

00524
132

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EFECTO DE LA INFECCION PERSISTENTE DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO EN LA EXPRESION DE RECEPTORES Fcy RII/RIII EN LA MEMBRANA CELULAR DE MACROFAGOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
RAFAEL PALMA GONZALEZ

MEXICO, D.F.



2003

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

A



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.

Jurado asignado

Presidente	MARIA LEONILA DE LA O MAESE
Vocal	AIDA NAVAS PÉREZ
Secretario	BEATRIZ GÓMEZ GARCÍA
1er. Suplente	ROSA ELENA SARMIENTO SILVA
2do. Suplente	ROCIO G. TIRADO MENDOZA

Sitio donde se desarrolló el tema

Laboratorio de Virología 2º piso, Edificio "A" Facultad de Medicina UNAM

Asesor del Tema: BEATRIZ GÓMEZ GARCÍA

Beatriz Gómez García

Sustentante: RAFAEL PALMA GONZÁLEZ

Rafael Palma González

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo excepcional.

NOMBRE: Rafael Palma González

FECHA: 25 de Noviembre 2003

FIRMA: *[Firma]*

B

A mi familia ...

A mis papás Rafael Palma Cárdenas y Mirna González Reyes, a quienes les debo todo y en este caso el haber concluido esta etapa de mi vida, gracias a su apoyo, comprensión, amor y confianza brindados durante todo este tiempo.

A Fredy y Marco simplemente por ser mis hermanos.

A mis abuelitos Emma Reyes González y Daniel González Silva por haber estado conmigo y haberme apoyado durante mi infancia.

A mi abuelita Toña.

A todos mis primos y tíos que aunque no estamos juntos, los quiero y aprecio mucho y siempre seremos familia.

A la familia Cova Pérez, en especial a la Sra. Guille y al Sr. Antonio por ser excelentes amigos y permitirme compartir momentos muy bellos con su familia.

A Argelia por haberme brindado su amor, apoyo y comprensión durante estos últimos años.

A Guille (Yema), Cecy (Tachi T) y Arge (Edis) por ser como mis hermanas quienes me brindaron su amistad incondicional sin conocerme y por quienes siento un cariño muy especial.

A la familia Cova Mayén por su amistad y por permitirme vivir momentos tan importantes como la llegada del pequeño Luis y posteriormente la de Oscar.

C

A mis amigos ...

A mis amigos de la Facultad de Química, Augusto, Selene, Miguel Q., Miguel A., Leonardo, Octavio, Sandra, Concep. y en especial a Alberto M. por su amistad.

Agradezco a la Dra. Beatriz Gómez García por su apoyo y confianza que deposito en mí al ponerme a cargo de este proyecto.

A mis amigos(as) del Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina, Rocio y Rosa Elena, Laura, Gerardo, Nancy, Claudia y Gustavo, en especial a Rocio por su ayuda dentro del laboratorio en el manejo de algunas técnicas y equipos, consejos y recomendaciones, así como a Rosa Elena por sus ideas y propuestas, las cuales me fueron muy útiles.

Un agradecimiento muy especial a Jesús Núñez, Ignacio Palacios y a la Sra. Chelo, por su invaluable ayuda y amistad.

Agradezco al jurado: Maria Leonila de la O Maese, Aida Navas Pérez y Beatriz Gómez García por su colaboración durante la revisión de este trabajo.

D

Agradezco a las siguientes instituciones por su apoyo económico, sin el cual no hubiera sido posible realizar este trabajo:

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por la beca otorgada durante la realización de mi tesis de licenciatura mediante el proyecto IN206400.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado mediante el proyecto 31112-M.

E

“EFECTO DE LA INFECCIÓN PERSISTENTE
DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO
EN LA EXPRESIÓN
DE RECEPTORES F_{cy} RII/RIII
EN LA MEMBRANA CÉLULAR DE
MACRÓFAGOS”

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	4
1. GENERALIDADES DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO (RSV)	4
2. RESPUESTA INMUNE A LA INFECCIÓN POR VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO (RSV)	7
3. ASPECTOS INMUNES E INMUNOPATOLÓGICOS DE LA INFECCIÓN POR EL RSV	14
4. GENERALIDADES DE INFECCIONES VIRALES PERSISTENTES	17
5. INFECCIÓN AGUDA DE MACRÓFAGOS CON RSV	18
6. INFECCIÓN PERSISTENTE DE MACRÓFAGOS CON RSV	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO	22
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23
1. VIRUS	23
2. LÍNEAS CELULARES	23
2.1 P388D1.....	23
2.2 MφP.....	23
2.3 MφA.....	24
2.4 VERO.....	24

3. CONTEO DE CÉLULAS	24
4. HIBRIDOMA	25
5. PRODUCCIÓN DE VIRUS	25
6. TITULACIÓN DE VIRUS POR TCID₅₀	26
7. DETERMINACIÓN DE ANTÍGENO DE RSV POR INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA	28
8. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES F_{cγ} DE SUPERFICIE	28
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
 RESULTADOS	 30
1. CONFIRMACIÓN DE LA PRESENCIA DE RSV EN LAS CÉLULAS MΦP	30
2. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES F_{cγ}RII/F_{cγ}RIII EN LA SUPERFICIE DE CÉLULAS PERSISTENTEMENTE INFECTADAS CON RSV	31
 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	 39
 CONCLUSIONES	 42
 APÉNDICE	 43
 BIBLIOGRAFÍA	 46

INTRODUCCIÓN

I. GENERALIDADES DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO (RSV)

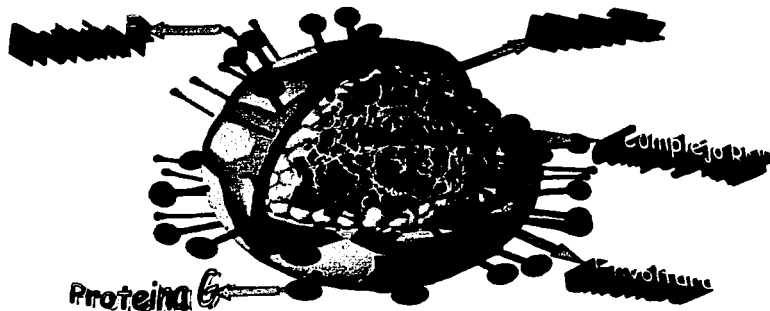
A Nivel Mundial el Virus Sincicial Respiratorio (RSV) es considerado como el agente etiológico más importante de infecciones del tracto respiratorio bajo, así como la principal causa de morbilidad y mortalidad entre las enfermedades infecciosas en niños de 0-12 años. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que entre un 25% - 33% de las muertes en niños menores de 5 años de edad son originadas por infecciones agudas del tracto respiratorio bajo. Entre los patógenos respiratorios, el Virus Sincicial Respiratorio (RSV), es la principal causa de hospitalización (P.K.S. Chan et al. 1999).

Posiblemente el 100% de los niños han sido infectados con el Virus Sincicial Respiratorio (RSV) en sus primeros años de vida, y cerca del 66% de estos niños fueron infectados durante su primer año de vida. En un estudio realizado en Suecia se encontró que a los 18 meses de edad aproximadamente el 75% de los niños en este estudio presentaban anticuerpos IgG anti-RSV. El Virus Sincicial Respiratorio es estacional y provoca la incidencia de epidemias en todo el mundo. En países templados, la mayor incidencia de infección ocurre durante el invierno o primavera y no es posible aislar el virus en verano, mientras que en países tropicales y semitropicales, la mayor incidencia de infección por este virus es durante la época de lluvias.

El Virus Sincicial Respiratorio (RSV) pertenece a la familia *Paramixoviridae* dentro del género *Pneumovirus*, el virión es de forma esférica irregular con un diámetro que puede fluctuar entre los 150 y los 300 nm, envuelto por una capa lipídica proveniente de la membrana celular de la célula huésped. Su genoma es una cadena sencilla de RNA polaridad negativa no segmentada constituida de aproximadamente 15222 nucleótidos con peso molecular de $5.0 - 5.64 \times 10^6$ Da. (Lambert D. et al. 1980, Huang Y. et al. 1982, Huang y. et al. 1983, Dickens et al. 1984, Collins P. et al. 1984, Barik S. et al. 1992, Collins P. et al. 1996).

El genoma viral codifica 10 mRNAs poliadenilados que al transcribirse darán lugar a 11 proteínas virales (NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2-1, M2-2 y L), de las cuales es importante mencionar que NS1 y NS2 son no estructurales, es decir, se encuentran solo en células

infectadas. Se han aislado dos grupos de RSV (A y B), clasificados en base a la diversidad genética de su proteína G, el que se aísla con mayor frecuencia es el A (Collins P. et al., 2001).



3 Proteínas se encuentran en la envoltura del virión: F,G y SH.

La Proteína de fusión F esta constituida de 574 aminoácidos con peso molecular de 70 KDa, es la encargada de que se lleve a cabo la penetración del virus en la célula, así como la fusión de células entre sí para formar sincitios, esta proteína se sintetiza como un precursor inactivo (F0), el cual sufre un corte por furina y quizá otra proteasa hasta el momento no identificada, originándose dos subunidades (F1-F2) unidas por un puente disulfuro. (Techaarpornkul S. et al. 2002, Sugrue RJ. et al. 2001, Zimmer G. et al. 2001).

Otra proteína que se encuentra en la envoltura del virión es la glicoproteína G cuyo peso molecular es de 90 KDa. y esta formada por 298 aminoácidos, es la responsable de la unión del virus a la célula huésped. Esta proteína se encuentra en dos formas, la soluble (Gs), que se detecta en el medio de cultivo después de aprox. 6 hrs. de infección y la forma no soluble, que se encuentra asociada al virión y puede ser detectada hasta después de 12 hrs. de infección.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La tercera proteína que se encuentra en la envoltura viral es la Proteína SH (hidrofóbica), cuyo peso molecular es de 7.5 a 40 KDa y esta formada por 64 aminoácidos, su función aún no se conoce pero hay evidencias de que al coexpresarse con las proteínas G y F la formación de sincitios es mas eficiente. (Burkreyev A. et al. 1997).

La Proteína M (Matriz), es una proteína relativamente pequeña, tiene 256 aminoácidos y pesa aproximadamente 28.7 KDa. Una de sus funciones es la de mantener a la nucleocapside transcripcionalmente inactiva antes del empaquetamiento viral, y la otra es la de mediar la asociación entre la nucleocapside y la envoltura. (Collins P. et al. 2001).

La Nucleocapside esta integrada por las proteínas (N, P, L, M2-1). La Proteína N de 391 aminoácidos tiene un peso molecular de 43.4 KDa., su función es estructural y se encuentra unida al RNA genómico y antigenómico confiriéndole a la nucleocapside una resistencia a la acción de RNAsas. La fosfoproteína P de 241 aminoácidos con peso molecular de 27.1 KDa. y la Proteína L (2165 aminoácidos con peso molecular de 250 KDa.) juegan un papel importante durante la transcripción y la replicación del RNA viral. Es importante mencionar que L tiene actividad de polimerasa y que tanto P como L se encuentran unidas al RNA viral. (Lamb R. et al. 2001). El gene M2 codifica para 2 proteínas: M2-1 (194 aminoácidos con peso molecular de 22.1 KDa.), el cual es un factor de anti-terminación necesario para la replicación viral (Fearn R et al. 1999) y M2-2 (90 aminoácidos y 11 KDa.), cuya función se cree que esta involucrada en el balance entre la replicación y la transcripción viral (Bermingham A. & Collins P. 1999). Las Proteínas NS1 (139 aminoácidos con peso molecular de 15.6 KDa.) y NS2 (124 aminoácidos con peso molecular de 14.6 KDa.) son proteínas no estructurales, la función de ambas se desconoce hasta el momento.

