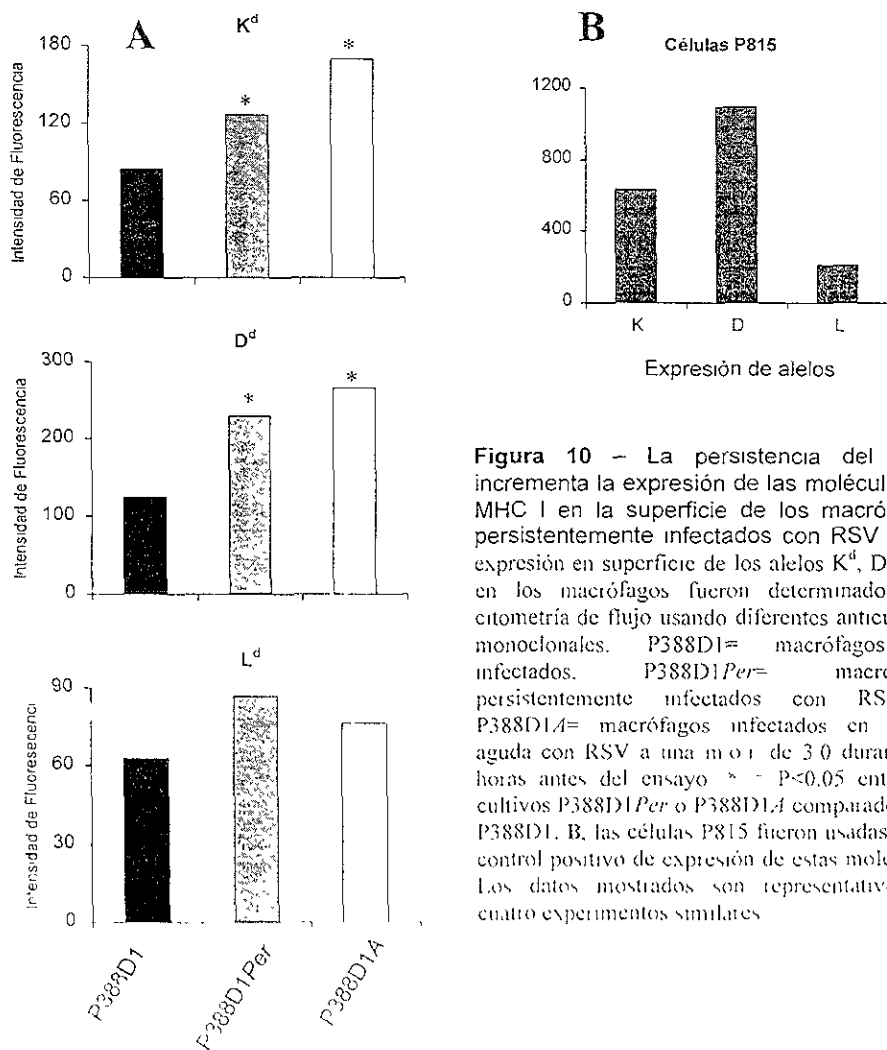
Debido a la importancia del macrófago como célula presentadora de antígeno, se determinó la expresión de las moléculas clase I y II del MHC en la superficie de los macrófagos persistentemente infectados con el RSV (P388D1*Per*) mediante ensayos de citometría de flujo

Con la finalidad de estudiar si la persistencia del RSV en los macrófagos era capaz de inducir la expresión de las moléculas clase II del MHC, se determinó la expresión de estas moléculas en la superficie de los macrófagos persistentemente infectados con RSV. Las moléculas clase II del MHC no se expresaron en las poblaciones de macrófagos analizadas como puede observarse en la *figura 9*. Solo en el histograma correspondiente a las células A20 usadas como control positivo se observa un claro desplazamiento.



**Figura 9** – La persistencia del RSV en los macrófagos no induce la expresión de las moléculas del MHC II. La expresión en superficie de las diferentes poblaciones de macrófagos analizadas fue determinada mediante citometría de flujo usando un anticuerpo mAb anti-I-A<sup>d</sup>. P388D1*Per* = macrófagos persistentemente infectados con RSV. P388D1A = macrófagos infectados en forma aguda con RSV a una m.o.i. de 3.0 durante 24 horas. P388D1 = macrófagos no infectados. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos similares.

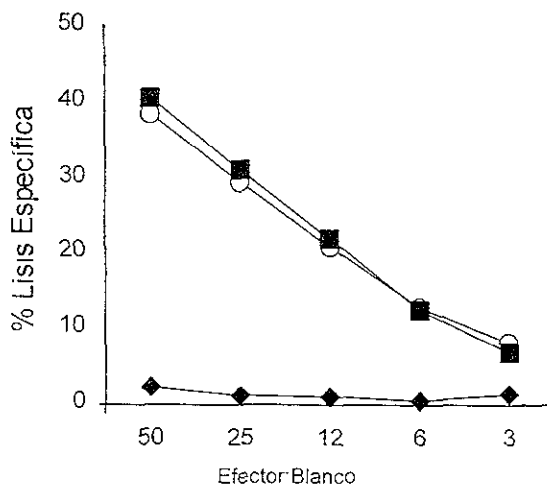
Respecto a la expresión de las moléculas del MHC I, la figura 10 muestra los valores medios de intensidad de fluorescencia obtenidos en las determinaciones de los tres diferentes alelos de MHC I con los cultivos P388D1, P388D1Per y P388D1A. Como puede observarse, la expresión de los alelos K<sup>d</sup> y D<sup>d</sup> en los macrófagos persistentemente infectados fue significativamente mas alta que en los macrófagos no infectados ( $P < 0.05$ ), en cambio la expresión del alelo L<sup>d</sup> prácticamente no cambió. Un comportamiento similar se observó cuando se analizaron las células infectadas en forma aguda en comparación a las células no infectadas. El valor de la intensidad de fluorescencia que se obtuvo cuando las células se tñieron con el anticuerpo usado como control de isotipo fue de aproximadamente 15. Las células P815 fueron usadas como control positivo de expresión de estas moléculas (figura 10). La misma tendencia de incremento se obtuvo cuando se hicieron ensayos preliminares con el cultivo de macrófagos persistentes (MΦP).



**Figura 10** - La persistencia del RSV incrementa la expresión de las moléculas de MHC I en la superficie de los macrófagos persistentemente infectados con RSV. A, la expresión en superficie de los alelos K<sup>d</sup>, D<sup>d</sup> y L<sup>d</sup> en los macrófagos fueron determinados por citometría de flujo usando diferentes anticuerpos monoclonales. P388D1= macrófagos no infectados. P388D1Per= macrófagos persistentemente infectados con RSV y P388D1A= macrófagos infectados en forma aguda con RSV a una m.o.t. de 3.0 durante 24 horas antes del ensayo. \* -  $P < 0.05$  entre los cultivos P388D1Per o P388D1A comparados con P388D1. B, las células P815 fueron usadas como control positivo de expresión de estas moléculas. Los datos mostrados son representativos de cuatro experimentos similares.

## 5.2. El efecto de la persistencia del RSV sobre los macrófagos para presentar antígeno viral a CTLs virus específicas

Para investigar la habilidad de P388D1Per para procesar y presentar antígeno de RSV en moléculas MHC I, se determinó el porcentaje de lisis específica usando CTLs RSV-específicas. Como se muestra en la *figura 11*, las células P388D1Per fueron lisadas por las CTLs RSV-específicas tan efectivamente como las células infectadas en forma aguda con el RSV (P388D1A), sugiriendo que la persistencia del RSV en los macrófagos no alteró la capacidad para presentar y procesar antígenos de RSV a células CTL RSV-específicas.



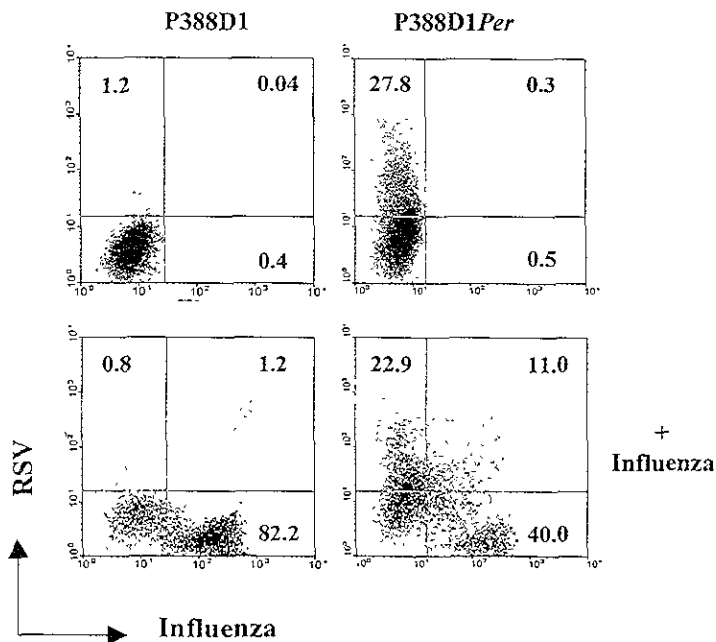
**Figura 11** – Presentación de antígeno de RSV por macrófagos persistentemente infectados con RSV. Las células efectoras de ratones infectados con rVV-M2 lisaron eficientemente a los macrófagos persistentemente infectados con RSV (O), a los macrófagos infectados en forma aguda (■), pero no a las células sin infectar (◆). Los datos son representativos de cuatro experimentos con resultados similares.

## 5.3. Efecto de la persistencia de RSV en macrófagos para presentar antígeno de una infección viral secundaria

Como se deduce de los ensayos anteriores, la capacidad de los P388D1Per para procesar y presentar antígeno de RSV en el contexto del MHC I no se vio alterada. Sin embargo, la habilidad de esta población para presentar antígeno proveniente de una infección viral secundaria podía ser también explotada. Para tal propósito, se consideró primeramente co-infectar a los P388D1Per con el virus de influenza. La presencia del virus de influenza fue detectada mediante una tinción intracelular usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína NP del virus de influenza. Además, se determinó simultáneamente la presencia



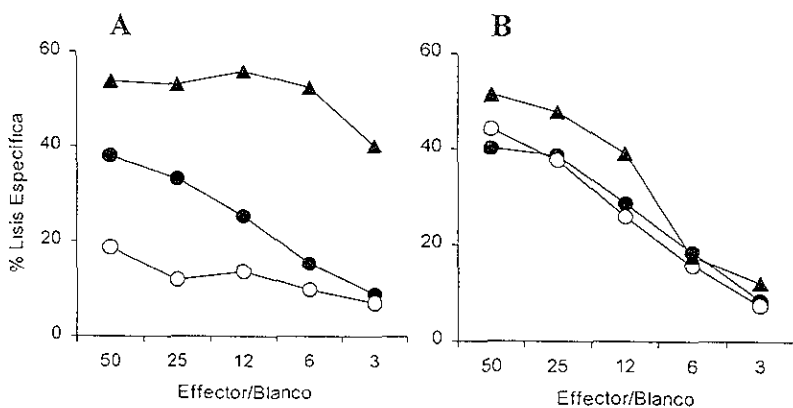
intracelular de antígenos de RSV. La **figura 12** muestra que la población de P388D1Per fue susceptible a la co-infección con el virus de influenza, aunque en menor porcentaje que los P388D1, siendo aproximadamente un 50 % y un 83% respectivamente el porcentaje de células influenza-positivas.



**Figura 12** – La población de macrófagos persistentemente infectados con RSV son susceptibles a la co-infección con el virus de Influenza. P388D1 y P388D1Per fueron infectados o co-infectados con el virus de Influenza A/X31 por 90 minutos en medio libre de suero. Las células fueron fijadas a las 9 horas post-infección, permeabilizadas y sometidas a una doble tinción para detectar antígenos de RSV e Influenza (NP) y analizadas por citometría de flujo. El porcentaje de células es indicado en cada cuadrante. Los datos son representativos de cuatro experimentos similares.

Una vez determinada la susceptibilidad de los macrófagos a la infección por el virus de influenza, se procedió a determinar si la persistencia del RSV comprometía la capacidad del macrófago para procesar y presentar antígeno proveniente de una infección viral secundaria. La estrategia experimental consistió en generar células CTLs influenza (Flu) específicas y usarlas como células efectoras contra células blanco infectadas con el virus de influenza. En la figura 13A se muestra el porcentaje de lisis específica para cada célula blanco. Se observó que

el porcentaje de lisis por CTLs-Influenza específicas al reconocer antígeno de Influenza en P388D1Per fue menor que la observada para los P388D1 infectados con el mismo virus (*figura 13A*). Simultáneamente, se determinó también la capacidad de las células para presentar péptido viral previamente procesado. Para lo anterior, se sensibilizaron las células P388D1, P388D1Per y P815 con un péptido antigénico derivado de la proteína NP de influenza el cual es presentado y reconocido por CTLs Influenza-específicas (*Townsend A et al 1984*). Como se muestra en la *figura 13B*, los tres tipos de células blanco fueron eficientemente lisadas por CTLs-Flu específicas cuando se cargaron con el péptido exógeno de influenza. Estos resultados indican que la habilidad de los macrófagos persistentemente infectados con RSV para presentar antígeno previamente procesado (péptido de influenza) no se vio comprometida. Sin embargo, con respecto a la disminución en el procesamiento de antígenos del virus influenza, se sugiere que el decremento observado se deba a un menor grado de infección o de expresión de proteínas del virus de influenza durante la co-infección.



**Figura 13** – Presentación de antígenos de Influenza por células P388D1 y P388D1Per a células CTLs Flu-específicas. Células T efectoras obtenidas de ratones infectados intranasalmente con virus de influenza cepa A/X31. **A**, Células blanco infectadas 90 minutos con virus de Influenza **B**, Células blanco sensibilizadas toda la noche con el péptido NP de influenza P388D1 (●), P388D1Per (○) y P815 (▲). El % de lisis específica corresponde a la lisis de las células infectadas o sensibilizadas con antígeno de influenza menos el % de lisis de las células sin infectar. Los datos son representativos de cuatro experimentos similares.

# DISCUSIÓN

Entender la respuesta inmune a la infección por RSV es uno de los principales objetivos en el estudio de este virus. Dentro de la respuesta inmune, así como en los mecanismos inmunopatológicos de la infección por el RSV destaca la participación del macrófago. Los macrófagos alveolares contribuyen a la respuesta inmune mediada por células durante la infección por RSV a través de la presentación de antígeno y de la secreción de algunas citocinas tanto en modelos de ratón (*Franke-Ullman G et al 1995*) como de humanos (*Midulla F et al 1989*). La alteración en estas actividades del macrófago contribuyen a los cuadros inflamatorios (*Becker S et al 1991*) y de hiperreactividad bronquial observados en la infección por este virus (*Schwarze J. et al 1999a*). Las frecuentes reinfecciones que caracterizan a la infección con el RSV y a las cuales se atribuye la hiperreactividad bronquial, así como los cuadros de bronquitis crónica y las secuelas de asma desarrolladas después de cuadros de bronquiolitis aguda, son algunas de las evidencias para proponer que la persistencia por RSV se presenta en humanos.

En el presente trabajo se utilizó un modelo de persistencia *in vitro* para investigar si la continua presencia del RSV en estas células altera algunas de sus propiedades biológicas involucradas en la respuesta inmune. Los resultados obtenidos nos permiten discutir su posible participación en los procesos inmunopatológicos en la infección por este virus.

Para confirmar la persistencia del RSV en el cultivo de macrófagos, se determinó la presencia de antígeno viral por inmunoperoxidasa, lo que demostró que aproximadamente un 75 a 80% de la población total de células expresó antígenos del RSV. Con el mismo propósito de confirmar la persistencia pero desde el punto de vista genómico, se amplificó una región del gen que codifica para la proteína N, el cual es un gen altamente conservado no sólo en este virus sino en los pneumovirus en general (*Johnson P et al 1989, Bari J et al 1991*). En todas las pases analizados se encontró la banda de 278 pb correspondiente a la región amplificada. El mecanismo a través del cual el virus logra persistir en este cultivo se desconoce, sin embargo probablemente se trata de un cultivo acateador, en el cual un número de células es infectado por el virus y la producción viral de estas infecta a las células sanas dentro del mismo cultivo (*Ahmed R 1996*) o bien el virus probablemente permanezca en el citoplasma (donde lleva a cabo su ciclo replicativo) y durante las divisiones celulares, los viriones sean pasados a las células hijas. Aunque no se descarta que la manera en la que la persistencia del RSV se mantiene en el cultivo de macrófagos pudiera ser una mezcla de los dos mecanismos mencionados.

Una vez confirmada la presencia del RSV en los macrófagos, se estudió el efecto de la persistencia sobre algunas de las actividades de estas células. Al analizar la actividad fagocítica mediada por receptores *Fcγ* o específica, observamos un incremento significativo en las células del cultivo persistente el cual resultó hasta en un 460 % más alto con respecto a las células sin infectar. El incremento observado sugirió que el efecto podría estar influenciado por una sobre-expresión de los receptores *Fcγ* en las células infectadas persistentemente con RSV, lo cual se estudio al determinar la expresión de los *FcγRII/RIII* en la superficie de los macrófagos MΦP. Los resultados demuestran un incremento que varió entre un 71 % y un 171 % según el pase del

cultivo MΦP analizado. Los porcentajes de incremento entre la actividad fagocítica y la expresión de receptores no coinciden, lo que sugiere que la sobre-expresión de receptores contribuye al aumento de la actividad fagocítica pero que pudiera no ser el único factor involucrado. Sin embargo, cabe señalar que en este trabajo, las determinaciones de la actividad fagocítica y expresión de receptores no fueron realizados en forma simultánea por lo que tampoco se descarta que la discrepancia esté dada por ser diferentes experimentos.

Nuestros resultados coinciden con los reportados con Olchowy T. y colaboradores donde utilizando macrófagos alveolares de terneras infectadas con RSV bovino (BRSV, estrechamente relacionado al RSV humano) determinaron la actividad fagocítica, utilizando eritrocitos de carnero opsonizados con IgG específica y marcados con  $^{51}\text{Cr}$ . Los resultados reportados por los autores son muy variables, sin embargo el incremento que ellos observan es significativo y fluctuó entre un 67 % y un 830 %. Sugieren que este incremento también esté relacionado con el aumento en la actividad de unión de los receptores Fc, el cual varió entre un 51% y un 76 %, lo cual similarmente a nuestros datos no coincide con el alto porcentaje de incremento observado en la fagocitosis (Olchowy T et al 1994).

Dentro de la respuesta inmune inflamatoria inducida por la infección por RSV, destaca el papel tanto del TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ . Se ha sugerido que el TNF- $\alpha$  puede tener un papel durante la infección por RSV, ya sea limitando la infección por el virus o mediante la modulación de la respuesta inflamatoria al RSV en el pulmón. En el presente trabajo, esta proteína se determinó por su actividad citotóxica sobre células L929 y la posibilidad de que el efecto citopático del RSV presente en los sobrenadantes del cultivo persistente interfiriera en el ensayo, se descartó al exponer las células L929 a altas concentraciones de virus ( $10^6$  TCID $_{50}$ /ml) inactivado y no inactivado con luz U.V. Los resultados obtenidos demostraron que el RSV *per se* no tiene efecto citotóxico sobre la línea celular L929, por lo tanto consideramos que la citotoxicidad observada se debió exclusivamente al efecto del TNF- $\alpha$  sobre los fibroblastos. Nuestros resultados demuestran que la persistencia del RSV originó una disminución de la actividad citotóxica del TNF- $\alpha$  encontrada en los sobrenadantes del cultivo. El porcentaje de disminución varió entre un 68 % y un 250 % en los datos reportados. Estos resultados difieren de los obtenidos en modelos de infección aguda con RSV, donde se observa un incremento en la actividad citotóxica de esta proteína después de infectar macrófagos alveolares con el virus. (Becker S et al 1991, Franke G et al 1994, Franke G et al 1995). Nuestros resultados pudieran analizarse dentro del contexto de estudios *in vitro* donde ha demostrado que la incubación de células mononucleares de sangre periférica con la proteína G del RSV, suprime la actividad del TNF- $\alpha$  (Kong B et al 1996). Este hecho pudiera atribuírsele a la unión directa del TNF- $\alpha$  con la proteína G interfiriendo así con las funciones apoptóticas y antivirales del TNF- $\alpha$ . Esta interpretación se basa en que existe una homología entre un subdominio del receptor de 55kDa para el TNF (TNF $\beta$ ) con una región de la proteína G (Langdijk I et al 1998) y en que este subdominio del receptor es importante para la unión del TNF ya que se ha demostrado que el uso de anticuerpos anti-subdominio bloquea la muerte celular por TNF- $\alpha$  (Hwang C et al 1991). Cabe mencionar que el mecanismo de interferencia de la actividad del TNF- $\alpha$  por proteínas virales homólogas al receptor de esta citoquina ha sido reportado para otros virus (Smith C et al 1991, Shechelkumov S et al 1993, Smith C et al 1996). La relevancia de nuestros resultados pudiera estar apoyada por los estudios hechos en ratones infectados con RSV, los cuales señalan que el bloqueo del TNF- $\alpha$  mediante anticuerpos específicos, origina una exacerbación durante el curso de la enfermedad inducida por el virus.

resultando en una mayor pérdida de peso y una recuperación más lenta (Neuzil K et al. 1996), de tal manera que una disminución de esta citocina podría contribuir a la inmunopatología del RSV.

La producción de la IL-6 e IL-1 $\beta$  en nuestro modelo de persistencia se vio incrementada. Los resultados obtenidos en este estudio indican que la persistencia del RSV en los macrófagos induce un aumento en la producción IL-1 $\beta$  el cual varió entre un 30 % y un 100 % y de un 87 % a un 137 % para la IL-6. De acuerdo a estos datos, se podría especular que esta continua producción de citocinas durante la infección persistente por RSV, podría estar relacionada con los cuadros inflamatorios crónicos presentes en pacientes infectados con el virus. Cabe señalar que nuestros resultados coinciden con los obtenidos en infección aguda en macrófagos alveolares (Becker S et al 1991, Panuska J et al 1992, Franke G et al 1995) y en monocitos de sangre periférica (Roberts N Et al 1986). Aunque los niveles de incremento varían según el modelo utilizado para el estudio de estas citocinas. Nuestros datos podrían relacionarse

Debido a la pérdida del cultivo persistente (M $\Phi$ P) utilizado en los experimentos anteriores, las determinaciones posteriores se llevaron a cabo con un nuevo cultivo (P388D1Per), el cual fue establecido de acuerdo a las condiciones reportadas previamente (Sarmiento R. et al 2001). Sin embargo, en esta ocasión se utilizó la línea celular proveniente directamente de la Colección europea de cultivos celulares animales (ECACC), donde la población celular en suspensión fue de aproximadamente un 40 %, esta característica se había perdido a través de los pasajes en el cultivo anterior. En la línea celular P388D1 del cultivo anterior aproximadamente un 65 % de la población celular se encontró en suspensión. Esto es importante señalarlo porque al establecer la persistencia del virus en el cultivo P388D1Per, observamos un porcentaje menor de células infectadas (29-40%) comparado con el cultivo anterior M $\Phi$ P (75-80%), lo cual podría deberse a la presencia de las células no adherentes o menos diferenciadas, las cuales son menos susceptibles a la infección por RSV (Mudulla F et al 1989, Gimenez H 1989). La persistencia del RSV en este cultivo fue confirmada mediante la expresión de antígeno y producción de virus extracelular. La cantidad de virus producido, así como la intensidad de antígeno expresado en las células infectadas de P388D1Per fue similar a lo observado en M $\Phi$ P, lo que además de confirmar la capacidad del virus para permanecer en el cultivo de macrófagos, también demuestra que el modelo de persistencia utilizado es reproducible.

Otra de las actividades del macrófago considerada en este trabajo fue el estudio del procesamiento y presentación de antígeno a través de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad. Respecto al estudio de la expresión de moléculas clase I, los datos obtenidos demostraron que la infección persistente del RSV en el cultivo de macrófagos incrementó la expresión de los alelos K y D de las moléculas clase I del MHC, pero no alteró significativamente la expresión del alelo L. Resultados similares se reportan por Garofalo R. y cols. utilizando células epiteliales de origen humano (A549) infectadas en forma aguda (48 h) con el RSV. Los autores atribuyen ese incremento a la acción autócrina del IFN- $\beta$  e IL-1 $\alpha$  liberados por las células infectadas con el virus (Garofalo R et al 1996). Durante el estudio del efecto de la infección persistente del RSV sobre la expresión de las moléculas MHC II, se observó que la persistencia del RSV no indujo su expresión en superficie. Sin embargo no se descarta que el RSV no promueva su expresión, ya otros reportes demuestran que la infección por RSV en macrófagos alveolares puede inducir la expresión de las moléculas MHC II (Panuska J et al 1992) y la expresión de algunas otras proteínas involucradas en el procesamiento de antígeno como

PAPI/LMP2/LMP7 en células epiteliales, cuyos genes se encuentran dentro de la región que codifica para las moléculas MHC II (Jamaluddin M. et al 2001). Probablemente para determinar la inducción de estas moléculas por efecto del RSV en el modelo de persistencia sería necesario determinar su expresión con técnicas más sensibles como un northern blot o un PCR cuantitativo.

Tras la determinación de las moléculas clase I del MHC en los macrófagos, se analizó la capacidad de las células persistentemente infectadas con RSV para presentar antígeno viral. Primeramente se estudió la capacidad de los macrófagos para procesar y presentar antígeno de RSV a células CTL RSV-específicas. Los resultados demostraron que la persistencia del RSV no altera el procesamiento ni presentación de antígeno proveniente del virus persistente. El constante procesamiento y presentación de antígeno sugeridos por nuestros resultados permite especular sobre su asociación con los mecanismos inmunopatológicos originados por la infección de RSV: por una parte, una excesiva respuesta de células T citotóxicas contribuiría a la patología del pulmón al ocasionar un mayor daño tisular (Cannon M et al 1988, Graham B et al 1991). Por otro parte, datos recientes obtenidos en un modelo de infección primaria en ratón, sugieren que la persistencia del RSV o de antígeno del virus podría estar involucrada en la persistencia de células T CD8<sup>+</sup> de memoria en el tejido alveolar del pulmón y que estas células T CD8<sup>+</sup> pierden su actividad citotóxica después de prolongados tiempos de infección (Ostler T et al 2001). Lo anterior podría asociarse a los procesos inflamatorios crónicos y de hiperrespuesta en las vías respiratorias ocasionados por la infección por RSV, ya que se propone que las células T CD8<sup>+</sup> no citotóxicas productoras de IL-5 (Schwarze J et al 1999a) contribuyen al reclutamiento de eosinófilos dando como consecuencia los cuadros de inflamación mencionados (Hamelmann E et al 1996, Schwarze J et al 1999b).