La unión entre virus-célula no esta limitada a ser mediada por una sola molécula, sino que posiblemente hay varias moléculas celulares que interaccionan con algunas proteínas virales. Se ha reportado que la proteína G juega un papel muy importante durante la infección, ya que se une a glicosaminoglicanos (GAG's) que se encuentran en la superficie celular (Martínez I. & Melero J. 2000), y también se une a un receptor de quimiocinas del tipo CXC3 (Tripp R. et al. 2001), así también esta reportada la unión de la proteína F con proteínas de superficie celular como TLR4, CD14 (Kurt-Jones E. et al. 2000) y moléculas de adhesión celular como ICAM-1 (Behera K. et al. 2001). Una vez que se lleva a cabo la unión, ocurre la fusión entre la

membrana plasmática de la célula huésped con el virus a través de la proteína F, y después la nucleocápside es liberada al citoplasma celular. Posteriormente la polimerasa viral tiene contacto con el RNA viral para así dar lugar a la producción de los RNA mensajeros que posteriormente se traducirán en proteínas virales.

El Epitelio del tracto nasal y la nasofaringe, son los sitios donde inicialmente se lleva a cabo la replicación del RSV, pero también puede infectar el tracto respiratorio bajo, causando varios síndromes respiratorios como bronquitis, neumonía y bronquiolitis (Anderson J. et al. 1989).

2. RESPUESTA INMUNE A LA INFECCIÓN POR VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO (RSV)

La respuesta inmune originada por el RSV es permanente pero no efectiva, las reinfecciones son frecuentes aún en presencia de altos títulos de anticuerpos neutralizantes (Collins P. et al. 1996, Wayde PR. 1998, Openshaw R. 1995, Falsey A. et al. 2000).

Estudios de la respuesta inmune a la infección por RSV en humanos así como en modelos experimentales (rata de algodón y ratón) indican que la infección altera las funciones protectoras de las células involucradas en la defensa específica e inespecífica del huésped. (Alwan W. et al. 1992, Becker S. et al. 1991, Crowe JE. 1999, Openshaw P. 1995).

Los macrófagos participan en la respuesta inmune inespecífica y forman parte de los componentes principales del organismo encargados de inactivar y eliminar patógenos. En caso de los macrófagos alveolares, estos se encuentran estratégicamente localizados para ser la primera línea de defensa con la que el virus tiene contacto después de atravesar la membrana basal del epitelio, y durante el proceso infeccioso están en mayor cantidad que otras células. (Franke G. et al. 1995).

A través del curso natural de la infección, el macrófago alveolar es célula blanco para la infección debido a que es permisivo al Virus Sincicial Respiratorio (RSV) (Panuska J. et al. 1990).

Los macrófagos tienen varias funciones, las cuales podemos agrupar en tres grandes rubros: I) Actividad Fagocítica, II) Producción de Citocinas que actúan sobre la regulación del sistema

inmune y III) Presentación de antígeno por medio de moléculas de Clase I y Clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) (Lindsay J. et al. 2001, Trine H. et al. 2001).

1) **Actividad Fagocítica:** El macrófago puede ingerir partículas de mas de 1µm. de diámetro a través de prolongaciones de actina en forma de pseudópodos (Speert D. 1992), al activarse aumentan su actividad energética para poder producir reactivos intermediarios de oxígeno, enzimas así como también la producción de citocinas (Adams D. 1992, David M. et al. 2001).

La Fagocitosis se clasifica como específica (mediada por receptores celulares) o inespecífica cuando los receptores no se conocen. La gran variedad de moléculas receptoras que median fagocitosis sirven para facilitarla, así también determinan el control sobre la propagación, diferenciación, activación, reconocimiento, endocitosis, migración y secreción. (Auger et al. 1992).

Los macrófagos poseen receptores para distintas moléculas del sistema inmune que median fagocitosis, como los receptores para inmunoglobulinas del isotipo IgG, y receptores para algunos componentes del complemento. La fagocitosis mediada por receptores para IgG es primordial para hacer frente a las infecciones por patógenos. En cambio los receptores de manosa-fucosa se encuentran de forma constitutiva como componentes para la fagocitosis en fagocitos mononucleares. Los receptores para IgG se han clasificado en varios grupos (Jeffrey V. 1990, 1997, 2001, J.E. Gessner 1998, Neil A. 1996), de acuerdo a su peso molecular, afinidad y especificidad por ligando, tipo celular en el que se expresan, y por diferencias antigénicas.

a) **Grupo 1.** Los Fcγ RI (CD64) se distinguen por su alta afinidad por el ligando aún siendo monomérico. En el caso del receptor murino (mFcγ RI), la más alta afinidad es para IgG2a, mientras que para el receptor en humano (hFcγ RI) la más alta afinidad es para IgG3. En ambos casos se encuentra en monocitos, macrófagos y en neutrófilos, su expresión se ve aumentada hasta 20 veces bajo la influencia del interferón gamma (IFNγ). Estos receptores median fagocitosis y citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC) en macrófagos y líneas relacionadas.

- b) *Grupo 2.* Los Fcγ RII (CD32) tienen baja afinidad por el ligando monomérico, la afinidad relativa de su interacción con distintos isotipos de IgG, siguen el orden: 2b>2a>1>>3. Se encuentra en fagocitos mononucleares, linfocitos T y B, y neutrófilos. Se sabe que uno de los transcritos del gene humano (Fcγ RIIa) media fagocitosis y ADCC en macrófagos, mientras que el transcrito (Fcγ RIIb) se relaciona con estimulación a linfocitos (Kinet J. 1989). El Receptor tipo II murino presenta las formas 1b y 2b, que se diferencian solo en la presencia o ausencia de la porción intracitoplasmática de la proteína. En el caso del Fcγ RII 1b, el receptor puede unirse a actina y fosforilarse, mediando fagocitosis de complejos inmunes y activación celular. Se encuentra en linfocitos, macrófagos inmaduros y en la línea celular J774. En macrófagos maduros y algunas células linfoides, la proteína carece de esa porción intracitoplasmática (Fcγ RII 2b) y se puede unir a clatrina asociada a vesículas, por lo que puede mediar endocitosis de complejos inmunes. Para realizar la fagocitosis de partículas opsonizadas, el receptor de los macrófagos que se ocupa es este tipo de receptor (Fcγ RII) (Kinet J. 1989, Fridman W. 1991, Odín J. 1991).
- c) *Grupo 3.* Por sus similitudes en estructura primaria, organización genómica, distribución celular y actividad biológica, el anteriormente conocido como muFcγ RIIα, ahora muFcγ RIII, así como el huFcγ RIII se reúnen en este grupo. Estos receptores se encuentran en neutrófilos, granulocitos, macrófagos, líneas parecidas a macrófagos y células asesinas naturales (NK), presentando baja afinidad por el ligando. Tiene afinidad por IgG1 e IgG3 de humano y por todas las IgG's de ratón, el orden de afinidad es IgG2b>IgG2a>1>>3. Los macrófagos murinos peritoneales expresan normalmente altos niveles de este receptor (Odín J. 1990, Ravetch J. 1991). Estudios en líneas celulares de tipo macrófago murino, así como en macrófagos peritoneales, reportan distintos resultados en cuanto a afinidad y especificidad de unión de los distintos isotipos

de IgG a sus receptores. No obstante se coincide en la unión de la clase IgG e IgE y la no unión de las clases IgM e IgA (Ravetech J. 1991).

Por otra parte existen otros receptores, los receptores para **Complemento**.

Las proteínas del Complemento presentes en el suero, son capaces de opsonizar partículas, las cuales son reconocidas e internalizadas vía receptores específicos para complemento. Los receptores para proteínas del complemento que median fagocitosis incluyen al receptor para complemento 1 (CR1), expresado en eritrocitos, células B, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y células dendríticas; receptor para complemento 3 (CR3, $\alpha_M\beta_2$ integrina, CD11b/CD18 o Mac1), que se encuentra en monocitos, macrófagos, neutrófilos, granulocitos, células dendríticas y células NK; receptor para complemento 4 (CR4, integrina $\alpha_X\beta_2$, CD11c/CD18 o gp150/95), el cual todavía no está bien caracterizado.

CR1 es una molécula transmembranal de una sola cadena con un tallo corto intracelular y un dominio largo extracelular. CR1 se puede unir a componentes del complemento como C1q, C4b y C3b, así como a MBL (Mannan-Binding-Lectin) (Giran I. et al 2000, Klickstein LB. et al. 1997). CR1 por sí solo no es capaz de mediar la internalización de partículas, necesita de señales adicionales, aunque ayuda de forma positiva a que se lleve a cabo la fagocitosis mediada por receptores Fc. Las integrinas CR3 y CR4 son heterodímeros que comparten una cadena β (β_2 , CD18) unida a cadenas alfa específicas para cada caso, α_M /CD11b para Cr3 y α_X /CD11c para CR4, y ambos receptores reconocen iC3b, pero al igual que CR1 estos receptores de complemento requieren de señales adicionales para mediar la internalización.

Cabe mencionar que existen otras moléculas que sirven como receptores, pero tienen un amplio espectro de unión con diferentes componentes de la pared celular de microorganismos, así como unión con distintas partículas.

Los **Receptores A (SR-A)** que son un homotrímero transmembranal con un gran dominio extracelular compuesto de una triple hélice de colágeno, el cual es expresado en macrófagos y se une a la bacteria completa así como a componentes de su pared

celular como el ácido lipoteicoico y lipopolisacáridos (Dunne DW. et al. 1994, Hughes DA. et al. 1995). Otro receptor de la clase A de los SR-A es el MARCO (macrophage receptor with collagenous structure), que también se sabe que participa en la fagocitosis de microorganismos, estos receptores se expresan de forma constitutiva en una subpoblación de macrófagos de la zona marginal del bazo. Este receptor se une a varias partículas incluyendo a bacterias Gram-negativas, bacterias Gram-positivas, partículas artificiales como el látex. Todavía no está claro si estos receptores participan en la fagocitosis de microorganismos, lo que sí está claro es que contribuyen a la unión, mientras que los receptores generan las señales de internalización (van der Laan LJ. et al. 1999).

Las células fagocíticas de mamíferos expresan una extensa variedad de Lectinas de superficie que median la detección de carbohidratos propios y extraños, y esos receptores cooperan en la detección de microorganismos, dentro de los cuales destacan; el receptor de manosa (se une a α -manosa) y dectina-1 (se une a β -glucanos), se ha demostrado que median fagocitosis de levaduras y de zimosan (una partícula de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Ezekowitz RA. et al. 1990, Brown GD. 2001)).

El receptor de manosa en macrófagos, es una proteína transmembranal de tipo I expresada en subpoblaciones de macrófagos así como en células dendríticas. La molécula Dectina-1 fue originalmente definida como un receptor específico de células dendríticas.