Dentro del efecto de la persistencia del RSV sobre el procesamiento y presentación de antígeno viral, se contempló también investigar si la persistencia por RSV interfería con la presentación de antígenos derivados de otro virus. Para determinar lo anterior, las células del cultivo persistente se co-infectaron con el virus de influenza ó se pulsaron con un péptido de la proteína NP (NP<sub>147-155</sub>) del virus, el cual se ha reportado como el péptido inmunodominante del virus de influenza (Townsend A et al 1984). Las células fueron co-cultivadas con células CTLs influenza-específicas. Nuestros resultados demuestran que la presentación de antígeno NP<sub>147-155</sub> (péptido previamente procesado) no se vio alterada en las células persistentemente infectadas con el RSV. Sin embargo, al analizar la capacidad de los macrófagos RSV-persistentes para procesar y presentar antígeno proveniente de la infección del virus de influenza, se observó una disminución de aproximadamente un 50 % en la lisis específica de las células co-infectadas con ambos virus. Esta disminución en el procesamiento y presentación de antígeno podría estar relacionada con la disminución observada en la expresión de las proteínas del virus de influenza en los macrófagos RSV-persistentes, la cual fue también de un 50 % aproximadamente. La expresión de las proteínas de influenza en las células persistentemente infectadas con el RSV fue monitoreada mediante detección de la proteína NP, la cual contiene el péptido inmunodominante que reconocen las células CTL influenza-específicas. El mecanismo responsable de esta disminución en la síntesis de proteínas se desconoce pero es probable que el efecto pueda deberse a una competencia a nivel de la síntesis de proteínas entre ambos virus como se reporta en otros trabajos (Shimoh M et al 2000) o bien al efecto del IFN tipo I el cual puede ejercer su actividad antiviral al inducir la expresión de las proteínas Mx, ya que se sabe que en el modelo murino es la proteína Mx1 producida en núcleo, la que inhibe o bloquea la síntesis del RNAm del virus de influenza (Hornberg M 1995).

En resumen, nuestros resultados sugieren que la persistencia de RSV podría relacionarse con los cuadros de bronquitis crónica, donde pudieran estar contribuyendo la IL-1 e IL-6. A su vez, la disminución del TNF- $\alpha$  podría contribuir a la exacerbación de los cuadros de la enfermedad. Por otro lado, la constante presentación de antígeno de RSV a células T CD8+ específicas podría contribuir tanto al daño histológico en el pulmón de organismos infectados con el RSV como a las secuelas de asma observadas en pacientes infectados con RSV en edades tempranas (Nicholson K *et al* 1993)

Dentro de las perspectivas de este trabajo, se contempla el estudio del efecto de la persistencia sobre la síntesis de algunas quimiocinas inflamatorias incluyendo la MIP-1 $\alpha$ , la cual se ha relacionado recientemente con cuadros severos de bronquiolitis (Garofalo R *et al* 2001) y patología en el pulmón (Haeberte H *et al* 2001) después de la infección por RSV. Otro aspecto considerado, es el estudio de las alteraciones en la actividad microbicida por efecto de la persistencia del virus ya que existe una estrecha asociación entre la infección por RSV e infecciones bacterianas secundarias (Takala A. *et al* 1993) y además se ha demostrado que una infección aguda por RSV en macrófagos modula su actividad bactericida (Raza N. *et al*. 2000).

Cabe señalar que a pesar de las limitaciones de nuestro modelo experimental por tratarse del estudio de una sola estirpe celular, los resultados resultan muy interesantes no solo por ser los primeros en relacionar los efectos de la persistencia del RSV con la respuesta inmune, sino porque dan la pauta para considerar la respuesta inmune *in vivo* en un modelo de persistencia podría ser diferente que en una infección aguda. Además, sugieren que los efectos de la persistencia por este virus podrían ser los responsables de algunos cuadros inmunopatológicos observados en individuos infectados por el RSV. Dentro de este contexto, se considera como otra perspectiva de este trabajo, estudiar la respuesta inmune contra el RSV en un modelo de persistencia *in vivo* usando el modelo de ratón, lo que ayudaría a entender de una manera mas cercana la respuesta inmune e inmunopatológica al RSV en humanos.

## CONCLUSIONES

La persistencia del RSV alteró algunas de las funciones del macrófago determinadas en este trabajo como: la actividad fagocítica, la expresión de receptores Fc $\gamma$ , la producción de IL- $\beta$  e IL-6, la actividad citotóxica del TNF- $\alpha$  y la expresión de moléculas del MHC clase I. Sin embargo, se demostró que la persistencia del RSV no tuvo efecto sobre la presentación de antígeno en el contexto de moléculas clase I del MHC.

Por lo tanto, los datos obtenidos en este trabajo sugieren que en una infección persistente *in vivo*, los macrófagos pudieran estar contribuyendo a la patología observada en humanos.



# APÉNDICE

## PREPARACION DE SOLUCIONES

### AGUA-DEPC

DEPC	0.1 ml
Agua destilada c.b.p.	100 ml

Mezclar vigorosamente. Dejar incubando toda la noche a 37°C. Esterilizar por autoclave.

### SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS)

Cloruro de sodio	8.0 gr
Cloruro de potasio	0.2 gr
Fosfato dibásico de sodio	0.96 gr
Fosfato monobásico de potasio	0.2 gr
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Se ajusta el pH a 7.4. Esterilizar por autoclave.

### PBS (IL-6)

Cloruro de sodio	8.0 gr
Fosfato de sodio	1.16 gr
Fosfato de potasio	0.2 gr
Cloruro de potasio	0.2 gr
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Se ajusta el pH a 7.0 y se esteriliza por autoclave.

### SOLUCION AMORTIGUADORA PARA ELISA DE CAPTURA (IL-6)

Bicarbonato de sodio	0.1M
----------------------	------

Ajustar el pH 8.2

### VERSENO

Cloruro de sodio	8.0 gr
Cloruro de calcio	0.4 gr
EDTA	0.2 gr
Tris-base	3.04 gr
Agua destilada c b p	1000 ml

Esterilizar por autoclave. Agregar 0.1% de tripsina y esterilizar por filtración (0.22µ). Guardar en alícuotas a -20°C

### SOLUCIÓN DE ALSEVERS

Dextrosa	20.5 gr
Cloruro de sodio	1.2 gr
Citrato de sodio	8.0 gr
Ácido cítrico	0.5 gr

Agua destilada c.b.p. 1000 ml  
Ajustar el pH a 6.2. Esterilizar por filtración (0.22 $\mu$ ). Guardar a 4°C.

#### **SOLUCION AMORTIGUADORA DEXTROSA-GELATINA-VERONAL (DGVB<sup>2+</sup>)**

Gelatina	0.25 gr
Barbital	0.23 gr
Dextrosa	12.5 gr
Cloruro de sodio	2.1 gr
Cloruro de calcio 1M	75 $\mu$ l
Cloruro de magnesio 1M	250 $\mu$ l
Agua desionizada c.b.p.	500 ml

El barbital (veronal) y la gelatina son disueltos en 250 ml de agua calentando, y después son mezclados con los otros reactivos. Ajustar el pH 7.3. Esterilizar en autoclave. Guardar a 4°C.

#### **SOLUCION AMORTIGUADORA DE BORATOS (BBS)**

Acido bórico (0.2M)	6.18 gr
Cloruro de sodio (0.15M)	4.38 gr
Agua desionizada c.b.p.	500 ml

Ajustar el pH a 8.5. Esterilizar por autoclave.

#### **MEDIO RPMI**

Medio RPMI 1640

Hepes	2.2 gr
Bicarbonato de sodio	2.2 gr
L-Mercaptoetanol	1x10 <sup>-6</sup> M
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Ajustar el pH a 7.4. Esterilizar por filtración (0.22 $\mu$ ). Guardar a 4°C.

#### **MEDIO RPMI/10**

RPMI, suplementado con 10% de suero fetal bovino (*Gibco*) inactivado (56°C/30 min.), L-glutamina (2mM) y antibióticos (Sulfato de estreptomina 100 $\mu$ g/ml, Penicilina G 100 UI/ml).

#### **MEDIO MEM**

Medio MEM

Hepes	2.2 gr
Bicarbonato de sodio	2.2 gr
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Ajustar el pH a 7.4. Esterilizar por filtración (0.22 $\mu$ ). Guardar a 4°C.

#### **MEDIO MEM/10**

MEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino (*Bioexport*) inactivado (56°C/30 min.), antimicóticos (Nistatina 0.1mg/ml) y antibióticos (Sulfato de estreptomina 100 $\mu$ g/ml, Penicilina G 100 UI/ml)

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A., Litchman A. and Pober J. (1995). Citocinas. En: *Inmunología Celular y Molecular*. Cap. 12. Sección III. 2<sup>da</sup>. Edición, editado por McGraw-Hill. pp. 271-292.
- Ahmed R., Morrison L. and Knipe D. (1996). Persistence of viruses. In: *Fundamental Virology*. 3<sup>rd</sup> Edition, edited by Fields B.N., Knipe D.M. and Howley P.M., et al. Raven publishers, Philadelphia. pp. 207-237
- Alwan W., Record F. and Openshaw P.J.M. (1992). CD4<sup>+</sup>T cells clear virus but augment disease in mice infected with Respiratory Syncytial virus. Comparison with the effects of CD8<sup>+</sup>T cells. *Clin. Exp. Immunol.* **88**:527-536.
- Alwan W., Kozłowska and Openshaw P. (1994). Distinct types of lung disease caused by functional subsets of antiviral T cells. *J. Exp. Med.* **179**:81-89.
- Ananaba G. and Anderson J. (1991). Antibody enhancement of Respiratory Syncytial virus stimulation of leukotriene production by a macrophagelike cell line. *J. Virol.* **65**:5052-5060.
- Anderson M., Päävo S., Nilsson T. and Peterson P. (1985). Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenoviruses to evade immune surveillance. *Cell.* **43**:215-222.
- Anderson J., Serin M., Harrop M., Amin S., Toms G. and Scott R. (1989). Natural killer cell response to Respiratory Syncytial virus in the BALB/c mouse model. *Adv. Exp. Med Biol.* **257** 211-220.
- Arnold R., König B., Galatti H., Werchav H and König W. (1995). Cytokine (IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$ ) and soluble TNF receptor I release from human peripheral blood mononuclear cells after Respiratory Syncytial virus infection. *Immunology.* **85**:364-372.
- Auger M. and Ross J. (1992). The biology of the macrophage. In: *The Natural Immune System. The macrophage*. Chapter 1. Edited by Lewis C et al. Oxford. IRL Press. pp 1-74
- Bacz M., Palese P. and Kilburne E. (1980) Gene composition of high-yielding influenza vaccine strains obtained by recombination. *J. Infect. Dis.* **141**:362-365.
- Baldridge P. and Senterfit L. (1976). Persistent infection of cells in culture by Respiratory Syncytial virus (39286) *Proc. Sci. Exp. Biol. Med.* **151**:684-688.
- Bangham Ch. and McMichael A. (1986a). Specific human cytotoxic T cells recognize B-cell lines persistently infected with Respiratory Syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**.9183-9187.
- Bangham Ch., Openshaw P., Ball A., King A., Wertz G. and Askonas B. (1986b). Human and murine cytotoxic T cells specific to Respiratory Syncytial virus recognize the viral nucleoprotein (N), but not the major glycoprotein (G), expressed by vaccinia virus recombinants. *J. Immunol.* **137** 3973-3977
- Barik S (1992) Transcription of human Respiratory Syncytial virus genome RNA in vitro. requirement of cellular factor(s) *J. Virol.* **66** 6813-6818.
- Barr J., Chambers P., Pringle C and Easton A (1991) Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumovirus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses. *J. Gen. Virol.* **72** 677-685

- Becker S, Quay J. and Soukup J. (1991). Cytokine (Tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by Respiratory Syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *J Immunol.* **147**:4307-4312.
- Bermingham A and Collins P. (1999). The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl. Acad Sci* **96**:11259-11264.
- Boeck K. (1996). Respiratory syncytial virus bronchiolitis: clinical aspects and epidemiology. *Monaldi Arch Chest Dis* **51** 210-213
- Bolt G., Pedersen L. and Birkeslund H. (2000). Cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is required for its surface expression: role of furin. *Virus Research.* **68**:25-33.
- Bont L., Heijnen C., Kavelaars, van Aalderen W., Brus F., Draaisma J., Geelen S., van Vught H and Kimpen J. (1999). Peripheral blood cytokine responses and disease severity in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Eur. Resp J.* **14**:144-149.
- Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* **72**:248-254.
- Cane P. and Pringle C. (1991). Respiratory syncytial virus heterogeneity during an epidemic: analysis by limited nucleoside sequencing (SH gene) and restriction mapping (N gene). *J. Gen. Virol.* **72**:349-357
- Cannon M., Openshaw P and Askonas B. (1988). Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus. *J Exp. Med.* **168**:1163-1168.
- Cirino N., Panuska J, Villani A, Taraf H, Rebert N., Merolla R., Tsivitse P. and Gilbert I. (1993) Restricted replication of Respiratory Syncytial virus in human alveolar macrophages. *J Gen Virol* **74**:1527-1537.
- Collins P, Huang T. and Wertz G (1984) Identification of a tenth mRNA of Respiratory Syncytial virus and assignments of polypeptides to the 10 viral genes. *J Virol.* **49**:572-578
- Collins P., McIntosh K. and Chanock R. (1996). Respiratory Syncytial virus. In: *Fields Virology* 3<sup>rd</sup> Edition, edited by Fields B, Knipe D., Howley, et al. Raven. Publishers, Philadelphia. pp 1313-1351.
- Currents Protocols in Immunology (1991). Measurement of tumor necrosis factor  $\alpha$  and  $\beta$ . Vol 1 Unit 6 10. pp. 6 10 1-6 10 5
- Cresswell P and Lanzavecchia A. (2001) Antigen processing and recognition *Curr Opin Immunol.* **13**:11-12.
- Cuesta I., Geng X., Asenjo A and Villanueva N (2000) Structural phosphoprotein M2-1 of the human respiratory syncytial virus is an RNA binding protein. *J Virol* **74**:9858-9867.
- Chomczynski P and Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction *Analytical Biochemistry* **162**:156-159
- Dakhama A., Vitalis T and Hegele R. (1997). Persistence of Respiratory Syncytial virus (RSV) infection and development of RSV-specific IgG1 response in a guinea-pig model of acute bronchiolitis *Eur Respir J.* **10** 20-26
- Dawson K and Nogrudge N (1989) Acute bronchiolitis three year study *N Z Med J* **102** 528-529