Por último otras moléculas que tienen función de receptores involucrados en la fagocitosis de patógenos opsonizados de forma inespecífica por fibronectina y vitronectina son las integrinas $\alpha_x\beta_1$ y $\alpha_v\beta_3$. Se ha observado en células polimorfonucleares, que la integrina $\alpha_v\beta_3$ activa fagocitosis mediada por receptores Fc así como la producción de reactivos intermediarios de oxígeno (Blystone SD. et al. 1999, Gresham HD. et al. 1990).

Receptores Fe:

FcγRI (CD64)
FcγRII (CD32)
FcγRIII (CD16)
FcεRI
FcεRII (CD23)
FcαRI (CD89)

IgG-, CRP-, partículas opsonizadas con SAP
IgG-, CRP-, partículas opsonizadas con SAP
IgG-, CRP-, partículas opsonizadas con SAP
Partículas opsonizadas con IgE
Partículas opsonizadas con IgE
Partículas opsonizadas con IgA

Receptores para Complemento:

CR1 (CD35)
CR3 (α_Mβ₂, CD11b/CD18, Mac1)
CR4 (α_Xβ₂, CD11c/CD18, GP 150/95)

Partículas opsonizadas con MBL-, C1q-, C4b-, C3b
Partículas opsonizadas con iC3b
Partículas opsonizadas con iC3b

Receptores para varias Integrinas:

α_sβ₁ (CD49c/CD29)
α_vβ₁ (CD49d/CD29)
α_vβ₃ (CD51/CD61)

Partículas opsonizadas con Fibronectina/Vitronectina

Receptores Scavenger:

SRA
MARCO

Bacterias, LPS, Ácido lipoteicoico
Bacterias

Receptor para Manosa (CD206)

Dectina-1

CD14

CD14R(P)

Manosa
B 1,3-glucanos
LPS, peptidoglicanos
C1q, MBL, SPA

* En humanos, FcγRIIA es un receptor fagocítico activador, mientras que FcγRIIB es un receptor inhibitorio. El ratón expresa solamente FcγRIIB. CRP: Proteína C Reactiva; SAP: Suero amiloide P.

- II) **Secreción de Factores que actúan sobre la regulación del Sistema Inmune:** Los macrófagos son los principales responsables en la producción de citocinas, los cuales tienen como objetivo amplificar la respuesta local a la infección. Las citocinas tienen como función el proteger al organismo de infecciones virales, pero al mismo tiempo, promover la reacción inflamatoria, con el fin de contrarrestar infecciones por microorganismos. Se les llama monocinas debido a que son producidas principalmente por células de la serie monocito – macrófago, cuya producción es estimulada cuando la célula reconoce microbios o sus componentes. Dentro de las monocinas producidas por macrófagos, las principales son la IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IFN α/β y TNFα (Frank M. et al. 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La IL-1 activa el endotelio vascular, linfocitos encargados de la destrucción local del tejido afectado, incrementa el acceso a la zona afectada de células efectoras. La IL-6 se encuentra involucrada a nivel local en la activación de linfocitos B para el incremento en la producción de anticuerpos. A nivel sistémico esta involucrada en la producción de fiebre así como en la fase aguda de síntesis de proteínas (Diehl S. 2002, Janeway C. 1999).

Los macrófagos producen TNF α en respuesta a la infección por virus o bacterias, así como al tener contacto con células extrañas y tumorales. Esta proteína actúa localmente dentro de la respuesta inflamatoria como un regulador autócrino y paracrino de leucocitos y células endoteliales, también activa neutrofilos, eosinófilos y fagocitos mononucleares. En respuesta a infecciones virales, esta molécula favorece la expresión de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I y clase II (MHC I y MHC II), aumentando así la lisis por parte de células citotóxicas de células infectadas por virus (Picker L. 1999).

III) Presentación de Antígeno a través de las moléculas clase I y clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC): Para que exista un sistema de defensa en contra de antígenos derivados de proteínas extrañas existen moléculas cuya función es presentar estos antígenos a células T, para que a su vez estas se diferencien en células T citotóxicas, T ayudadoras o cooperadoras, las cuales se encargarán de seguir amplificando la respuesta inmune así como de ejercerla. Los genes que codifican para las moléculas del MHC, tanto clase I como clase II, se encuentran agrupados de forma separada en el brazo corto del cromosoma 6 en humanos y en el cromosoma 17 del ratón. Las moléculas del MHC son glicoproteínas de superficie con una región de unión al péptido. En el caso de la molécula de clase I, esta es un heterodímero de una cadena α que atraviesa la membrana, asociada de forma no covalente a la β_2 – microglobulina que no atraviesa la membrana. La cadena α se pliega en 3 dominios: $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$. El dominio $\alpha 3$ y la β_2 – microglobulina poseen estructuras plegadas similares, mientras que los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ se pliegan juntos en una sola estructura que consiste en dos segmentos de hélices α colocados sobre una lamina de 8 hebras β

antiparalelas. El plegamiento de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ crea una larga hendidura, que es el sitio en que se unen los péptidos de los antígenos a las moléculas clase I del MHC. La molécula clase II está compuesta por dos glucoproteínas transmembranales, la cadena α que se divide en dos dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y la cadena β que también se divide en dominio $\beta 1$ y $\beta 2$. Los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$, al igual que el dominio $\alpha 3$ y la $\beta 2$ – microglobulina de la molécula de clase I, presentan similitudes estructurales y de secuencia con dominios constantes de inmunoglobulina. En la molécula de clase II los dominios que forman la región de unión al péptido están formados por cadenas diferentes y por tanto no forman una unión covalente.

Las moléculas de clase I se encuentran de forma constitutiva en la gran mayoría de las células nucleadas, en tanto que las moléculas de clase II solo se expresan en células presentadoras de antígeno como los linfocitos B, células dendríticas, macrófagos y células endoteliales, algunas citocinas como el IFN γ pueden modular de forma positiva la transcripción de los genes de clase I y II. Los linfocitos T CD8 $^+$ o citotóxicos, reconocen antígenos extraños que se encuentran asociados a moléculas de clase I y lisan a las células infectadas, por lo tanto proveen un importante mecanismo de defensa contra microorganismos intracelulares como los virus y algunas bacterias. Mientras que los linfocitos T CD4 $^+$ o cooperadores reconocen antígenos que se encuentran en vesículas endocíticas asociados a moléculas de clase II y amplifican la respuesta inmune por producción de citocinas que promueven la proliferación y diferenciación de los linfocitos T, linfocitos B y macrófagos.

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

Los resultados reportados acerca de la respuesta inmune a la infección por RSV en modelos experimentales como la rata de algodón y ratón indican que esta respuesta inmune es protectora, pero por otra parte a su vez ocasiona inmunopatología, principalmente en pulmón, esto tanto para la respuesta inmune celular como para la humoral (Alwan W., Record F. and Openshaw P. 1992).

Dentro de las observaciones que sugieren un efecto protector por parte de la respuesta humoral se cuentan:

1. Inmunidad conferida por anticuerpos maternos producen protección aunque parcial (Lamprecht CL. et al. 1976, Englund J. 1994).
2. Anticuerpos antivirales IgG, IgA e IgM (Nadal D. et al. 1990, Ananaba G. et al. 1991, Openshaw P. 1995^b) confieren a infantes protección parcial a la infección.

Con respecto a la Inmunidad celular también hay resultados que hablan de un efecto protector a la infección por RSV:

1. La deficiencia de células de tipo T CD4⁺ en ratones provoca una prolongada replicación del virus (Garofalo R. et al. 1996).
2. Se ha encontrado respuesta inmune predominantemente de tipo TH2 en infantes infectados con RSV (Roman M. et al. 1997), pero también respuesta de tipo TH1 asociada a la severidad clínica de niños con infección por RSV (Brandenburg AH. et al. 2000).
3. Las células T CD8⁺ se encuentran involucradas en la eliminación de células infectadas, principalmente durante la infección primaria por RSV (Nadal D. et al. 1990, Kulkarni A. et al. 1993a, Garofalo R. et al. 1996), así como también en la eliminación del RSV persistente en animales inmunodeficientes (Kimpfen J. et al. 1992).
4. El RSV se encuentra de forma persistente en pacientes cuya inmunidad celular es deficiente (Nadal D. et al. 1990, Openshaw et al. 1995^b).

Por otro lado también hay datos que sugieren daño por parte de la respuesta inmune, entre los cuales cabe mencionar el fracaso obtenido al intentar vacunar a niños durante los años 1966-1967 con virus inactivado por formalina, ya que los niños que recibieron la vacuna, presentaron cuadros más severos a la infección que los niños que no habían recibido la vacuna (Jeffcoate T. 1969, Kim H. et al. 1969, Kapikian A. et al. 1969). Originalmente se creía que este efecto se debía principalmente a la reacción de complejos inmunes, ya que también se involucraron a los anticuerpos de origen materno (Jeffcoate T. 1969, Nadal D. et al. 1990), pero a través de los años se ha encontrado que en realidad la causa fue la respuesta inmune de tipo celular lo que

provocó un excesivo proceso inflamatorio observado durante la infección con RSV. Con respecto a lo anterior, un hallazgo que apoya lo antes mencionado, es que la producción de IL-4, una interleucina de acción inflamatoria generada por células T CD4⁺ tipo TH2 se vio incrementada en la infección natural después de la vacunación (Anderson L. et al. 1994, Openshaw P. 1995^b). También se ha demostrado una respuesta eosinofílica inflamatoria in vivo debido a la liberación de citocinas de tipo TH2, proceso en el cual se encuentra involucrada la proteína G del RSV (Openshaw P. et al. 1995^b, Alwan W. et al. 1994), es interesante mencionar que recientemente se encontró que la proteína G tiene la capacidad de mimetizar la acción de quimiocinas de tipo CX3C, por lo cual se une a receptores para dicha quimiocina que se encuentran en células involucradas en la respuesta inflamatoria, por lo cual dicha proteína pudiera contribuir al cuadro inflamatorio provocado por la infección viral (Tripp R. et al. 2001). Utilizando el modelo murino se ha encontrado que la proteína M2 es la principal proteína viral involucrada en la inducción de células T CD8⁺ (citotóxicas) contra RSV, y estas células se encuentran involucradas en la respuesta inmunopatológica al RSV causando gran daño al pulmón principalmente durante la infección primaria (Openshaw P. et al. 1990, Kulkarni A. et al. 1993^b, Chang J. et al. 2002, Ostler T. et al. 2002). Otro aspecto importante dentro de la inmunopatología de la infección por RSV es la presencia de algunas citocinas como la IL-13 que se encuentra asociada a efectos patológicos, ya que se le involucra en el incremento de las respuestas alérgicas y en los procesos inflamatorios del tipo asma (Luckas N. et al. 2001). Las quimiocinas MIP-1 α (Garofalo R. et al. 2001, Haeberte 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 al reclutamiento celular. Así también se ha encontrado cierta relación entre el polimorfismo en los genes de algunas citocinas como IL-6 e IL-10 con la severidad y complicaciones de la infección por RSV (Gentile D. et al. 2003). El TNF α se ha asociado a los procesos inmunopatológicos causados por la infección de RSV mediante varios mecanismos, uno de los cuales indica que esta proteína pudiera incrementar la severidad de la infección mediante el incremento de la expresión de moléculas de adhesión en las venulas, induciendo la extravasación de las células en el pulmón. Otro mecanismo propone que la incrementada producción de TNF in vivo puede conducir a una muerte celular extensa del epitelio

respiratorio, proponiendo que el agregar anticuerpos anti TNF α puede aminorar la severidad de la infección en pacientes con cuadros de bronquiolitis (Hussell T. et al. 2001).