- Dickens L., Collins P. and Wertz G. (1984) Transcriptional mapping of human Respiratory Syncytial virus. *J. Virol.* **52**:364-369
- Dinareello Ch. (1989). Interleukin-1 and its biologically related cytokines *Adv Immunol.* **44**:153-205.
- Dinareello Ch. (1994). The Biological properties of interleukin-1. *Eur. Cytokine Netw.* **5**:517-531.
- Englund J. (1994). Passive protection against Respiratory Syncytial virus disease in infants: the role of maternal antibody. *Pediatr Infect. Dis J* **13** 449-453.
- Falsey A. and Walsh E. (1992). Humoral immunity to Respiratory Syncytial virus infection in the elderly. *J. Med. Virol.* **36**:39-43.
- Fearn R. and Collins P. (1999). Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J. Virol.* **73**:5852-5864.
- Feldman S., Audet S. and Beeler J. (2000) The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate. *J. Virol.* **74**: 6442-6447.
- Fernie B. and Gerin J. (1982). The stabilization and purification of Respiratory Syncytial virus using MgSO<sub>4</sub>. *Virology.* **106**:141-144.
- Frank M. et al. (1999). The humoral immune response In: *Immunobiology. The immune system in health and disease*. Chapter 9. Edited by Janeway Ch., Travers P., Walport M. and Capra J. Current Biology Publications and Garland Publishing. New York and London. pp. 307-361.
- Franke G., Freihorst J., Steinmüller C., Verhagen W., Hockertz S. and Lohmann-Matthes M. (1994). Interaction of alveolar macrophages and Respiratory Syncytial virus. *J Immunol. Methods.* **174**:173-184.
- Franke-Ullman G., Pfortner C., Walter P., Steinmüller C., Lohmann-Matthes M., Kobzik L. and Freihorst J. (1995). Alteration of pulmonary macrophage function by Respiratory Syncytial virus infection in vitro. *J Immunol.* **154**:268-280.
- Fru K. and Yang Y. (1999). Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon  $\alpha$ . *Curr Op. Immunol* **11**:76-81.
- Garofalo R., Mei F., Espejo R., Ye G., Haeblerle H., Baron S., Ogra P. and Reyes V. (1996). Respiratory Syncytial virus infection of human respiratory epithelial cells up-regulates class I MHC expression through the induction of INF- $\alpha$  and IL-1 $\alpha$ . *J Immunol.* **157**:2506-2513.
- Garofalo R., Patti J., Hintz K., Hill V., Ogra P. and Welliver R. (2001). Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (not T helper type 2 cytokines) is associated with severe forms of respiratory syncytial bronchiolitis. *J Infect Dis* **184**,393-399.
- Gendelman H. and Morahan P. (1992). Macrophages in viral infections. In: *The Natural Immune System The macrophage* Chapter 5 Edited by Lewis C. et al IRL Press Oxford. pp 157-213.
- Germain R. (1999) Antigen Processing and Presentation Chap. 9 In: *Fundamental Immunology* Fourth edition, edited by William Paul Pub By Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia pp. 287-340.
- Gimenez H., Keir H. and Cash P. (1989) In vitro enhancement of respiratory syncytial virus infection of U937 cells by human sera. *J Gen Virol* **70** 89-96.

- Graham B., Bunton L., Wright P. and Karzon D. (1991) Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with Respiratory Syncytial virus in mice. *J Clin Invest* **88**:1026-1033.
- Greenberg S. and Silverstein S. (1993). Phagocytosis. In: *Fundamental Immunology*. 3<sup>rd</sup> edition. Edited by Paul W. Raven Press. New York. pp. 941-964.
- Haeblerle H., Kuziel W., Dieterich H., Casola A., Gatalica Z. and Garofalo R. (2001). Inducible expression of inflammatory chemokines in respiratory syncytial virus-infected mice. role of MIP-1 $\alpha$  in lung pathology *J Virol*. **75** 878-890.
- Hamelmann E., Oshiba A., Paluh J., Bradley K., Loader J., Potter T., Larsen G. and Gelfand E. (1996). Requirement for CD8<sup>+</sup> T cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. *J Exp. Med.* **183**:1719-1729.
- Haywood A. (1986). Patterns of persistent viral infections. *N. E J of Med.* **315**:939-948.
- Hegele R., Hayashi S., Bramley A. and Hogg J. (1994). Persistence of Respiratory Syncytial virus genome and protein after acute bronchiolitis in guinea pigs. *Chest*. **105**:1848-1854.
- Heminway B., Yu Y., Tanaka Y., Perrine G., Gustafson E., Bernstein J. and Galinski. (1994). Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion. *Virology*. **200**:801-805.
- Hirano T. (1992). Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease. *Clin Immunol. Immunopathol.* **62**:S60-S65.
- Horisberger M. (1995). Interferons, Mx genes, and resistance to influenza virus *Am. J Resp. Crit. Care Med* **152**:S67-S71.
- Huang Y. and Wertz G. (1982) The genome of Respiratory Syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species. *J Virol* **43**:150-157
- Huang Y. and Wertz G (1983) Respiratory Syncytial virus mRNA coding assignments. *J Virol*. **46**:667-672
- Hunninghake G. Fick R. and Nugent K. (1985) Pulmonary host defenses: cellular factors. In *Advances in host defense mechanism* Vol. 4. Edited by Gallin J et al. Raven press New York pp. 89-113
- Hussell T., Spencer L., Georgiou A., O'Garra A. and Openshaw P. (1996). Th1 and Th2 cytokine induction in pulmonary T cells during infection with Respiratory Syncytial virus. *J Gen Virol*. **77**:2447-2455
- Hussell T., Pennycook A. and Openshaw P. (2001). Inhibition of tumor necrosis factor reduces the severity of virus-specific lung immunopathology. *Eur J Immunol*. **31** 2566-2573.
- Hwang C., Gatanaga M., Innins F., Yamamoto R., Granger G. and Gatanaga T (1991). A 20 amino acid synthetic peptide of a region from the 55 kDa human TNF receptor inhibits cytotoxic and binding activities of recombinant human tumor necrosis factor in vitro. *Proc R Soc Lond* **245** 115-119
- Jamaluddin M., Wang S., Garofalo R., Elliott T., Casola A., Baron S. and Brasier A. (2001). IFN- $\alpha$  mediates coordinate expression of antigen-processing genes in RSV-infected pulmonary epithelial cells *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**:1248-1257.
- Jeffcoate I. (1969) Vaccine against Respiratory Syncytial virus. *The Lancet* **2**:311
- Johnson P. and Collins P. (1989) The 1B (NS2), 1C (NS1) and N proteins of human Respiratory Syncytial virus (RSV) of antigenic subgroups A and B: sequence conservation and divergence within RSV genomic RNA. *J Gen Virol* **70** 1539-1547

- Kapikian A., Mitchell R., Chanock R., Shvedoff R. and Stewart C. (1969). An epidemiologic study of altered clinical reactivity to Respiratory Syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine *Am. J. Epidemiol.* **89**:405-421.
- Kim H., Canchola J., Brandt C., Pyles G., Chanock R., Jensen K. and Parrott R (1969). Respiratory Syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am. J. Epidemiol.* **89**:422-434.
- Kimpen J., Rich G., Mohar C. and Ogra P. (1992). Mucosal T cell distribution during infection with Respiratory Syncytial virus. *J. Med. Virol.* **36**:172-179.
- König B., Streckert J., Krusat T. And König W. (1996). Respiratory syncytial virus G-protein modulates cytokine release from human peripheral blood mononuclear cells *J Leukoc Biol.* **59**:403-406.
- Krivitskaia V and Iakovleva N. (1992). Specificity of humoral response to Respiratory Syncytial virus infection in adults with different forms of bronchitis *Vopr. Virusol* **37**:146-149.
- Krivitskaia V., Iakovleva N. and Aleksandrova. (1996). Characteristics of anti-Respiratory Syncytial humoral immunity during persistence of respiratory syncytial virus antigens in adult patients with chronic obstructive bronchitis *Vopr. Virusol.* **41**:234-237.
- Kulkarni A., Connors M., Firestone C., Morse III H. and Murphy B. (1993a). The cytolytic activity of pulmonary CD8+ lymphocytes, induced by infection with vaccinia virus recombinant expressing the M2 protein of respiratory syncytial virus (RSV), correlates with resistance to RSV infection in mice. *J Virol.* **67**:1044-1049.
- Kulkarni A., Morse III H., Bennink J., Yewdell J and Murphy B. (1993b) Immunization of mice with vaccinia virus-M2 recombinant induces epitope-specific and cross-reactive Kd-restricted CD8+ cytotoxic T cells. *J Virol* **67**: 4086-4082.
- Kulkarni A., Collins P, Igor B., Yewdell J., Bennink J., Crowe Jr J. and Murphy B. (1995) Cytotoxic T cells specific for a single peptide on the M2 protein of respiratory syncytial virus are the sole mediators of resistance induced by immunization with M2 encoded by a recombinant vaccinia virus. *J. Virol.* **69**: 1261-1264
- Kurt-Jones E., Popova L., Kwinn L., Haynes L, Jones L., Trip R., Walsh E, Freeman M., Golenblock D., Anderson L, and Finberg R. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus *Nature Immunol.* **1**:398-401.
- Lamb R and Kolakofsky D. (2001) Paramixoviridae: The viruses and their replication. In *Fundamental Virology*. 4th Edition, edited by Fields B.N. and Hawley P. Lippincott W. & Wilkins Publishers. Philadelphia. pp. 689-724
- Lambert D., Pons M., Mbuy G. and Dorseer K (1980). Nucleic Acids of Respiratory Syncytial virus. *J Virol.* **36**:837-846
- Langedijk J, Groot B., Berendsen H and Oirschot J. (1998) Structural homology of the central region of the attachment protein G of respiratory syncytial virus with the fourth subdomain of 55-kDa tumor necrosis factor receptor. *Virology* **243** 293-302
- Laskin D., Weinberger B. and Laskin J. (2001) Functional heterogeneity in liver and lung macrophages. *J Leuko Biol* **70** 163-170
- Lukaes N., Strieter R., Chensue S., Widmer M. and Kunkel S (1995) TNF-alpha mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. *J Immunol* **154**:5411-5417

- Lukacs N., Tekkanat K., Berlin A., Hogaboam C., Miller A., Evanoff H., Lincoln P. and Massab H. (2001). Respiratory syncytial virus predisposes mice to augmented allergic airway responses via IL-13 mediated mechanisms. *J Immunol.* **167**:1060-1065.
- Margulies D. (1999). The Major histocompatibility complex. Chap. 8. In: *Fundamental Immunology*. Fourth edition, edited by William Paul. Pub. By Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia. pp. 263-285.
- Martín A., Carrillo E., Sevilla N. and Domingo E. (1994). Rapid cell variation can determine the establishment of a persistent viral infection. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **91**:3705-3709.
- Martínez I. and Melero J. (2000). Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implications of sulfated cell surface proteoglycans. *J. Gen. Virol.* **81**. 2715-2722.
- Matsuda K., Tsutsumi H., Okamoto Y. and Chiba C. (1995). Development of interleukin 6 and necrosis factor alpha activity in nasopharyngeal secretions of infants and children during infection with respiratory syncytial virus. *Clin Diag Lab. Immunol.* **2**:322-324.
- Midulla F., Huang Y., Gilbert I., Cirino N., McFadden E. and Panuska J. (1989). Respiratory Syncytial virus infection of human cord and adult blood monocytes and alveolar macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**:771-777.
- Midulla F., Villani A., Panuska J., Dab I., Kolls J., Merolla R. and Ronchetti R. (1993). Respiratory Syncytial virus lung infection in infants: Immunoregulatory role of infected alveolar macrophages. *J. Infect Dis.* **168**:1515-1519.
- Mills B., Singer F., Weiner L. and Holst P. (1981) Immunohistological demonstration of Respiratory Syncytial virus antigen in Paget disease of bone. *Proc. Natl Acad Sci.* **78**:1209-1213.
- Mills B., Singer F., Weiner L., Suffin S., Stabile E. and Holst P. (1984). Evidence for both Respiratory Syncytial virus and measles virus antigens in the osteoclasts of patients with Paget's disease of bone. *Clin Orthop.* **183**:303-311
- Mills B. and Singer F (1987) Critical evaluation of viral antigen data in Paget's disease of bone. *Clin Orthop.* **217**:16-25
- Nadal D and Ogra P (1990) Development of local immunity: role in mechanisms of protection against or pathogenesis of Respiratory Syncytial viral infections. *Lung.* **168**:379-387
- Neuzil K., Tang Y and Graham B. (1996) Protective role of TNF- $\alpha$  in respiratory syncytial virus infection *in vitro* and *in vivo* *Am J Med Sci* **311**:201-204
- Nicholson K., Kent J. and Ireland D. (1993). Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults *BMJ* **307**:982-986
- Nwankwo M., Dym A., Schuit K., Olfar E. and Omene J. (1988). Seasonal variation in Respiratory Syncytial virus infections in children in Benin-city, Nigeria. *Trop Geogr Med.* **40**:309-313.
- Olchowy T., Ames T and Molitor T (1994) Interaction of bovine Respiratory Syncytial virus with bovine alveolar macrophages *in vivo* effects of virus infections upon selected cell functions *Can J Vet Res* **58** 42-48
- Oldstone M (1989) Viral persistence *Cell.* **56**:517-520
- Oldstone M. (1990) Viral persistence and immune dysfunction. *Hosp Pract* **25** 81-85, 88-98
- Oldstone M (1991) Molecular anatomy of viral persistence *J Virol* **65**:6381-6386
- Oldstone M and Rall G (1993) Mechanism and consequence of viral persistence in cells of the immune system and neurons. *Viral Immunopathol.* **35**:116-121



- Openshaw P. (1990). The 22,000-kilodalton protein of respiratory syncytial virus is a major target for Kd restricted cytotoxic T lymphocytes from mice primed by infection. *J. Virol.* **64**:1683-1689.
- Openshaw P. (1995a). Immunity and immunopathology to Respiratory Syncytial virus. The mouse model. *Am. J. Resp. Crit. Care Med* **152**:S59-S62.
- Openshaw P. (1995b). Immunopathological mechanisms in Respiratory Syncytial virus disease. *Springer Seminars in immunopathology.* **17**:187-201.
- Openshaw P., Culley F. and Olszewska W. (2001). Immunopathogenesis of vaccine-enhanced RSV disease. *Vaccine.* **20**:S27-31.
- Ostler T., Hussell T., Surh Ch., Openshaw P. and Ehl S. (2001). Long-term persistence and reactivation of T cell memory in the lung of mice infected with respiratory syncytial virus. *Eur. J. Immunol.* **31**:2574-2582.
- Panuska J., Cirino N., Midulla F., Despot J., McFadden E. and Huang Y. (1990a). Productive infection of isolated human alveolar macrophages by Respiratory Syncytial virus. *J. Clin. Invest.* **86**:113-119.
- Panuska J., Midulla F., Cirino N., Villani A., Gilbert I., McFadden E. and Huang Y. (1990b). Virus-induced alterations in macrophage production of tumor necrosis factor and prostaglandin E2. *Am. J. Physiol.* **259**:L396-L402.
- Panuska J., Hertz M., Taraf H., Villani A., and Cirino M. (1992) Respiratory Syncytial virus infection of alveolar macrophages in adult transplant patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* **145**:934-939.
- Panuska J., Merolla R., Rebert N., Hoffmann S., Tsvitse P., Cirino N., Silverman R. and Rankin J. (1995) Respiratory Syncytial virus induces interleukin-10 by human alveolar macrophages. *J. Clin Invest.* **96**:2445-2453.
- Peters V. and Sperber K. (1999). The effect of viruses on the ability to present antigens via the major histocompatibility complex. *Microbes and infection* **1**:335-345.
- Picker L. et al. (1999). Host defense against infection. In: *Immunobiology. The immune system in health and disease.* Chapter 9. Edited by Janeway Ch, Travers P., Walport M. and Capra J. Current Biology Publications and Garland Publishing. New York and London. pp 363-415.
- Raza M., Blackwell C., Elton R and Weir D. (2000). Bactericidal activity of a monocytic cell line (THP-1) against common respiratory tract bacterial pathogens is depressed after infection with respiratory syncytial virus. *J. Med. Microbiol* **49**:227-233
- Roberts N., Prill A and Mann T. (1986). Interleukin 1 and interleukin 1 inhibitor production by human macrophages exposed to influenza virus or Respiratory Syncytial virus. Respiratory Syncytial virus is a potent inducer of inhibitor activity. *J. Exp Med* **163**:511-519.
- Sajo M., Ishii G., Kokubo M, Takimoto M. and Takaahashi Y (1993). Respiratory Syncytial virus infection in lower respiratory tract and asthma attack in hospitalized children in north Itokkaido, Japan *Acta Paediatr Jpn.* **35** 233-237.
- Sajo M., Takahashi S, Kokubo M., Saino T, In-Yaku F, Ishii T., Takimoto M. and Takahashi Y (1994) The role of Respiratory Syncytial virus in acute bronchiolitis in small children in northern Japan *Acta Paediatr Jpn* **36**:371-374
- Shapiro S. (1999) The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease *Am J Respu Crit Care Med* **160** S29-S32
- Samuente R, Irado R. and Gomez B. (2001) Characteristics of a respiratory syncytial virus persistently infected macrophage-like culture *Virus Rev* (In Press)

- Schwarze J., Cieslewicz G., Joetham A., Ikemura T., Hamelmann E. and Gelfand E. (1999a). CD8 T cells are essential in the development of respiratory syncytial virus-induced lung eosinophilia and airway hyperresponsiveness. *J. Immunol.* **162**:4207-4211.
- Schwarze J., Cieslewicz G., Hamelmann E., Joetham A., Shultz L., Lamers M. and Gelfand E. (1999b). IL-5 and eosinophils are essential for the development of airway hyperresponsiveness following acute respiratory syncytial virus infection. *J. Immunol.* **162**:2997-3004.
- Sedgwick J., Riminton D., Eysen J. and Korner H. (2000). Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. *Immunol. Today.* **21**:110-113.
- Shchelkunov S., Blinov V. and Sandakhchiev L. (1993). Genes of variola and vaccinia viruses necessary to overcome the host protective mechanisms. *FEBS. Lett.* **319**:80-83.
- Shinjo M., Omoe K., Saito N., Matsuo N. and Nerome K. (2000). *In vitro* growth profiles of respiratory syncytial virus in the presence of influenza virus. *Acta Virol* **44**:91-97.
- Smith C., Davis T., Wignall J., Din W., Farrah T., Upton C., McFadden G. and Goodwing R. (1991). T2 open reading frame from the Shope fibroma virus encodes a soluble form of the TNF receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**:335-342.
- Smith C., Hu F., Smith T., Richards Ch., Smolak P., Goodwing R. and Pickup D. (1996). Cowpox virus genome encodes a second soluble homologue of cellular TNF receptors, distinct from CrmB, that binds TNF but not Lta. *Virology* **223**:132-147.
- Soh N., Nadal D., Berstein J., Schläpfer E., Nadal D., Schlapfer E., Bernstein J. and Ogra P. (1992). Immunologic response of adenoidal lymphocytes to Respiratory Syncytial virus. *Ann Otol. Rhinol. Laryngol.* **101**: 848-853.
- Southern P. and Oldstone M. (1986). Medical consequences of persistent viral infection. *Seminars in Medicine of the Beth Israel hospital, Boston.* **314**:359-367.
- Speert D. (1992). Macrophage in bacterial infection In: *The Natural Immune System The macrophage*. Chapter 5. Edited by Lewis C. et al. IRL Press. Oxford. pp. 215-247.
- Stoltze L., Schirle M., Schroter C., Thompson M., Hersh L., Kalbacher H., Stevanovic S., Rammensee H. and Schild H. (2000). Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat Immunol* **1** (5). 413-418.
- Streckert H., Philippou S. and Riedel F. (1996). Detection of respiratory syncytial virus (RSV) antigen in the lungs of guinea pigs 6 weeks after experimental infection and despite of the production of neutralizing antibodies. *Arch Virol* **141**:401-2410.
- Sugrue R., Brown C., Brown G., Aitken J. and Rixon H. (2001). Furin cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is not a requirement for its transport to the surface of virus-infected cells. *J Gen Virol* **82**:1375-1386.
- Sutherland K., Collins P. and Peoples M. (2001). Synergistic effects of gene-end signal mutations and the M2-1 protein on transcription termination by respiratory syncytial virus. *Virology* **288**:295-307.
- Takala A., Meurman O., Kleemola M., Kela E., Ronberg P., Eskola J. and Makela P. (1993). Preceding respiratory infection predisposing for primary and secondary invasive Haemophilus influenzae type b disease. *Pediatr Infect Dis J* **12**:189-195
- Tercier J. (1983) Bronchiolitis: a clinical review. *J Emerg. Med.* **1**:119-123
- Townsend A., McMichael A., Carter N., Huddleston J. and Brownlee G. (1984) Cytotoxic T cell recognition of the influenza nucleoprotein and hemagglutinin expressed in transfected mouse L cells. *Cell* **39** 13-25

- Tripp R., Jones L., Haynes L., Zheng H., Murphy P. and Anderson L. (2001). CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat. Immunol.* **2**:732-738.
- Van Snick J. (1990). IL-6: an overview. *Ann. Rev. Immunol.* **8**:253-278.
- Watts C. (2001). Antigen processing in the endocytic compartment. *Curr. Opin. Immunol.* **13**:26-31.
- Welliver R. and Ogra P. (1988). Immunology of respiratory viral infections. *Annu. Rev. Med.* **39**:147-162.
- Wright S. (1986). Methods for the study of receptor-mediated phagocytosis. *Meth Enzym.* **132**: 204.
- Yewdell J. and Bennink J. (2001). Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands. *Curr Opin. Immunol.* **13**:13-18.

## Persistence of Respiratory Syncytial Virus in Macrophages Alters Phagocytosis and Pro-inflammatory Cytokine Production

ANTONIETA GUERRERO-PLATA,<sup>1</sup> ENRIQUE ORTEGA,<sup>2</sup> and BEATRIZ GOMEZ<sup>1</sup>

### ABSTRACT

Functions of macrophage are known to be altered by acute infection with respiratory syncytial virus (RSV). However, it is unknown whether the persistent presence and expression of the RSV genome have any effect on the functions of these cells. We used a murine macrophage-like cell line (P388D<sub>1</sub>) persistently infected with RSV to determine: (i) phagocytic activity mediated by Fc $\gamma$  receptors, (ii) expression of Fc $\gamma$  receptors, and (iii) production of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ . Viral persistence was found to increase phagocytosis, expression of Fc $\gamma$  receptors and the production of IL-1 $\beta$  and IL-6. In contrast the biological activity of secreted TNF- $\alpha$  decreased. In this study we give novel evidence that RSV persistence alters the biological activities of macrophages.

### INTRODUCTION

RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (RSV) is considered a major cause of severe infections of lower respiratory tract in infants and children worldwide, and may cause severe and even fatal lung disease in immunocompromised and elderly persons. Although in immunocompetent individuals RSV infection stimulates a measurable antibody response, these antibodies do not prevent reinfection, which occurs multiple times during life (13). Attempts to correlate resistance to reinfection with the levels of RSV antibody in serum or lung lavage fluid have yielded conflicting results (19). Moreover, a formalin-inactivated RSV vaccine not only did not induce protective immunity, but the vaccinated group suffered a more severe disease upon infection by the virus (15,17,18). These observations suggest that defense mechanisms other than a humoral antibody response are necessary for controlling the disease. On the other hand, the role of cellular defense mechanisms in the control of infection are still unclear (13,19).

Viral primary replication takes place in the upper respiratory tract, from where it spreads and reaches the bronchioalveolar region, inducing inflammation in terminal bronchioles and alveoli, sites where macrophages constitute the largest population of defense effector cells (10). *In vivo*, macrophages may be exposed to RSV through inhalation of viral particles and/or by viral replication in epithelial cells (13). Infection of alveolar macrophages by RSV is likely, as studies *in vitro* and *ex vivo* have demonstrated that

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, and <sup>2</sup>Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México

human (24) and murine (8) macrophages and even a macrophage-like cell line (32) is permissive to RSV. The relevance on RSV infection of macrophages for the pathogenesis of the disease is not known. However, it is noteworthy that RSV infection of mononuclear phagocytes has significant effects on these cells, such as an increased production of mediators with immunoregulatory activity (3,26,37), and a reduction in phagocytosis (9).

RSV persistence in lymphoid (2) and nonlymphoid (1,11,14,29) cell lines has been reported. Despite the recognition that viral infection of a cell can modulate the expression of cellular genes and therefore the cell's functions, the effect of RSV persistence on functions related to host defense mechanisms has not been documented. Therefore, we sought to determine if the persistence of the viral genome and its expression could alter the biological functions of macrophages. In this paper, we report that the persistent infection by RSV of a macrophage-like cell line modulates the phagocytic activity, the expression of Fc $\gamma$ Rs, and the production of immunoregulatory molecules (IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ ).

## MATERIALS AND METHODS

**Virus.** Respiratory syncytial virus Long strain (ATCC, VR-26), kindly provided by Dr. Michael Trudel (Institute Armand-Frappier, Montreal, Canada) was propagated in HEp-2 cells. Viral infectivity was determined on HEp-2 cells and expressed in TCID<sub>50</sub>/mL, as described by Payment and Trudel (28).

**Cell lines.** Dr. Aubrey Tingle (University of British Columbia, Vancouver, Canada) kindly provided the macrophage-like cell line P388D<sub>1</sub> (ATCC TIB 63; hereafter M $\Phi$ ). The M $\Phi$  line was derived from a murine lymphoma induced with methylchlorantrene and is considered as a mature macrophage (20). P388D<sub>1</sub> cells persistently infected with RSV (hereafter M $\Phi$ P) were obtained and characterized in our laboratory (Sarmiento R. and Gómez B., submitted) by infection of P388D<sub>1</sub> cells with RSV at a m.o.i. of 10 and subculturing the surviving cells by splitting 1:2 approximately twice a week. The culture has been maintained for more than 3 years. Cells from passages 14–46 were used for the experiments reported here. RSV persistence was verified and monitored during the passages. Macrophages (M $\Phi$ P and M $\Phi$ ) were propagated in RPMI 1640 medium (GIBCO/BRL, Grand Island, NY) supplemented with antibiotics (penicillin 100 U/ml, streptomycin 100  $\mu$ g/ml), 0.2% NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES,  $1 \times 10^{-6}$  M of 2-mercaptoethanol and 10% heat inactivated (56°C, 30 min) fetal calf serum (FCS) (GIBCO/BRL, Grand Island, NY) 1:929 and HEp-2 cells (ATCC CCL1 and CCL3), kindly provided by Dr. Alejandro Zentella (Universidad Nacional Autónoma de México) and Dr. Aubrey Tingle, respectively, were propagated in MEM (GIBCO/BRL, Grand Island, NY) supplemented as described for RPMI but without 2-mercaptoethanol.