4. GENERALIDADES DE INFECCIONES VIRALES PERSISTENTES

Las infecciones virales pueden presentarse de dos formas, ya sea aguda o persistente, en el caso de la infección aguda la respuesta inmune del huésped controla la multiplicación del virus, los signos y síntomas desaparecen y es posible que el agente infeccioso sea eliminado. En cambio en la infección persistente, hay desaparición de signos y síntomas pero no va acompañada de la eliminación del agente infeccioso, el virus permanece en el organismo a pesar de que el huésped responde a la infección y por lo general la respuesta inmune es permanente (Ahmed R. et al. 1996, De la Torre C. et al. 1996). Las funciones vitales de la célula infectada deben continuar, y dicha célula no debe ser reconocida como extraña por parte de las células encargadas de la inmunovigilancia del sistema inmune. La estrategia generalmente utilizada para evadir la respuesta inmune consiste en regular la replicación viral, alterar la célula y seleccionar sitios poco accesibles al sistema inmune como el sistema nervioso, o más aún células del mismo sistema inmune como los macrófagos y linfocitos.

Para que se pueda establecer la persistencia, es necesario que exista un balance entre la expresión del genoma viral y las funciones vitales de la célula infectada, teniendo así, que tanto virus de DNA como de RNA que ocasionan infecciones con cuadros agudos, son capaces de originar infecciones persistentes (Ahmed R. et al. 1996, De la Torre C. et al. 1996). Por medio de modelos como el de murinos infectados con virus Linfo coriomeningitis (LCMV), se ha demostrado que para establecer y mantener la infección de tipo persistente, tanto el virus se modifica, en este caso, atenuando su infectividad, como también la célula altera sus funciones dispensables para su sobrevivencia. Es decir, los virus pueden infectar y permanecer en células sin destruirlas, pero producen cambios alterando las funciones y actividades específicas de cada tipo de célula (Ahmed R. et al. 1996, De la Torre C. et al. 1996).

5. INFECCIÓN AGUDA DE MACROFAGOS CON RSV

El efecto de la infección aguda por RSV sobre las funciones biológicas del macrófago se ha estudiado *ex vivo* en células humanas y de ratón (Arnold R. et al. 1995, Merolla R. et al. 1995, Becker S. et al. 1991, Midulla F. et al. 1993, Alwan W. et al. 1992, Openshaw P. 1995, Nadal D. et al. 1990) e *in vitro* en una línea similar a macrófagos (Sakai S. et al. 1997).

Los resultados obtenidos en diferentes sistemas coinciden en que la infección viral induce la síntesis de citocinas, dentro de las estudiadas se encuentran: IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) e Interferón alfa (IFN- α) (Arnold R. et al. 1995, Franke G. et al. 1995, Panuska J. et al. 1995, Sakai S. et al. 1997, Merolla R. et al. 1995, Becker S. et al. 1991, Crowe JE 1999, Midulla F. et al. 1993, Openshaw P. et al. 1995, Franke G. et al. 1995, Nadal D. et al. 1990). En cambio se observó disminución en la actividad fagocítica no mediada por receptores Fc γ R (Franke G. et al. 1995).

6. INFECCIÓN PERSISTENTE DE MACROFAGOS CON RSV

Con respecto a la infección persistente de RSV en macrófagos se tiene muy poca información, pero la suficiente como para darnos cuenta de que además de que el macrófago es una célula permisiva para la infección persistente por RSV (Sarmiento R. et al. 2002), también se ven alteradas las funciones de este. Por ejemplo, en un estudio realizado con una línea celular murina semejante a macrófagos (P388D1), infectada de forma persistente con RSV se observaron las siguientes alteraciones: (Guerrero A. et al. 2001)

- La Persistencia del RSV en macrófagos incrementa su actividad fagocítica mediada por receptores Fc γ .
- La Persistencia del RSV en macrófagos incrementa significativamente la expresión de receptores Fc γ RII/RIII en la membrana del macrófago.
- Incremento de la Producción de IL-1 β e IL-6 en los sobrenadantes de macrófagos persistentemente infectados con RSV.

- Disminución en la actividad citotóxica del $\text{TNF-}\alpha$ en los sobrenadantes de los macrófagos persistentemente infectados con RSV.
- La persistencia del RSV incrementa la expresión de las moléculas del MHC I en la superficie de los macrófagos persistentemente infectados con RSV.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro del curso natural de la infección por RSV destaca la participación del macrófago (Collins P. 1996). Las alteraciones observadas en estas células, después de la infección aguda por 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 a la continua exposición a antígeno de este virus en los alvéolos, lo que sugiere persistencia de RSV (Ostler T. et al. 2001).

Los macrófagos alveolares representan una población mayoritaria dentro de los alvéolos, y esta estirpe celular se encuentra involucrada en la respuesta inmune innata específica (Gendelman H. & Morahan P. 1992), por lo cual se decidió trabajar con una línea parecida a macrófagos, ya que estos, son buenos candidatos para que el RSV pueda persistir in vivo dentro del pulmón y además contribuir a la patología característica del RSV.

Ya teniendo evidencia de que la infección persistente por RSV altera al macrófago (Guerrero A. et al. 2001), nos enfocamos específicamente a una de esas alteraciones; el incremento de la expresión de receptores FcγRII y FcγRIII en la membrana del macrófago, el cual seguramente esta directamente asociado con el incremento en la capacidad fagocítica de dicha estirpe celular.

Lo que tratamos de definir en el presente trabajo es si este aumento en la expresión de receptores FcγRII y FcγRIII en la membrana del macrófago esta asociada a:

- a) Un efecto causado directamente por el virus (infeccioso o proteínas virales) que se encuentra infectando macrófagos en forma persistente.
- b) Por la inducción de algunos mediadores celulares de acción autócrina por parte de las células infectadas por RSV.

HIPÓTESIS

El incremento en la expresión de receptores FcγRII y FcγRIII en la membrana de Macrófagos Persistentemente infectados con RSV no esta asociado a la inducción de mediadores celulares secretados.

OBJETIVO

Determinar si el incremento en la expresión de Receptores FcγRII y FcγRIII en un modelo de persistencia viral in vitro, se debe a factores intra o extracelulares.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1. Confirmar la presencia del RSV en el modelo de macrófagos infectados persistentemente con RSV (Sarmiento R. et al. 2002).
2. Obtener sobrenadante del cultivo de macrófagos persistentemente infectados con RSV, así como de macrófagos infectados de forma aguda con RSV.
3. Determinar de forma comparativa la presencia de receptores Fcγ de macrófagos persistentes con células sin infectar así como con células infectadas de forma aguda.
4. Determinar de forma comparativa la expresión de receptores Fcγ de macrófagos expuestos a sobrenadantes con tratamiento de luz UV y sin tratamiento (UV) provenientes tanto de macrófagos infectados de forma persistente, como de macrófagos infectados en forma aguda con RSV.

MATERIAL Y METODOS

1. VIRUS

RSV cepa Long (ATCC VR-26)

Aislada por Chanok de un niño con infección aguda en el tracto respiratorio bajo en el año de 1963. Donado por el Dr. M. Trudel (*Instituto Armand Frappier, Ville de Laval, Canadá*). El virus fue propagado en células Vero y la infectividad viral fue determinada por efecto citopático (TCID₅₀) en células Vero.

2. LINEAS CELULARES

2.1 P388D1 (ATCC TIB 63)

Obtenida por Dwe y Potter, derivada de un neoplasma linfoides (P388) inducido en ratón DBA/2 (H-2^d) con metilclorantreno. Presenta características morfológicas y funcionales similares a las del macrófago (en lo sucesivo para fines prácticos a estas células las llamaremos MφN). Esta línea se obtuvo de la ATCC donada a nuestro laboratorio por el Dr. A. Tingle (*Universidad de Columbia Británica Vancouver Canadá*) y utilizada para establecer el cultivo persistente, al cual llamaremos MφP. El cultivo se propaga en medio RPMI/10 y una vez alcanzada la confluencia celular, la monocapa fue disociada por pipeteo.

2.2 MφP

Línea de macrófagos persistentemente infectados con RSV cepa Long. El cultivo fue previamente establecido y caracterizado en el laboratorio de Virología (Sarmiento R. et al. 2(10)2). Brevemente, el cultivo se obtuvo por infección de MφN a moi=1 con RSVLab, las células que sobrevivieron se propagaron en medio RPMI/10 y las células de este cultivo se mantuvieron a través de su propagación 2 veces por semana. Posteriormente la presencia del virus se ha monitoreado en forma rutinaria por medio de la detección de proteínas virales con

inmunofluorescencia indirecta, y amplificación del gen que codifica para la proteína N del virus a través de la transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

2.3 MφA

Línea de macrófagos infectados de forma aguda con RSV cepa Long propagado en el laboratorio, como se explica más adelante.

El cultivo se obtenía 24 hrs. antes de la realización de cada ensayo por infección de MφN a una $moi=3$ con RSVLab.

2.4 VERO (ATCC CCL 81)

Línea celular de fibroblastos de riñón de mono verde.

Estas células se propagaron en medio D-MEM.

3. CONTEO DE CÉLULAS

Las células fueron contadas con azul tripano teniendo en cuenta que las células viables tienen la habilidad de excluir el colorante, y este solo penetra en las células no viables (Payment P. & Trudel M., 1993 (b)). Una vez obtenida la suspensión celular que se va a contar, se mezclan 0.02ml de colorante azul tripano (1% en PBS) y 0.02ml de la suspensión celular. De la mezcla anterior se dispone una gota en una cámara de Neubauer con una micropipeta. Se cuentan las células no teñidas en cada uno de los cuatro cuadrantes en los que se divide la cámara. Las células viables por mililitro serán calculadas de la siguiente manera:

$$\text{Células/ml} = (\text{número de células totales} / 4 \text{ cuadrantes}) * (1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1})$$

Volumen

$$\text{Células/ml} = [(\text{número de células totales} / 4 \text{ cuadrantes}) * (1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1})] * 2$$

$$\text{Constante de la fórmula: } (1 \times 10^4 / 4) * 2 = 5000$$

$$(\text{Total de células contadas en las 4 cuadrantes}) * 5000 = \text{Células/ml}$$

Para obtener mayor precisión en nuestra cuenta se requiere obtener un promedio de los cuatro cuadrantes, es por eso que el total de células contadas se divide entre cuatro, para después

dividir entre el volumen de un solo cuadrante y multiplicar por el factor de dilución, que en este caso es 1:2, de ahí la constante que tiene el valor de 5000

4. HIBRIDOMA

2.4G2 (ATCC, HB 197)

El hibridoma se obtuvo fusionando células de mieloma P3UI 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 reconoce a los receptores FcγRII/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*).