**Immunoperoxidase staining.** M $\Phi$ P or M $\Phi$  cells grown for 24 h in tissue culture chamber slides (Nunc Inc., Naperville, IL) in supplemented RPMI medium, were fixed with absolute methanol + 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ L/well) for 20 min at room temperature. Fixed cells were washed with PBS/1% bovine serum albumin (BSA) and incubated with 100  $\mu$ L/well of goat anti-RSV polyclonal IgG (Biogenesis Inc., Brentwood, NH) diluted 1:200 in PBS/1% BSA during 30 min at room temperature. After additional washing, peroxidase conjugated rabbit anti-goat IgG (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) diluted 1:500 in PBS/1% BSA was added and incubation was continued at room temperature for 30 min. After further washing, 100  $\mu$ L of substrate solution (0.5 mg/ml of DAB in PBS + 5  $\mu$ L of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were added, the reaction was stopped after 5 to 20 min by washing with PBS/1% BSA and observed in a Nikon Diaphot (Tokyo, Japan) microscope. At least 300 cells in different fields were counted in every preparation.

**RT-PCR.** Total cell RNA from M $\Phi$  and M $\Phi$ P was obtained according to the guanidium thiocyanate protocol (7). cDNA synthesis and polymerase chain reaction (PCR) amplification was carried out in the same tube in 20  $\mu$ L. Total RNA (3 to 5  $\mu$ g) was mixed with 4  $\mu$ L of reaction buffer 5 $\times$  (GIBCO/BRL, Grand Island, NY), 2  $\mu$ L of dNTP (10 mM each, GIBCO/BRL, Grand Island, NY), 0.5  $\mu$ L (20 U) of RNase inhibitor (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany) and brought to 20  $\mu$ L with DEPC water. After adding 50  $\mu$ L of mineral oil, the reaction mixture was incubated at 80°C during 5 min and cooled on ice. Primer #3 was added and the tube was incubated at 60°C for 10 min and ice cooled for 5 min. One microliter *Moloney murine leukemia virus* RT (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) was added and the mixture was incubated at 37°C for 60 min at 99°C for 5 min. To the transcription volume (20  $\mu$ L), 8  $\mu$ L

## RSV PERSISTENCE ALTERS MACROPHAGE ACTIVITIES

of PCR buffer 10× (Perkin Elmer, Norwalk, CT), 40 pmol of primers #1 and #2, and 0.5 U Taq polymerase (Biotech, Mexico, D.F. Mexico) were added. The sample was covered with mineral oil and amplified for 35 cycles (94°C for 1 min, 65°C for 1.5 min, 72°C for 1 min) and at 71°C for 7 min, thereafter kept at 4°C. An aliquot (10 µL) of reaction mixture was analyzed in a 1.2% agarose gel. With the primers used: (#1, 5'-CTTCTGTGCAAGTCTAGTACACTGTAGT3', #2, 5'-GGAACAAGTTGTTGAGGTTTATGAATATGC3'), a segment of 278 bp between nucleotides 858-1135 of RSV gene *N* was amplified (5).

**Phagocytosis assay.** Phagocytosis of IgG opsonized sheep red blood cells (IgG-SRBC) was determined by a modification of the method of Jungi (16). SRBC were labelled with TNP (2,4,6-trinitrophenol) by incubation with TNBS (1 mg/mL) in 0.2 M borate buffer pH 8.5, for 15 min at RT. After washing, TNP-SRBC were opsonized by incubation with a subhemagglutinating concentration of affinity-purified murine monoclonal anti-DNP IgG, prepared in our laboratory, followed by extensive washing in Hanks' balanced salt solution (HBSS). MΦ or MΦP cells were grown overnight in 96-well tissue culture plates (10<sup>5</sup> cells in 200 µL/well). Twenty-five microliters of a 2% suspension of opsonized SRBC in culture medium were added per well, and the plates were incubated for 60 min at 37°C. Thereafter, the plates were inverted to pour the medium and noningested SRBC were lysed by immersing the plates in distilled water for 5-10 sec followed immediately by three washes with phosphate-buffered saline (PBS). After the last wash, the cells in each well were lysed with 100 µL of 0.3% sodium dodecylsulfate (SDS) in PBS. Pseudoperoxidase activity of the hemoglobin in ingested SRBC was determined in the cell lysates by adding 50 µL of a solution of 3,3'-diaminobenzidine (0.4 mg/mL + 1.2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS). Optical density (OD) was read at 492 nm in an enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA) reader.

In all experiments, phagocytosis of opsonized and nonopsonized SRBC was determined in sixuplicate wells. Lysates from two additional wells to which no SRBC were added, but which were subjected to the same washing steps and immersion in hemolyzing solution, were used to determine cell protein concentrations by the method of Bradford (4).

To compensate for potential differences in the number of cells per well among different cell populations after washes, phagocytosis was calculated as the ratio of the OD value at 492 nm over the protein concentration in mg/mL, and expressed as percentage relative to the phagocytosis by noninfected cells (noninfected cells = 100%).

**Expression of FcγRII and FcγRIII.** Cell surface expression of Fcγ receptors was determined by flow cytometry using fluorescein-labeled rat monoclonal antibody (MAb) 2.4G2 (IgG<sub>2b</sub>, anti-FcγRII/FcγRIII) (36). MAb 2.4G2 was purified from hybridoma cells (ATCC HB179) supernatants by protein G-agarose chromatography, and labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC) in our laboratory, essentially as described by Goding (12). Cells (1 × 10<sup>5</sup>) either from MΦ cultures or from different MΦP passages, were incubated in 300 µL of RPMI with 3 µg of fluorescein labelled 2.4G2 antibody at 4°C for 2 h. After incubation, the cells were washed twice with cold PBS/0.1% BSA and fixed for 30 min at 4°C with 0.5% paraformaldehyde (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO) in PBS pH 7.4. Cell fluorescence was analyzed in a FACScan analyzer (Becton Dickinson, Mountain View, CA). In every measurement, 1 × 10<sup>4</sup> cells were analyzed.

**IL-1β and IL-6 assays.** MΦP and MΦ (100,000 cells/0.1 ml) were cultured in 96-flat well plates for 24 h in supplemented RPMI medium. IL-1β was measured in 50 µL of the 24 h supernatants by capture ELISA using a commercial kit (Quantikine<sup>TM</sup> M, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN), recombinant mouse IL-1β was used as standard.

IL-6 was similarly determined in 100 µL of culture supernatants by capture ELISA using two MAbs specific for mouse IL-6 (Pharmingen, San Diego, CA). Recombinant mouse IL-6 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) was used as standard.

**TNF-α assay.** TNF-α activity in culture supernatants was measured by a biological assay on L929 cells treated with actinomycin D (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), as described by Ruff and Gifford (31). Briefly, 100 µL of cell free supernatants from MΦP and MΦ were added to monolayers of L929 cells, and incubated for 17 h at 37°C. The monolayers were washed with PBS, stained with crystal violet, dissolved in methanol, and the absorbance at 595 nm was determined in an ELISA reader. Positive control using recombinant mouse TNF-α (10 pg/well, Sigma) in RPMI medium and negative control using RPMI media

were included in every experiment. The cytotoxic activity was expressed as cytotoxicity percentage and calculated by the following formula  $(OD \text{ negative control} - OD \text{ sample}) / (OD \text{ negative control} - OD \text{ positive control}) \times 100$ .

**Statistical analysis.** Analysis of the differences between M $\Phi$ P and M $\Phi$  for each biological function (phagocytosis, Fc $\gamma$ R, IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ ) was performed with the nonparametric Mann-Whitney *U*-test. For each biological function the values obtained in all the assays were grouped and the groups from infected versus noninfected macrophages were compared. When in a group two values were identical a correction for linkage was performed. *P* values  $\leq 0.05$  were considered statistically significant when both groups were compared (33).

## RESULTS

The effect of RSV persistence on macrophage functions was studied by comparing the functional properties of M $\Phi$ P and M $\Phi$  cultures. For each characteristic examined, at least three independent experiments were performed. In each experiment, M $\Phi$  and 1-4 different passages of M $\Phi$ P were tested simultaneously. Although the M $\Phi$ P culture has been characterized as long-term persistently infected, we decided throughout the course of the work to routinely confirm viral persistence in M $\Phi$ P.

**Confirmation of RSV persistence.** Persistence of RSV in passages of M $\Phi$ P was confirmed by determining the presence of the viral *N* gene, after amplification by RT-PCR. This gene was selected because no significant changes in its sequence have been reported in RSV isolates from various countries (6). The results obtained by RT-PCR assays showed a clear band of 278 bp (Fig. 1) corresponding to the amplified gene *N* segment and was observed in all the M $\Phi$ P passages. In addition, the percentage of cells expressing viral antigen was determined by indirect immunoperoxidase. We routinely observed a high percentage of cells from M $\Phi$ P cultures (70 to 85%), which were stained by the anti-RSV serum (Fig. 2), demonstrating that viral antigens were expressed. No positive cells were observed in M $\Phi$  cultures. To determine the presence of extracellular infectious virus, HEp-2 cells were infected with M $\Phi$ P supernatants. Even though no cell death was evident (probably due to the low sensitivity of the technique), viral antigen on some HEp-2 cells was demonstrated by immunoperoxidase staining (data not shown).

### Effect of RSV persistence on macrophage functions

**Phagocytosis mediated by Fc $\gamma$  receptors.** Phagocytosis of opsonized erythrocytes mediated by Fc $\gamma$  receptors was determined as described in the Materials and Methods section, in eight passages of M $\Phi$ P in four different experiments. The results are shown in Fig. 3.

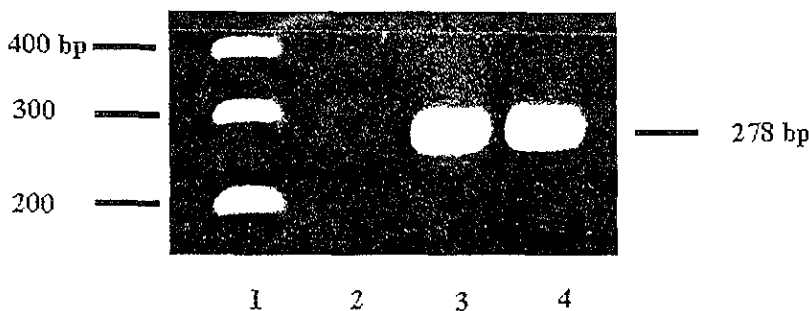
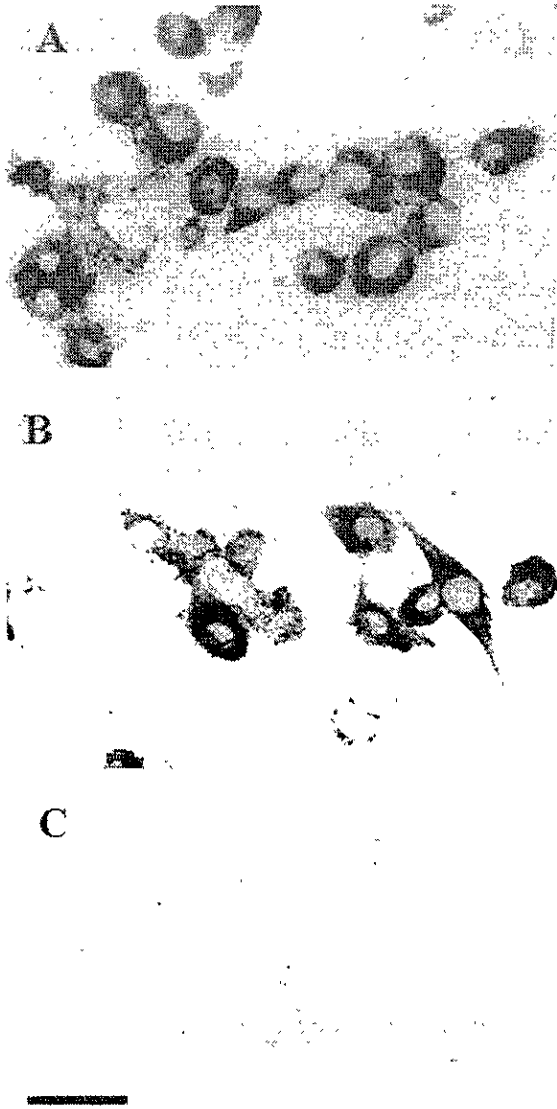


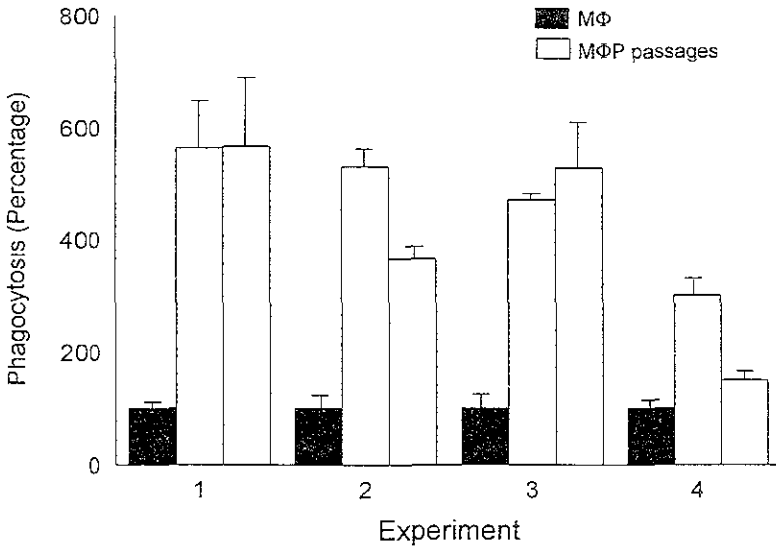
FIG. 1. Agarose/citridium bromide gel electrophoresis of RT-PCR products. DNA primers for the RSV gene *N* segment of 278 bp between nucleotides 888 and 1135 were used to synthesize cDNA and amplify it by PCR according to the procedure described in the Materials and Methods section. Lane 1, DNA size standards 50-2000 bp ladder (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA); Lane 2, 4, amplified RNA extracted from M $\Phi$  cells (Lane 2), acutely infected M $\Phi$  cells (Lane 3), and cells from a representative M $\Phi$ P passage (Lane 4).