5. PRODUCCIÓN DE VIRUS

Propagación de RSV.

La propagación de RSV se hizo en monocapas confluentes de células VERO. Las células fueron infectadas con el RSV a una multiplicidad de infección (m.o.i.) = 1.0, después de 2 horas de adsorción a 37°C/5% CO₂, el inoculo viral se retiró y fue reemplazado por medio D-MEM con 2% de suero fetal de bovino SFB inactivado a 56°C durante media hora (medio para infectar). La cosecha viral se realizó después de transcurridas 72 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 raspador de plástico para desprender las células aún adheridas después del pipeteo, posteriormente el sobrenadante se sonicó por 10 min. (sonicador Cole Parmer Ultrasonic Cleaner mod. 8846-50). Se centrifugaron por 10 minutos a 1500 rpm., los sobrenadantes se colectaron y se añadió MgSO₄ a una concentración de 0.1 M, esto para mantener la infectividad del virus (Fernie B. & Gerin J. 1982). Se distribuyó en alícuotas de 1ml conservándose a -70°C hasta su uso.

6. TITULACIÓN DE VIRUS PORTCID₅₀

La infectividad de los sobrenadantes recolectados durante la propagación del virus, así como los sobrenadantes obtenidos de macrófagos infectados de forma persistente y de forma aguda con RSV durante el desarrollo experimental del presente trabajo se determinó en monocapas de células VERO semiconfluentes, crecidas en placas de 96 pozos en medio D-MEM suplementado con 5% de SFB. Los pozos se infectaron con 50 μ l. de cada una de las diluciones seriadas 1:10 de la suspensión viral en medio para infectar (2% SFB) por cuadruplicado, el inóculo se dejó por 2 hrs. a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ para permitir la adsorción del virus, transcurrido el tiempo de adsorción el inóculo se sustituyó por medio para infectar (2% SFB). Las placas se incubaron hasta la observación de efecto citopático.

El título viral se expresó en TCID₅₀/ml y se determinó utilizando la fórmula de Kärber (Payment P. & Trudel M. 1993), de la siguiente forma:

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

A = log₁₀ de la última dilución donde el 100% de pozos presentaron efecto citopático.

δ = log₁₀ del factor de dilución.

S = suma de las fracciones que representan positividad de efecto citopático en la placa desde la última dilución que presenta el total de pozos con efecto citopático hasta la primera dilución en donde no se encuentra ningún pozo con efecto.

	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	Ctrl (-)	Ctrl (+)
A	+	+	+	+	+						+
B	+	+	+	+							+
C	+	+	+	+							+
D	+	+	+	+							+
E	+	+	+	+	+						+
F	+	+	+	+							+
G	+	+	+	+							+
H	+	+	+	+	+						+

Con efecto citopático

Sin efecto citopático

Usando los valores del esquema anterior, tenemos que:

$$A = -4$$

$$\delta = \log_{10} 10 = 1$$

S = 1.375 o la suma de:

$$-4: 8/8 = 1.000$$

$$-5: 3/8 = 0.375$$

$$-6: 0/8 = 0.000$$

$$1.375$$

Remplazando los valores en la ecuación:

$$\begin{aligned}
 \text{TCID}_{50} &= A - \delta(S-0.5) \\
 &= -4 - (1)(1.375-0.5) \\
 &= -4 - 0.875 \\
 &= -4.875 \\
 &= 10^{-4.875} / 50 \mu\text{l} \\
 &= 10^{4.875} / 0.050\text{ml}
 \end{aligned}$$

$$\text{TCID}_{50} = 1.499 \times 10^6 (0.7) = 1.04 \times 10^6 \text{ partículas virales/ml.}$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7. DETERMINACIÓN DE ANTÍGENO DE RSV POR INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA

Se dispusieron aproximadamente 1×10^5 células de los cultivos M ϕ N, Macrófagos infectados de forma aguda (M ϕ A) o M ϕ P en placas de 8 pozos (Nunc #177445) en medio RPMI/10. Una vez adheridas a la superficie de los pozos, las células fueron fijadas con 200 μ l por pozo de una solución de H₂O₂ al 2% en metanol [100%] por 20 minutos a temperatura ambiente. Las células una vez fijadas se lavaron con PBS/BSA al 1% y se incubaron con 100 μ l por pozo de anticuerpo anti-RSV hecho en cabra (Chemicon AB128), diluido 1:500 en PBS/BSA 1% 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/BSA 1% y se incubó nuevamente a temperatura ambiente por 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavó nuevamente y se adicionaron 100 μ l por pozo del sustrato (0.5 mg/ml de DAB en PBS + 5 μ l de H₂O₂). La reacción se detuvo después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente lavando con PBS/BSA 1% y se observó en un microscopio invertido para detectar las células marcadas con el anticuerpo anti-RSV revelado gracias al segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa.

8. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES Fc γ DE SUPERFICIE

La cuantificación de los receptores Fc para IgG expresados en la superficie de las células en estudio se realizó a través de ensayos de citometría de flujo utilizando el anticuerpo monoclonal de rata 2.4G2 (IgG2b) anti-Fc γ RII/RIII conjugado con FITC (Isotiocianato de Fluoresceína).

3×10^5 células de M ϕ N, M ϕ A o M ϕ P fueron teñidas con 2.4G2-FITC [545 μ g/ml] a una dilución 1:100 en PBS/BSA al 1% frío. Las muestras se incubaron durante 2 horas a 4°C en agitación constante. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces utilizando para cada lavado 500 μ l de PBS/BSA 1% frío. Las células se fijaron agregando un mililitro de una solución de

PFA recién preparado (PBS/PFA 4%) e incubando por 20 minutos a temperatura ambiente en agitación constante y cubierto de la luz. Después de lavar 3 veces nuevamente, las células fueron resuspendidas en un mililitro de PBS/BSA 1%.

Como controles se utilizaron también M ϕ N, M ϕ A o M ϕ P en 2 condiciones más, las cuales se describen a continuación:

- Control de infección por RSV: se realizó de la misma manera que la tinción para receptores solo que en este caso el anticuerpo utilizado fue una mezcla de anticuerpos monoclonales murinos purificados anti-RSV fluoresceinados (DAKO #K6102) a una dilución 7:100, para los tres tipos celulares M ϕ N, M ϕ A y M ϕ P.
- Control de Autofluorescencia: realizado de la misma manera que la tinción para receptores, solo que en este caso en ausencia de anticuerpo.

Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACScalibur, y los datos fueron analizados utilizando el software WinMDI (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry) versión 2.8. desarrollado por el The Scripps Research Institute.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de las diferencias entre los cultivos de macrófagos no infectados, macrófagos infectados de forma aguda así como los macrófagos infectados de forma persistente con RSV fue realizado aplicando una t de student para poblaciones que no presentan una distribución normal. Se aplicó esta prueba de tipo no paramétrico por tratarse de muestras independientes (controles y problemas) y por el tamaño de las mismas. La diferencia entre los valores fue considerada significativa con $p=0.05$.

RESULTADOS

1. CONFIRMACIÓN DE LA PRESENCIA DE RSV EN LAS CÉLULAS MΦP

En el presente trabajo se monitoreo la persistencia del RSV en el cultivo de MΦP, a través de ensayos de inmunoperoxidasa para detectar la presencia de antígeno viral en el cultivo a analizar durante las posteriores determinaciones de receptores, utilizando un anticuerpo policlonal anti-RSV y un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa. A lo largo de todo el estudio se obtuvo un porcentaje constante de células infectadas. Como control negativo se utilizaron células sin infectar (Figura 1a), como control positivo se utilizaron células infectadas de forma aguda con RSV (Figura 1b). Los resultados reflejan la obtención de un cultivo heterogéneo donde existe un porcentaje de células infectadas de aproximadamente un 75 a 80% (Figura 1)

Una vez confirmada la persistencia viral en los macrófagos del cultivo persistente infectado con RSV, se determinó la expresión de los receptores FcγRII/FcγRIII con la finalidad de determinar si la causa en el aumento de la expresión de dichos receptores se debe a una causa extrínseca o intrínseca a la(s) célula(s) infectadas con el RSV.

En todas las determinaciones, el comportamiento de las células persistentes (MΦP) se comparó con el de macrófagos infectados de forma aguda con RSV (MΦA) así como con macrófagos sin infectar (MΦN).

2. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES FcγRII/FcγRIII EN LA SUPERFICIE DE CÉLULAS PERSISTENTEMENTE INFECTADAS CON RSV.

Con la finalidad de investigar si el aumento de receptores FcγRII/FcγRIII ya reportado con anterioridad (Guerrero A. et al. 2001) se debe al agente viral (antígenos virales) dentro de

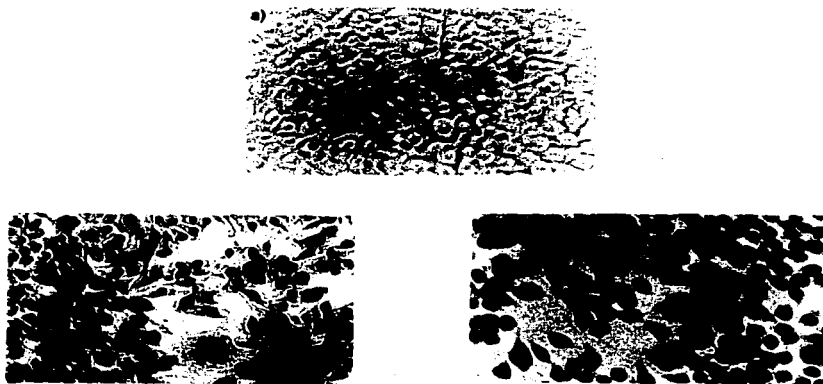


Figura 1. Inmunoperoxidasa Indirecta, mostrando la expresión de antígenos del RSV en el cultivo persistente. Células P388D1 persistentemente infectadas fueron crecidas en pozos de una placa de 96 y fijadas con metanol/ H_2O_2 , se utilizó un anticuerpo policlonal dirigido a las proteínas virales y un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. El panel a) corresponde a células P388D1 no infectadas utilizadas como control, panel b) corresponde a células P388D1 infectadas de forma aguda con RSV, y el panel c) corresponde a las células del cultivo RSV persistente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

virales) dentro de las células infectadas con RSV o a efecto de algún mediador secretado por las células infectadas con RSV, ya sea de forma aguda o persistente, se cuantificaron los receptores Fc γ RII/Fc γ RIII expresados en la superficie de células P388D1, infectados de forma aguda (M ϕ A), P388D1 infectados de forma persistente (M ϕ P). Se realizaron cinco ensayos por triplicado con el mismo pase (p64.1) del cultivo persistente a través de citometría de flujo por inmunofluorescencia directa, utilizando un anticuerpo monoclonal de rata (IgG 2b) marcado con FITC.

En los ensayos realizados se observó un incremento en la expresión de receptores en la superficie de las células infectadas de forma persistente (140 a 197%) y de células infectadas de forma aguda (18 a 23%) con respecto a células no infectadas, respectivamente. Este aumento se obtuvo tomando en cuenta los datos del factor correspondiente al promedio de la intensidad de la fluorescencia presentada por cada célula marcada. La población celular total analizada fue de 1×10^4 células para la lectura de cada muestra (Tabla 1), así mismo en la (Tabla 2) se señalan los porcentajes de células que presentan antígeno viral correspondientes a los ensayos de la (Tabla 1). Los promedios de intensidad de inmunofluorescencia fueron graficados en la Figura 2, donde se señalan los tres tipos de población analizados, así como la proporción del incremento ya antes mencionado, el cual fue estadísticamente significativo ($p=0.05$). Además en la Figura 3 se presenta un histograma representativo de cada experimento, donde se señala un desplazamiento de los histogramas correspondientes a las células persistentemente infectadas con RSV (M ϕ P), así como el desplazamiento de los histogramas correspondientes a las células infectadas de forma aguda con RSV (M ϕ A), los histogramas correspondientes a las células no infectadas (M ϕ N) sirvieron como control.

Tabla 1. Cuantificación de Receptores FcγRII/FcγRIII expresados en la superficie de células P388D1 sin infectar (MφN), P388D1 infectado de forma aguda con RSV (MφA) y P388D1 infectados de forma persistente con RSV (MφP). Determinados por inmunofluorescencia directa con un anticuerpo monoclonal de rata marcado con FITC en ensayos de citometría de flujo. Utilizando células P388D1 no infectadas (MφN) como control.

	M φ N	M φ A	M φ P	
1	Intensidad Fluorescencia *	3.92	4.65	9.55
	% Células marcadas *	93.6%	93.5%	99%
	% Incremento		18.6%	143.6%
2	Intensidad Fluorescencia *	4.44	5.31	11.08
	% Células marcadas *	84.5%	100%	68%
	% Incremento		19.5%	149.5%
3	Intensidad Fluorescencia *	2.42	2.99	8.88
	% Células marcadas *	76.75%	92.9%	99.3%
	% Incremento		23.5%	196.9%

- + Promedio de intensidad de inmunofluorescencia por célula analizada.
- % de un total de 10 000 células analizadas por muestra

Tabla 2. Determinación del Porcentaje de Células que presentan Antígeno Viral (RSV) en MφN, MφA y MφP. Determinados por inmunofluorescencia directa con una mezcla de anticuerpos monoclonales murinos marcados con FITC en ensayos de citometría de flujo. Utilizando células P388D1 no infectadas (MφN) como control.

	M φ N	M φ A	M φ P	
1	Intensidad Fluorescencia	0.18	2.38	7.03
	% Células marcadas *	0.25%	19.9%	91.5%
2	Intensidad Fluorescencia *	0.05	6.32	14.87
	% Células marcadas *	3.45%	76.9%	100%
3	Intensidad Fluorescencia *	0.28	2.22	6.37
	% Células marcadas *	4.64%	53.3%	92.9%

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

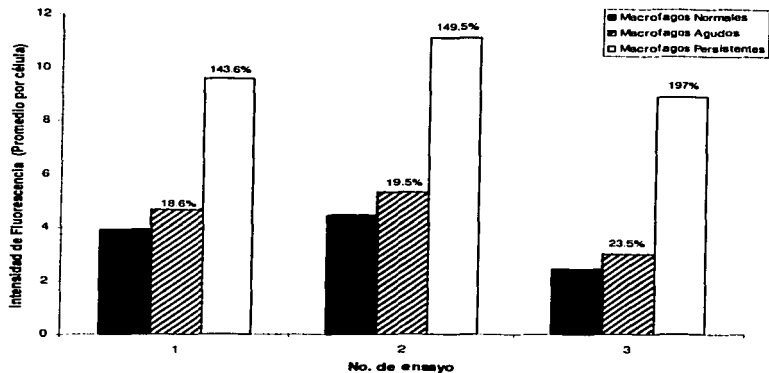


Figura 2. Cuantificación de receptores Fc γ RII/Fc γ RIII expresados en la superficie de células P388D1 sin infectar (M ϕ N), P388D1 infectados de forma aguda (M ϕ A) y P388D1 infectados de forma persistente (M ϕ P). Calculada a través del promedio de inmunofluorescencia presentada por célula en una población total de 10 000 células por muestra. Las barras oscuras representan las células sin infectar, las barras rayadas representan las células infectadas de forma aguda (M ϕ A), y las barras claras representan a las células infectadas de forma persistente (M ϕ P). Sobre cada barra se señala el incremento en intensidad de fluorescencia para cada tipo celular analizado con respecto a las células no infectadas (M ϕ N).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

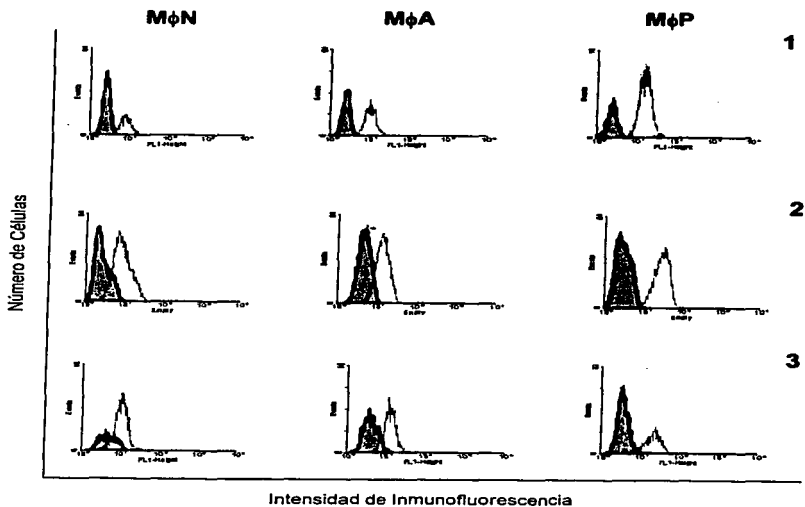


Figura 3. Expresión de receptores Fc γ RII/Fc γ RIII en la membrana de células P388D1 infectadas de forma aguda (M ϕ A), de forma persistente (M ϕ P) con RSV y macrófagos no infectados (M ϕ N). Determinada a través de citometría de flujo por inmunofluorescencia directa utilizando un anticuerpo monoclonal de rata marcado con FITC. De izquierda a derecha, los primeros tres histogramas de arriba hacia abajo corresponden a células sin infectar (M ϕ N), que se utilizan como control, los segundos 3 histogramas corresponden a las células infectadas con RSV de forma aguda (M ϕ A), y los últimos tres corresponden a las células infectadas de forma persistente con RSV (M ϕ P).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por otra parte, una vez cuantificados los receptores en la superficie de la membrana de macrófagos infectados de forma persistente (M ϕ P) y aguda (M ϕ A) se procedió a cuantificar los receptores expresados en la membrana celular de macrófagos expuestos a sobrenadantes provenientes de los M ϕ A y M ϕ P sometidos a radiación UV, con el fin de eliminar el virus replicativo que pudiera existir en esos sobrenadantes. No se observó cambio significativo en la cuantificación de receptores de macrófagos expuestos a sobrenadantes provenientes de M ϕ A y M ϕ P con respecto a macrófagos expuestos a sobrenadante de M ϕ N, bajo las dos condiciones anteriormente mencionadas (UV) (Tabla 3), señalando en cada caso el factor de incremento de expresión de receptores, utilizando a las células expuestas a sobrenadante de M ϕ N como control.

Tabla 3. Cuantificación de Receptores Fc γ RII/Fc γ RIII expresados en la superficie de células P388D1 expuestas a sobrenadantes sometidos y no sometidos a radiación UV obtenidos de cultivos de M ϕ N, M ϕ A y M ϕ P. Determinados por inmunofluorescencia directa con un anticuerpo monoclonal de rata marcado con FITC en ensayos de citometría de flujo. Utilizando células P388D1 expuestas a sobrenadantes de M ϕ N como control.

SN	IF: Sin Tratamiento	Factor de Incremento	Incremento	IF: Tratado con UV	Factor de Incremento	Incremento	
I	SN M ϕ N	-	-	2.71	-	-	
	SN M ϕ A	3.66	0.36	36	3.44	0.26	26
	SN M ϕ P	2.72	0.01	1	1.66	NI	NI
	SN M ϕ N	2.52	-	-	2.62	-	-
II	SN M ϕ A	2.81	0.11	11	3.3	0.25	25
	SN M ϕ P	2.61	0.03	3	2.43	NI	NI

NI: En estas determinaciones no hubo incremento.

IF: Intensidad de Fluorescencia.

SN: Sobrenadante

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los promedios de la intensidad de inmunofluorescencia fueron graficados en la Figura 4, donde se señalan los tres tipos de sobrenadantes a los que fueron expuestas las células analizadas, así como el cambio no significativo ya mencionado con anterioridad con respecto a la presencia de receptores en la superficie celular.

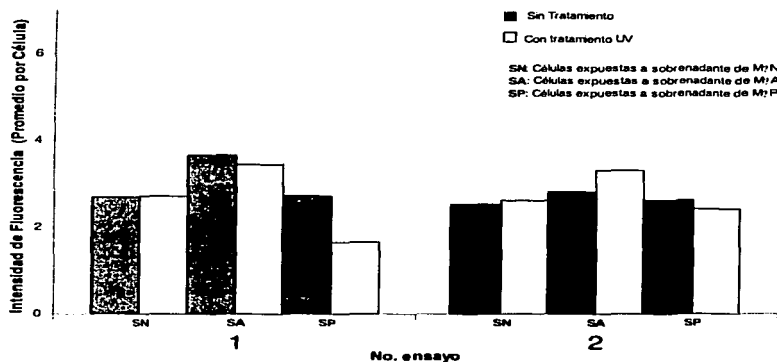


Figura 4. Cuantificación de los receptores Fc γ RII/Fc γ RIII expresados en la superficie de células P388D1 expuestas a sobrenadantes sometidos y no sometidos a radiación UV por 10 minutos provenientes de M ϕ N, M ϕ A y M ϕ P. Determinados a través del promedio de inmunofluorescencia presentada por célula en una población total de 10 000 células por muestra. Las barras oscuras representan las células expuestas a sobrenadantes sin ningún tratamiento, mientras que las barras claras representan a las células expuestas a sobrenadantes sometidos a radiación UV.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por ultimo se muestran dos histogramas representativos de cada ensayo donde se observa que no hay desplazamiento significativo en la intensidad de inmunofluorescencia producida por las tres poblaciones analizadas expuestas a sobrenadantes de M ϕ N, M ϕ A y M ϕ P. (Figura 5)