RSV PERSISTENCE ALTERS MACROPHAGE ACTIVITIES



**FIG. 2.** Indirect immunoperoxidase staining of RSV antigen in macrophages. Fixed cells from MΦP passages or MΦ was treated with anti RSV IgG and the antigen-antibody complex was revealed with a peroxidase conjugated second antibody, as described in the Material and Methods section. (A) and (B): MΦP cells. (C): MΦ cells. Bar, 50  $\mu$ m





**FIG. 3.** Phagocytic activity of MΦP passages and MΦ cells. Phagocytosis of IgG opsonized SRBC cells was quantified by measuring the haemoglobin pseudoperoxidase activity by a colorimetric assay, as described in the Material and Methods section. Data are expressed as percentage of phagocytosis defined as mentioned. Filled bars (MΦ cells), open bars (MΦP passages). Values are the mean of eight determinations  $\pm$  one standard deviation ( $p < 0.004$ ).

Persistently infected macrophages showed higher phagocytic activity than noninfected cells. The difference in phagocytosis between the MΦP passages and the MΦ cells was statistically significant ( $p < 0.004$ ). In the same experiments we also determined as control the nonFc $\gamma$ -mediated phagocytosis with nonopsonized erythrocytes. Neither MΦ nor MΦP phagocytized nonopsonized erythrocytes.

**Expression of Fc $\gamma$  receptors.** The expression Fc $\gamma$ RII/Fc $\gamma$ RIII was quantified both in the MΦP culture and in uninfected cells. These determinations were done in three independent assays, which included nine MΦP passages (Fig. 4).

Both MΦP and MΦ cells express Fc $\gamma$ Rs, as determined by binding of fluorescein labelled MAb 2.4G2, which recognizes an epitope common to the extracellular domains of murine Fc $\gamma$ RII and Fc $\gamma$ RIII. All the MΦP passages showed fluorescence intensity values, which were higher than the noninfected cells, the mean fluorescence intensity increased 77–171% with respect to MΦ. The difference between the mean fluorescence intensities of the persistently infected cultures and MΦ was statistically significant ( $p < 0.05$ ).

**Determination of IL-1 $\beta$ , IL-6, and INF- $\alpha$ .** To determine the effect of RSV persistence in the secretion of immunomodulatory mediators, we examined the production of proinflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ .

IL-1 was determined in supernatants from 10 different MΦP passages in three independent experiments. Figure 5 shows the results. In each individual experiment the concentration of IL-1 in supernatants from MΦP passages was higher than the obtained from MΦ cultures. When the combined data from all three experiments was analyzed the differences between the two groups (MΦP and MΦ) were found to be statistically significant ( $p < 0.07$ ).

The concentration of IL-6 was measured in supernatants of seven MΦP passages, in three independent assays (Fig. 6). For each passage the value shown is the average of eight determinations. Higher amounts of secreted IL-6 were observed in all the MΦP passages than in MΦ cultures. When the grouped values were compared the difference between the two groups (MΦP and MΦ) was statistically significant ( $p < 0.01$ ).

## RSV PERSISTENCE ALTERS MACROPHAGE ACTIVITIES

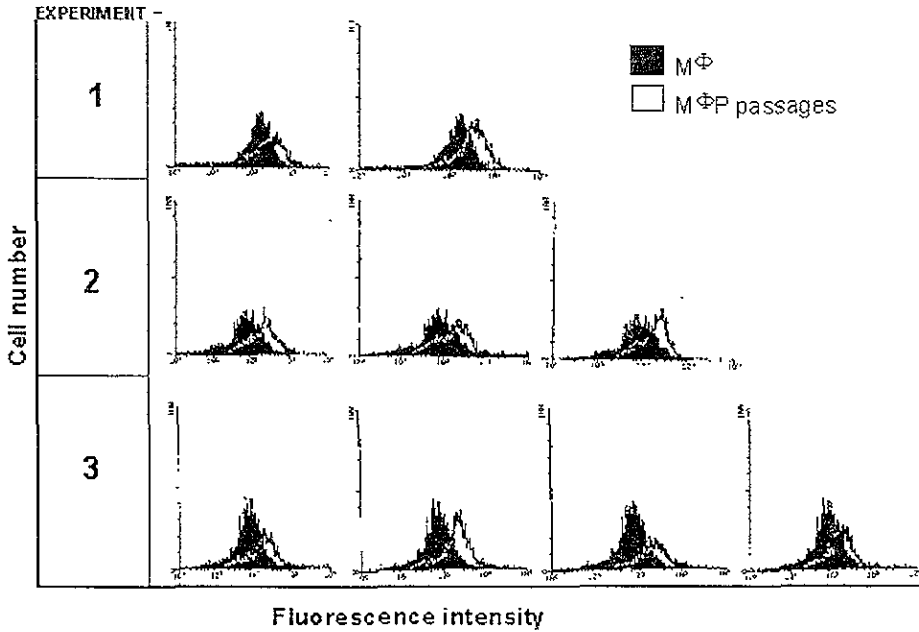


FIG. 4. Fluorescence profiles of  $Fc\gamma$  receptors expression in macrophages from  $M\Phi P$  passages and  $M\Phi$  cells. Surface  $Fc\gamma$  receptors on cells from  $M\Phi P$  passages or  $M\Phi$  cultures were stained with  $Fc\gamma$  RII/ $Fc\gamma$  RIII-specific MAb and analyzed by flow cytometry, as described in the Materials and Methods section. The black histogram shows the data from  $M\Phi$  cells and the white histogram from  $M\Phi P$  passages. The log of fluorescence intensity is shown in the abscissa and the cell number in the ordinate ( $p < 0.05$ )

The activity of secreted tumor necrosis factor alpha ( $TNF-\alpha$ ) was measured by a biological assay on L929 cells. Because the assay for determination of  $TNF-\alpha$  is based on its cytotoxic activity, it was important to verify that the measured cell death was not due to infectious virus present in the  $M\Phi P$  supernatants. The effect of RSV on viability of L929 cells was determined by adding either infectious or ultraviolet (UV) inactivated virus ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL) to L929 monolayer. No difference in cell viability was observed between infectious or UV-irradiated RSV, indicating that infectious virus does not have cytotoxic effect on L929 cells (data not shown). Thus, we decided to work without subjecting the supernatants to UV irradiation.

Supernatants of a total of 10 passages were used to determine production of  $TNF-\alpha$  in six independent assays (Fig. 7). In each assay positive and negative controls were included. The absorbance values obtained for all the  $M\Phi P$  passages were higher than for  $M\Phi$  cells, implying lower cytotoxic activity in  $M\Phi P$  supernatants. Moreover, the difference in cell cytotoxicity between  $M\Phi P$  passages and  $M\Phi$  was statistically significant ( $p < 0.02$ ).

## DISCUSSION

The mechanism by which the cellular local immune response contributes to respiratory syncytial virus clearance and to the inflammation of the bronchioles and alveoli observed in infants with RSV infection is unclear. However, it is likely that mononuclear phagocytes, which are found in large numbers in the air

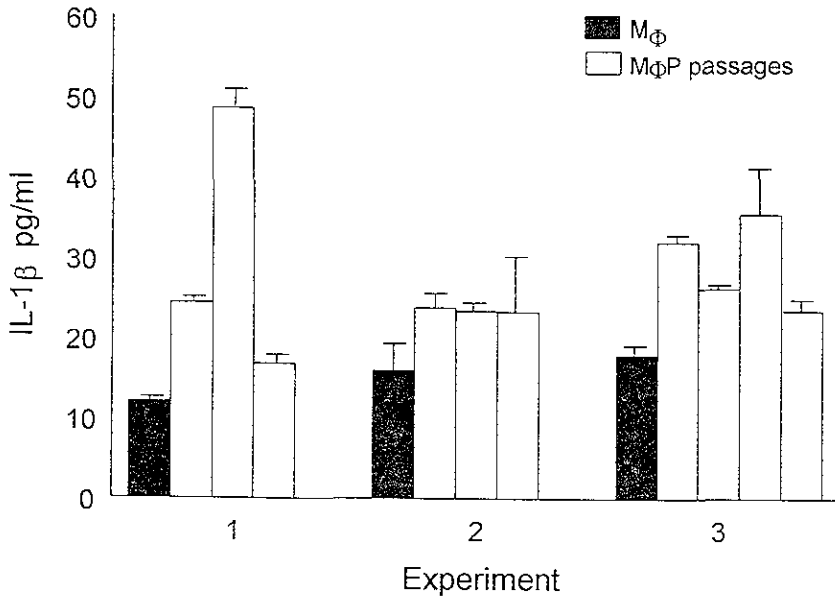


FIG. 5. IL-1 $\beta$  concentration in supernatants from M $\Phi$ P passages and M $\Phi$  cells. Cell-free fluids from M $\Phi$ P passages cultures or M $\Phi$  cells were collected after 24 h of incubation and IL-1 $\beta$  concentration was determined, as described in the Materials and Methods section. Concentration of IL-1 $\beta$  was calculated from a standard curve obtained with recombinant mouse IL-1 $\beta$ . Filled bars (M $\Phi$  cells), open bars (M $\Phi$ P passages). Data values are the mean of three determinations  $\pm$  one standard deviation ( $p = 0.01$ ).

ways of RSV infected patients, are playing an important role. Both *in vitro* and *ex vivo* studies demonstrate that the acute infection by RSV alters the biological activities of macrophages shortly after infection. Synthesis of cytokines including IL-1, IL-6, and TNF- $\alpha$  is enhanced (24,30) and bactericidal activity seems to be impaired (9). The studies reported here were designed to determine if the long-term persistence and expression of the RSV genome in cells of the monocytic lineage (persistently infected) alters the biological activities of these cells.

The effect of RSV persistence in macrophage activities was evaluated in an *in vitro* model using immortalized macrophages (P388D<sub>1</sub>) persistently infected with RSV. The continuous presence of the RSV in the macrophages used in this work was regularly monitored by amplification of the viral *N* gene. The expression of the RSV genome was confirmed by the presence of viral antigens in the M $\Phi$ P.

The percentage of cells that were positive by immunoperoxidase varied from 70 to 85% among different passages (Fig. 2). The different values in the number of macrophages that could be shown to express viral antigens could be due to variations in the level of viral gene expression in the infected cells. In fact, different levels of peroxidase staining in the preparation can be observed (Fig. 2). Macrophages expressing viral antigens in low amounts may escape detection because of the limited sensitivity of this methodology.

Based on the percentages of cells that can be shown to express viral antigens by immunostaining in our persistent culture, we cannot rule out the possible coexistence of persistently, acutely infected and noninfected macrophages in the culture. In this sense, our culture might resemble the *in vivo* situation, where some variation in the level of viral gene expression among different cells and coexistence of persistently, acutely infected and uninfected cells is likely to occur.

Cells from all M $\Phi$ P passages examined ingested more 100 opsonized erythrocytes per cell than M $\Phi$  cells. To obtain a quantitative and more objective determination of phagocytosis we measured the

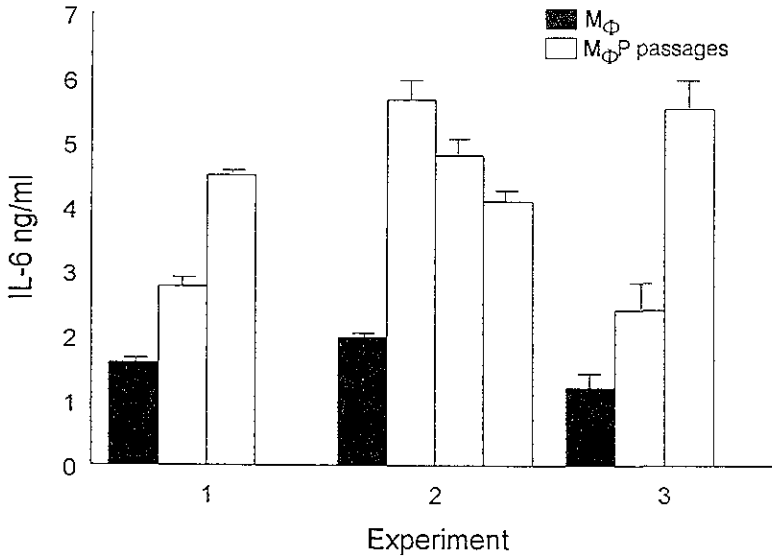


FIG. 6. IL-6 concentration in supernatants from MΦP passages and MΦ cells. Cell-free supernatant from different passages was collected after 24 h of incubation and was used for quantification of IL-6 by capture ELISA. Concentration of IL-6 was calculated from a standard curve obtained with recombinant mouse IL-6. Filled bars (MΦ cells), open bars (MΦP passages). Data are expressed as mean of eight determinations  $\pm$  one standard deviation ( $p = 0.017$ ).