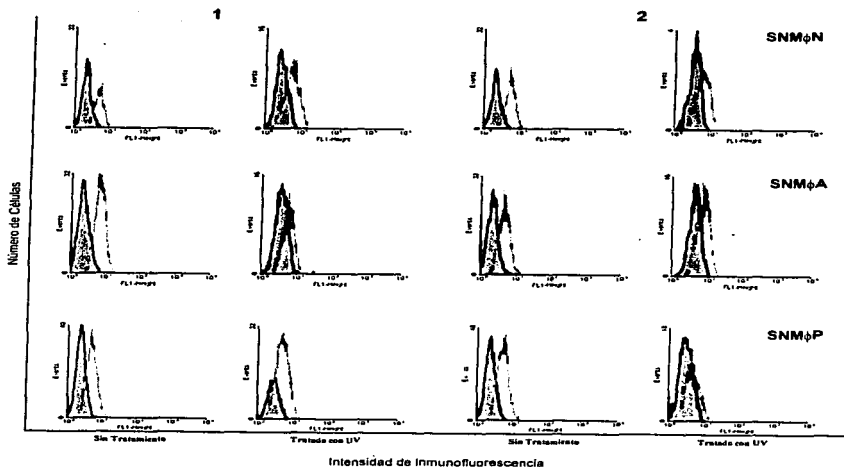


Figura 5. Expresión de receptores Fc γ RII/Fc γ RIII en la membrana de células P388D1 expuestas a sobrenadantes sometidos y no sometidos a radiación UV por 10 minutos provenientes de M ϕ N, M ϕ A y M ϕ P. Determinados a través de citometría de flujo por inmunofluorescencia directa utilizando un anticuerpo monoclonal de rata marcado con FITC. Los primeros cuatro histogramas de arriba hacia abajo corresponden a células sin infectar M ϕ N, que se utilizan como control, los segundos 4 histogramas corresponden a las células sometidas a sobrenadantes provenientes de M ϕ A, y los últimos cuatro corresponden a las células expuestas a sobrenadantes provenientes de M ϕ P. En el eje de las ordenadas se especifica si el sobrenadante fue o no sometido a radiación UV.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Resultados previos de nuestro laboratorio indican que la persistencia del RSV en macrófagos altera su actividad fagocítica mediada por receptores FcγRII y RIII así como la expresión de dichos receptores en la membrana celular (Guerrero A. et al. 2001). En este estudio realizado con el mismo cultivo de macrófagos infectados persistentemente con RSV, confirmamos estas observaciones y demostramos que el efecto está dado por factores intracelulares. Además a diferencia del estudio anterior, en el actual se incluyeron en los ensayos macrófagos infectados en forma aguda.

Las determinaciones de receptores en la superficie celular y la de antígeno viral en los macrófagos, se hicieron por medio de anticuerpos monoclonales y a través de ensayos de citometría de flujo. Con esta metodología es posible cuantificar en una población celular el porcentaje de células infectadas así como el de las que presentan receptores y determinar la densidad de los receptores en la membrana de la célula.

Nuestros datos muestran incremento significativo en la expresión de receptores en macrófagos infectados persistentemente respecto a células normales ($p=0.05$) e infectados en forma aguda ($p=0.05$), en cambio el incremento observado por macrófagos infectados en forma aguda respecto a macrófagos normales no fue significativo ($p=0.05$) a pesar de que en todos los ensayos observamos un aumento en receptores que varió de 18 a 23%. (Tabla 1).

En contraste, en macrófagos normales la densidad de estos receptores no se alteró significativamente por la incubación con sobrenadantes de cultivos de macrófagos infectados en forma aguda o persistente (Tabla 3). Los incrementos observados fueron del orden de 10 a 30% para sobrenadantes obtenidos de MφA y de 1 a 3% para MφP. Estos valores de incremento están en el rango de sensibilidad de la técnica y no se deben a infección por virus presente en los sobrenadantes, en estas suspensiones no se detectó virus infeccioso por TCID₅₀ (resultados que no se muestran). Además los incrementos no variaron al tratar los sobrenadantes con U.V. (Tabla 3).

Estas observaciones sugieren que productos celulares y/o virales intracelulares son los responsables del incremento observado.

Alteraciones en la expresión de receptores FcγR se han documentado durante la infección de macrófagos con HIV (Perez-Bercoff D. et al. 2003, Gilbody J. et al. 1997), tanto el incremento como la disminución se ha asociado a la regulación de la transcripción de la cadena y del receptor FcγRII y RIII (Daéron M. 1997). Nuestros datos no permiten establecer el mecanismo responsable del efecto observado, sin embargo es factible que en forma similar a la infección con HIV la persistencia del RSV induzca la expresión de las cadenas α y γ de los receptores. No obstante otros mecanismos no pueden descartarse como un transporte más eficiente de dichas cadenas a la membrana celular.

El aumento de receptores celulares para complejos inmunes tiene un efecto dual en la patógena de la infección, por una parte favorece la eliminación de patógenos por el macrófago y por otra la infectividad viral. La multiplicación de virus de RNA y DNA en macrófagos se ve incrementada por infección del complejo virus-anticuerpo a través de receptores Fcγ, a este fenómeno se le denomina incremento por el anticuerpo (Antibody-dependent enhancement) (Tirado SM. et al. 2003) y se ha reportado para RSV en células murinas y humanas (Jiménez B. 1990).

Con el diseño de nuestros experimentos no es posible en un mismo ensayo diferenciar en una población celular la expresión de receptores Fcγ entre células infectadas y normales. Esta diferenciación puede hacerse utilizando dos diferentes fluorocromos. (fluoresceína y rodamina) en ensayos de citometría de flujo, estudios con estos marcadores están en proceso. En los ensayos con macrófagos infectados en forma aguda la población no fue uniforme respecto a la infección viral, el porcentaje de células que presentaron antígeno fluctuó entre 20 y 77%. No obstante la fluctuación del porcentaje de células infectadas en los cultivos MΦA en los diferentes ensayos no invalida nuestros resultados como puede deducirse de los datos presentados en las tablas 1,2 y 3. En cambio en el cultivo infectado persistentemente la población mostró uniformidad (92-98%) respecto al porcentaje de células positivas al ensayo de antígeno de RSV.

Finalmente, es interesante mencionar que el modelo in-vitro utilizado en este reporte permite estudiar el efecto de la continua presencia del RSV sobre las funciones biológicas del

macrófago y descartar el efecto dado por la interacción del macrófago con otras células del microambiente dado en un sistema in-vivo.

CONCLUSIONES

1. La presencia del RSV en la línea celular parecida a macrófagos fue confirmada en las células del cultivo persistente.
2. El número de receptores FcγRII/RIII en la superficie de los macrófagos persistentemente infectados con el RSV fue más alto con respecto a los macrófagos infectados de forma aguda así como los macrófagos sin infectar.
3. El aumento de receptores FcγRII/RIII en la superficie de macrófagos infectados con el RSV se debe a factores intracelulares y no a factores extracelulares.

APÉNDICE

MATERIAL Y REACTIVOS.

Líneas celulares

Células P388D1, ATCC (TIB 63)

Células VERO, ATCC (CCL 81)

Virus

Virus Sincitial Respiratorio (RSV). Cepa Long (ATCC #VR-26)

Medios y suplementos para cultivo

D-MEM (GIBCO 12100-046)

RPMI 1640 (GIBCO 23400-021)

- Medio de Cultivo para las Células P388D1 (RPMI 1640-ME).
RPMI 1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 2.2 g/L de HEPES, 2.2 g/L de bicarbonato de sodio y 0.1% de 2-mercaptoetanol.
- Medio de cultivo para las células VERO.
D-MEM suplementado con 5% de SFB, 2.2 g/lit de HEPES, 2.2 g/lit de bicarbonato de sodio, 1% de L-glutamina.
- Suplementos.
 - Suero fetal bovino (GIBCO-BRL 10437-028)
 - HEPES (SIGMA H-0763)
 - Bicarbonato de sodio (PRODUCTOS QUÍMICOS MONTERREY 1290)
 - 2- Mercaptoetanol (BIO-RAD 161-0710)
 - L-Glutamina (SIGMA G-1517)

Reactivos y Soluciones

- NaCl (MERCK 6404)
- NaSO₄·7H₂O (MERCK 6649)
- NaH₂PO₄ (J.T. BAKER 790)
- MgSO₄ (J.T. BAKER 2500)
- NaOH (MERCK 6498)
- Azul Tripano (SIGMA T5526)
- Albúmina Sérica Bovina (SIGMA A-3350)
- Tripsina (SIGMA 1989)
- Paraformaldehído (SIGMA P6148)
- Dimetilsulfóxido (J.T. BAKER 9224)

- PBS

NaCl 8.0 gr

KCl 0.2 gr

Na₂HPO₄ 0.96 gr

KH₂PO₄ 0.2 gr

Se afora a 1 litro, se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza por autoclave.

- Solución de Albúmina al 1% en PBS

1 gr de Albúmina Sérica Bovina en 100ml de PBS

Anticuerpos y conjugados.

- Kit Anti-RSV conjugado con FITC (DAKO K6102)
- Anticuerpo policlonal de cabra anti-RSV (CHEMICON AB128)
- Anti-IgG cabra conjugado con peroxidasa (SIGMA A5420)
- Anticuerpo monoclonal de rata 2.4G2 anti-FcγRII/RIII (ATCC HB179) conjugado con FITC
- Anticuerpo monoclonal de ratón 2.4G2 anti-FcγRII/RIII (PHAR MINGEN 553141)

Material Desechable

- Portaobjetos de poliestireno de 8 pozos (NUNC Roskilde Denmark Cat no.177445)
- Botella para cultivo celular de 25 cm² (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 163371)
- Botellas para cultivo celular de 80 cm² (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 144881)
- Botella para cultivo celular de 150 cm² (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 147589)
- Cajas petri para cultivo celular 60 cm² (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 172931)
- Cajas petri para cultivo celular 100 cm² (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 172934)
- Placas de 96 pozos para cultivo celular (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 167008)
- Placas de 6 pozos para cultivo celular (COSTAR, Broadway, Cambridge Cat no. 3590)
- Tubos de poliestireno 12X75 mm para lectura FACS (FALCON, Cat no. 2054)
- Puntas para micropipeta
- 100-1000 µl (COSTAR, Broadway, Cambridge Cat no. 4867)
- 20-250 µl (RAININ Instruments, Cat no. RT-250)

BIBLIOGRAFÍA

Adair BM. and McNulty MS. Effect of "in vitro" exposure of bovine alveolar macrophages to different strains of bovine Respiratory Syncytial virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 30(2-3):193-206.

Adams D. (1992). Molecular basis of macrophage activation: Diversity and origins. In: *The Natural Immune System. The Macrophage.* Edited by C. Lewis. Oxford Univ. Press. pp.75-114.

Ahmed R., Morrison L. and Knipe D. (1996). Persistence of viruses. In: *Fundamental Virology.* 3rd 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. (1992). CD4⁺T cells clear virus but augment disease in mice infected with Respiratory Syncytial Virus. Comparison with the effects of CD8⁺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 macrophage like cell line. *J. Virol.* 65:5052-5060.

Anderson J., Serin M., Harrop M., Amin S., Toms G. and Scott R. (1989). Natural Killer Cell response to Respiratory Syncytial Virus in BALB/c mouse model. *Adv. Exp. Med. Biol.* 257:211-220.

Anderson LJ., Tsou C., Potter C., Keyserling HL., Smith TF., Ananaba G. and Bangham CR. (1994). Cytokine response to Respiratory Syncytial virus stimulation of human peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis.* 170(5):1201-8.

Arnold R., König B., Galatti H., Werchau H. and König W. (1995). Cytokine (IL-8, IL-6, TNF- α) and soluble TNF receptor I released 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.

Barik S. (1992). Transcription of human Respiratory Syncytial Virus genome RNA in vitro: requirement of cellular factor(s). *J. Virol.* 66:6813-6818.

Becker S., Quay J. and Soukun 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.