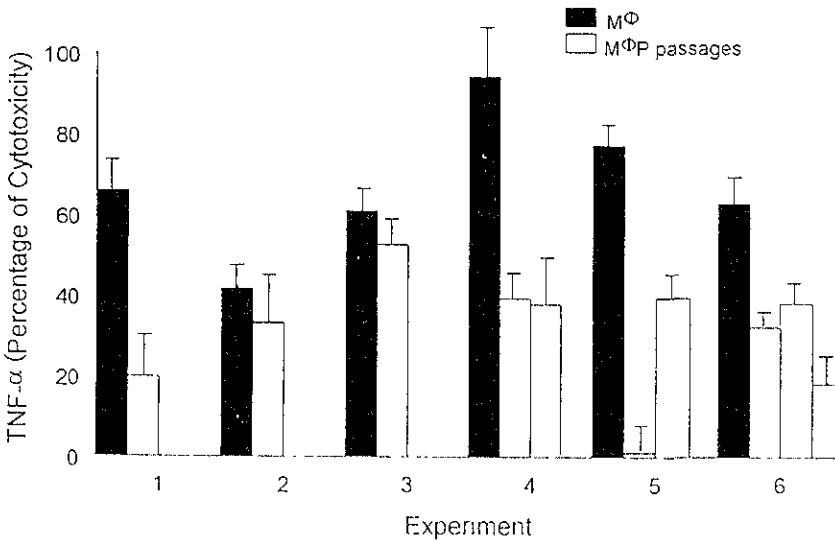


FIG. 7. TNF- $\alpha$  cytotoxic activity in supernatants from MΦP passages and MΦ cells. Cell-free supernatants from macrophages (MΦP passages and MΦ cells) were collected and cytotoxicity was determined as described in the Methods section. Filled bars (MΦ cells), open bars (MΦP passages). Data are expressed as the mean of six determinations  $\pm$  one standard deviation ( $p < 0.05$ ).

pseudoperoxidase activity of the hemoglobin of the ingested erythrocytes. To eliminate possible differences due to different number of macrophages in wells containing M $\Phi$ P or M $\Phi$ , we applied a correction for the protein concentration of each different lysate. The phagocytosis of IgG opsonized SRBC was about four to five times higher in M $\Phi$ P than in M $\Phi$  (Fig. 3). The difference in phagocytosis of the two cell populations was found to be statistically significant ( $p < 0.004$ ). Our finding of an increase in Fc $\gamma$  receptor-mediated caused by RSV persistence agrees with the observation reported in an *in vivo* calf model where phagocytic activity was determined in alveolar macrophages obtained from calves infected with bovine respiratory syncytial virus (23). This virus belongs to the same *Genus* (Pneumovirus) as human RSV, and both of them present similar clinical manifestations in their natural host, bovine and human respectively (21). In contrast, a decrease in non-Fc $\gamma$  mediated phagocytosis was observed in assays with *S. cerevisiae* by RSV-infected murine macrophages (9).

The observed increase in phagocytic activity could be mediated, at least in part, by the observed increase in Fc $\gamma$ Rs (Fig. 4). In both M $\Phi$ P and M $\Phi$ , the percentage of cells stained by MA b 2.4G2 (anti-Fc $\gamma$ RII-Fc $\gamma$ RIII) was similar (between 94 and 99%). However, the mean fluorescence intensity was higher in M $\Phi$ P than in the controls (the percentage of increase varied from 80 to 170 in different passages). It is noteworthy that in all samples examined there was a single peak in the fluorescence histograms.

Distinct effects of RSV infection of cells of the mononuclear phagocyte system have been documented. Thus, for example, RSV infection in murine alveolar macrophages caused an increase in secretion of TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-6 (9,35), although their release of reactive oxygen intermediates, phagocytosis of *S. cerevisiae*, and killing of protozoa was reduced (9). Reports in human alveolar macrophages are contradictory: in one study, RSV markedly stimulated expression of IL-10 and the protein levels of TNF- $\alpha$ , but did not alter IL-1 $\beta$  and decreased IL-8 production (24). Another study reported induction of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-8 (3). In human milk macrophages, exposure to RSV resulted in an increased expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  (34). Although there are some contradictory results, it is apparent that RSV infection can alter cytokine production in cells of the mononuclear phagocyte system. Some of the discrepancies among the effects found in different studies may arise from differences in the maturation or activation state among the cells used. Indeed it has been shown (25) that RSV infection increased expression and secretion of TNF- $\alpha$  in human alveolar macrophages, but not in blood monocytes (22).

We found a statistically significant increase in secretion of IL-1 $\beta$  and IL-6 produced by RSV persistence (Figs. 5 and 6). In contrast, the biological activity of TNF- $\alpha$  was significantly lower in the persistently infected culture than in the uninfected cells (Fig. 7). At this time, we cannot postulate a mechanism responsible for the observed changes in cytokine production by the infected cells. The expression of viral genes and the alteration of cellular gene expression by the virus may induce or repress different cellular genes. This would change the properties of the infected cells, similar to the action of extracellular regulatory cytokines that by altering macrophage gene expression induce changes in the functional properties of these cells. Moreover, it is known that the induction of gene expression by cytokines is usually regulated by more than one specific extracellular signal, and interactions among the different signals acting at any given time define the precise phenotype (27).

Although persistent infection by RSV have been reported in various cell lines (BCL [2], BS-C-1 [29], HEP-2 [11], HeLa [14], and BALB/c [11]), our results are the first to show that RSV persistence in an immortalized macrophages can alter their biological functions.

Although, we consider it more likely that the observed functional changes in the biological activities of the macrophages are caused by the presence and expression of the RSV genome, we cannot rule out the contribution of noninfected macrophages, whose biological activities might be influenced by cytokines secreted by infected cells. Further studies are in progress to differentiate between these possibilities.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Claudia Garay for expert technical assistance, Cristina Morán for help with statistical analysis, Antonio Ramirez for help with FACS analysis, Dr. Miguel Morales for help with the pictures, and

## RSV PERSISTENCE ALTERS MACROPHAGE ACTIVITIES

Dr Pietro Pala for his critical review of this manuscript. Grant support from DGAPA-UNAM to B.G. (IN 207296) and to E.O. (IN 204696) is gratefully acknowledged.

### REFERENCES

1. Baldrige, P., and L. Senterfit. 1976. Persistent infection of cells in culture by respiratory syncytial virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151:684-688.
2. Bangham, C., and A. McMichael. 1986. Specific human cytotoxic T cells recognize B-cell lines persistently infected with respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:9183-9187.
3. Becker, S., J. Quay, and J. Soukup. 1991. Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *J. Immunol.* 147:4307-4312.
4. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
5. Cane, P., and C. Pringle. 1991. Respiratory syncytial virus heterogeneity during an epidemic: analysis by limited nucleoside sequencing (SH gene) and restriction mapping (N gene). *J. Gen. Virol.* 72:349-357.
6. Cane, P., and C. Pringle. 1995. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus: a review of the use of reverse transcription-polymerase chain reaction in the analysis of genetic variability. *Electrophoresis.* 16:329-333.
7. Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
8. Franke, G., J. Freihorst, C. Steimmüller, W. Verhagen, S. Hockertz, and M. Lohmann-Matthes. 1994. Interaction of alveolar macrophages and respiratory syncytial virus. *J. Immunol. Methods.* 174:173-184.
9. Franke-Ullmann, G., C. Pfortner, P. Walter, C. Steimmüller, M. Lohmann-Matthes, L. Kobzik, and J. Freihorst. 1995. Alteration of pulmonary macrophage function by respiratory syncytial virus infection *in vitro*. *J. Immunol.* 154:268-280.
10. Fels, A., and Z. Cohn. 1986. The alveolar macrophage. *J. Appl. Physiol.* 60:353-369.
11. Fennie, B., E. Ford, and J. Germ. 1981. The development of Balb/c cells persistently infected with respiratory syncytial virus: presence of ribonucleoprotein on cell surface. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 167:83-86.
12. Goding, J. 1996. Fragmentation and isotopic labelling of monoclonal antibodies, pp. 223-230. in Goding, J.M. (ed.) *Monoclonal antibodies: Principles and practice*. Academic Press Inc., London.
13. Hall CB. 1998. Respiratory syncytial virus, in: Feigen, R.D., Chen, J.D., and Fletcher, J. (eds.) *Textbook of pediatric infectious diseases*. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
14. Jankevich, O., and R. Pletzin. 1977. Chronic infection of HeLa cells with respiratory syncytial virus. *Vopr. Virusol.* 2:142-147.
15. Joffe, F. 1969. Vaccine against respiratory syncytial virus. *Lancet.* 2:311.
16. Jung, T. 1985. A rapid and sensitive method allowing photometric determination of erythrophagocytosis by mononuclear phagocytes. *J. Immunol. Methods.* 82:141-153.
17. Kapikian, A., R. Mitchell, R. Chanock, R. Shvedoff, and C. Stewart. 1969. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am. J. Epidemiol.* 89:105-121.
18. Kim, H., J. Canchola, C. Brandt, G. Pyles, R. Chanock, K. Jensen, and R. Parrott. 1969. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am. J. Epidemiol.* 89:442-454.
19. Kimpen, H. 1996. Respiratory syncytial virus immunology. *Pediatr. Allergy Immunol.* 78:86-90.
20. Koren, H., B. Handwerker, and P. Winkler. 1978. Identification of macrophage-like characteristics in a cultured mouse tumor line. *J. Immunol.* 121:893-899.
21. Latchford, J. 2000. Domestic biology of the avian influenza virus. *Acta Vet. Scand.* 41:1-5.

2. Midulla, F, A Villani, J Panuska, I Dab, J Kolls, R Merolla, and R Ronchetti 1993 Respiratory syncytial virus lung infection in infants. Immunoregulatory role of infected alveolar macrophages. *J Infect. Dis.* 168:1515-1519.
3. Oichowy, T., T. Ames, and T Molitor 1994 Interaction of bovine respiratory syncytial virus with bovine alveolar macrophages in vivo: effects of virus infections upon selected cell functions. *Can. J. Vet. Res.* 58:42-48.
4. Panuska, J, N. Cirino, F. Midulla, J Despot, E. Jr McFadden, and Y Huang 1990. Productive infection of isolated human alveolar macrophages by respiratory syncytial virus. *J Clin Invest* 86:113-119.
5. Panuska, J, F. Midulla, N Cirino, A. Villani, I. Gilbert, E. McFadden, Jr. and Y Huang. 1990. Virus-induced alterations in macrophage production of tumor necrosis factor and prostaglandin E2. *Am. J. Physiol.* 259(6 pt 1):L396-L402
6. Panuska, J., M. Hertz, H. Taraf H, A. Villani, and N Cirino 1992 Respiratory syncytial virus infection of alveolar macrophages in adult transplant patients. *Am Rev Respir. Dis* 145 934-939
7. Patel, J, Z. Jiang, N Nakajima, and M. Kunimoto. 1998. Autocrine regulation of interleukin-8 by interleukin-1 alpha in respiratory syncytial virus infected epithelial cells in vitro. *Immunology.* 95 501-506
8. Payment, P., and M. Trudel 1993. Karber method, pp 33, in Payment, P. and Trude. I.M. (eds.) *Methods and techniques in virology*. Marcel Dekker, New York
9. Pringle, C. P. Shroderia, P. Cash, D. Chriswell, and P Malloy. 1978. Initiation and maintenance of persistent infection by respiratory syncytial virus. *J. Virol* 28 199-211
10. Roberts, N. Jr., A. Pnll, and T. Mann. 1986. Interleukin 1 and interleukin 1 inhibitor production by human macrophages exposed to influenza virus or respiratory syncytial virus. Respiratory syncytial virus is a potent inducer or inhibitor activity. *J Exp Med* 163:511-519
11. Ruff, M., and G Gifford 1981 Rabbit tumor necrosis factor: mechanism of action. *Infect. Immun* 31:380-385
12. Sakai, S, H Ochiai, H. Kamata, T Kogure, Y Shimada, K Nakajima, and K Terasawa 1997 Contribution of tumor necrosis factor and interleukin-1 alpha on the production of macrophage inflammatory protein-2 in response to respiratory syncytial virus infection in a murine macrophage cell line, RAW264.7. *J. Med. Virol* 53 145-149.
13. Siegel, S 1990. El caso de dos muestras independientes, pp 120-187, in Siegel, S (ed.) *Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta*. Editorial Trillas, Mexico, DF
14. Sone, S., H Tsutsumi, R Takeuchi, K Matsuda, S Imae, P Ogra and S Chiba 1997 Enhanced cytokine production by milk macrophages following infection with respiratory syncytial virus. *J. Leuc Biol.* 61 630-636
15. Stadnyk, A, T Gillan, and R Anderson 1997 Respiratory syncytial virus triggers synthesis of IL-6 in BALB/c mouse alveolar macrophages in the absence of virus replication. *Cell Immunol* 176 122-126
16. Unkeless, J. 1979. Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J Exp Med* 150 580-596
17. Van Schaik, S M, R C Welliver, and J L L. Kimpfen 2000. Novel pathways in the pathogenesis of respiratory syncytial virus disease. *Pediatr. Pulmonol* 30 131-138

Address reprint requests to:

Gomez, Beatriz  
 Departamento de Microbiología y Parasitología  
 Facultad de Medicina  
 Universidad Nacional Autónoma de México  
 México, D.F. 04510

E-mail: begomez@servidor.unam.mx