Behera K. A., Matsuse H., Kumar M., Kong X., Lockey F. R. and Mohapatra S. S. (2001). Blocking intracellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases Respiratory Syncytial Virus infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 280:188-195.

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. USA* 96:11259-11264.

Blystone SD. and Brown EJ. (1999). Integrin receptors of phagocytes. In: *Phagocytosis The Host.* Edited by S.Gordon. Stanford Cl:JAI. pp.103-147.

Brandenburg AH., Kleinjan A., van Het Land B., Moll HA., Timmerman HH., de Swart RL., Neijens HJ., Fokkens W. and Osterhaus AD. (2000). Type 1-like immune response is found in children with Respiratory Syncytial Virus infection regardless of clinical severity. *J Med Virol.* 62(2):267-77.

Bont L., Heijnen C., Kavelaars, van Aalderen W., Brus F., Draaisma J., Huelen 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.

Brown GD. and Gordon S. (2001). Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 413:36-37.

Burkreyev, A., Whitehead, S. S., Murphy, R. B. and Collins, L. P. (1997). Recombinant Respiratory Syncytial Virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and site specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. *J. Virol.* 71:88973-8982.

Cirino NM., Panuska JR., Villani A., Taraf H., Rebert NA., Merolla R., Tsivitsse P. and Gilbert IA. (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., P. L., K. McIntosh and R. M. Chanock. (1996). *Respiratory Syncytial Virus.* In: *Fields Virology.* Edited by Fields B. et al. Raven Press. New York. pp. 1313-1351.

Collins P. et al. (2001). *Respiratory Syncytial Virus.* In: *Fields Virology.* 4th edition. Edited by: Fields B. et al. Raven Publishers. Philadelphia. Chapter 45. pp. 1443-1485.

Crowe JE. (1999). Host responses to respiratory virus infection and immunization. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 236, 191-214.

Chang J. and Braciale TJ. (2002). Respiratory Syncytial virus infection suppresses lung CD8+ T-cell effector activity and peripheral CD8+ T-cell memory in the respiratory tract. *Nat Med.* 8(1):54-60.

Daëron M. (1997) *Fc Receptor Biology: Annual Review of Immunology.* 15:203-234.

David M. and Adrian O. (2002). Phagocytosis of Microbes: Complexity in Action. *Annu. Rev. Immunol.* 20:825-852.

De la Torre C. and Oldstone MB. (1996). Anatomy of viral persistence: mechanisms of persistence and associated disease. *Adv. Virus. Res.* 46:311-343.

Dickens L., Collins P. and Wetz G. (1984). Transcriptional mapping of human Respiratory Syncytial Virus. *J. Virol.* 52:364-369.

Diehl S. and Rincon M. (2002). The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol. Immunol.* 2002. 39 (9):531-6.

Dunne DW., Resnick D., Greenberg J., Krieger M and Jainer KA. (1994). The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:1863-1867.

Englund J. (1994). Passive protection against Respiratory Syncytial virus disease in infants: the role of maternal antibody. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 13:449-453.

Ezekowitz RA., Sastry K., Bailly P., and Warner A. (1990). Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J. Exp. Med.* 172:1785-1794.

Falsey A. and Walsh E. (1992). Humoral immunity to Respiratory Syncytial Virus infection in the elderly. *J. Med. Virol.* 36:39-43.

Fernie B. and Gerin J. (1982). The stabilization and purification of Respiratory Syncytial virus using MgSO₄. *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-Ullmann G., Pfortner C., Walter P., Steinmuller C., Lohmann-Matthes ML., Kobzik L. and Freiherst J. (1995). Alteration of pulmonary macrophage function by Respiratory Syncytial virus infection in vitro. *J Immunol.* 154(1):268-80.

Franke G., Freiherst J., Steinmuller C., Verhagen W., Hockertz S. and Lohmann-Matthes ML. (1995). Interaction of alveolar macrophages and Respiratory Syncytial virus. *J. Immunol. Methods.* 174(1-2):173-84.

Fridman W. (1991). Fc receptors and IgG binding factors. *FASEB J.* 5:2684-2690.

Fearnis 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.

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 expresión through the induction of the IFN- α and IL-1 α . *J. Immunol.* 157:2506-2513.

Garofalo R., Patti J., Hintz K., Hill V., Ogra P. and Welliver R. (2001). Macrophage inflammatory protein-1 α (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.

Gentile DA., Doyle WJ., Zeevi A., Piltcher O. and Skoner DP. (2003). Cytokine gene polymorphisms moderate responses to Respiratory Syncytial virus in adults. *Hum Immunol.* 64(1):93-8.

Gentile DA., Doyle WJ., Zeevi A., Howe-Adams J., Kapadia S., Trecki J. and Skoner DP. (2003). Cytokine gene polymorphisms moderate illness severity in infants with Respiratory Syncytial virus infection. *Hum Immunol.* 64(3):338-44.

Ghiran I., Barbashov SF., Klickstein LB., Tas SW., Jensenius JC. and Nicholson-Weller A. (2000). Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *J. Exp. Med.* 192:1797-1808.

Gilbody J., Lipman MC., Johnson MA., Atkins M. and Poulter LW. (1997). Progression of HIV disease is associated with increased expression of Fc gammaRI and CR1 on alveolar macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 107(1):31-6.

Greshman HD., Zheleznyak A., Mormol JS. and Brown EJ. (1990). Studies on the molecular mechanisms of human neutrophil Fc receptor-mediated phagocytosis. Evidence that a distinct pathway for activation of the respiratory burst results in reactive oxygen metabolite-dependent amplification of ingestion. *J. Biol. Chem.* 265:7819-7826.

CSO
FEB 14 1998
FEB 14 1998

Guerrero-Plata A., Ortega E. and Gómez B. (2001). Persistence of Respiratory Syncytial virus in macrophages alters phagocytosis and pro-inflammatory cytokine production. *Viral Immunol.* 14:19-30.

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 α in lung pathology. *J. Virol.* 75:878-890.

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.

Hughes DA., Fraser IP. and Gordon S. (1995). Murine macrophage scavenger receptor: in vivo expression and function as receptor for macrophage adhesion in lymphoid and non-lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* 25:466-473.

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.

Jeffcoate T. (1969). Vaccine against Respiratory Syncytial virus. *The Lancet.* 2:311.

Jeffrey V. (1990). Antibody-Mediated Endocytosis. In: *Fc Receptors and the action of antibodies.* Edited by H. Metzger. American Society of Microbiology, Washington D.C. pp.211-235.

Jeffrey V. (1997). Fc receptors. *Curr. Op. in Immunol.* 9:121-125.

Jeffrey V. (2001). IgG Fc Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 19:275-290.

J.E. Gessner. (1998). The IgG Fc receptor family. *Ann. Hematol.* 76:231-248.

Jiménez B. (1990) Antibody-mediated enhancement of Respiratory Syncytial virus infection. *Journal of Infectious Diseases.* 162:1211-15.

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.

Kimpfen 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.

Kinet J.P. (1989). Antibody-cell interactions: Fc receptors. *Cell* 57:351.

Klickstein L.B., Barbashov S.F., Liu T., Jack R.M. and Nicholson-Weller A. (1997). Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. *Immunity* 7:345-355.

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.* 67:4086-4092.

Kurt-Jones E.A., Popova L., Kwinn L., Haynes L.M., Jones L.P., Tripp R.A., Walsh E.E., Freeman M.W., Golenbock D.T., Anderson L.J. and Finberg R.W. (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 virus and their replication. In: *Fundamental virology 4th Edition* Edited by: Fields B. Raven Publishers. Philadelphia. pp689-724.

Lambert D., Pons M., Mbuy G. and Dorser K. (1980). *Nucleic Acids of Respiratory Syncytial Virus.* *J. Virol.* 36:837-846.

Lamprecht C.L., Krause H.E. and Mufson M.A. (1976). Role of maternal antibody in pneumonia and bronchiolitis due to respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* 134(3):211-7.

Lindsay J. and Oldstone M. (2001). Immune response to viruses. In: *Fundamental virology.* 4th edition. Edited by: Fields B. et al. Raven Publishers. Philadelphia. Chapter 11. pp. 285-320.

Lukaes 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.

Martínez I. and Melero J.A. (2000). Binding of human Respiratory Syncytial Virus to cells implication of sulfated cell surface proteoglycans. *J. Gen. Virol.* 81:2715-2722.

Merolla R., Rebert N.A., Tsviste T., Hoffmann S.P. and Panuska J.R. (1995). Respiratory Syncytial virus replication in human lung epithelial cells: inhibition by tumor necrosis factor α and interferon β . *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152:1358-1366.

Midulla F., Villani A., Panuska JR., Dab I., Kolls JK., Merolla R. and Ronchetti R. (1993). Respiratory Syncytial virus lung infection in infants: Immunoregulatory role of infected alveolar macrophages. *J. Infect. Dis.* 168:1209-1213.

Nadal D. and Ogra P. (1990). Development of local immunity: role in mechanisms of protection against or pathogenesis of respiratory syncytial virus infections. *Lung.* 168:379-387.

Neil A., Kathleen W., Lillian S., Thomas F. and Paul M. (1996). Type I (CD64) and type II (CD32) Fc γ receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *The Journal of Immunology.* 157:541-548.

Odin J. (1990). Fc receptors, a diverse and multifunctional gene family. In: *Cellular and molecular mechanisms of inflammation.*

Olchoway 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.

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. (1995). Immunopathological mechanisms in Respiratory Syncytial Virus disease. *Springer Semin. Immunopathol.* 17:187-201.

Openshaw P. (1995). Immunity and immunopathology to Respiratory Syncytial Virus. The mouse model. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 152:S59-S62.

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.

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.

Ostler T., Davidson W. and Ehl S. (2002). Virus clearance and immunopathology by CD8(+) T cells during infection with Respiratory Syncytial virus are mediated by IFN-gamma. *Eur. J. Immunol.* 32(8):2117-23.

Panuska JR., Cirino NM., Midulla F., Despot JE, Mc Fadden ER. and Huang YT. (1990). Productive infection of isolated human alveolar macrophages by Respiratory Syncytial Virus. *J. Clin. Invest.* 86:113-119.

Panuska JR., Merolla R., Rebert NA., Hoffmann SP., Tsivitse P., Cirino NM., Silverman RH. and Rankin JA. (1995). Respiratory Syncytial virus induces interleukin-10 by human alveolar macrophages. *J. Clin. Invest.* 96:2445-2453.

Payment P. and Trudel M. (1993). *Methods and Techniques in Virology*. Marcel Dekker, INC. N.Y. pp. 309.

Perez-Bercoff D., David A., Sudry H., Barre-Sinoussi F. and Pancino G. (2003). Fcγ receptor-mediated suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary human macrophages. *J. Virol.* 77(7):4081-94.

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.

P.K.S. Chan (1999). Epidemiology of respiratory syncytial virus infection among pediatric patients in Hong Kong. *Epidemiol. Infect.* 123:257-262.
Ravetch J. (1991). Fc receptors. *Ann Rev. Immunol.* 9:457-492.]

Roman M., Calhoun WJ., Hinton KL., Avendano LF., Simon V., Escobar AM., Gaggero A. and Diaz PV. (1997). Respiratory Syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th-2-like response. *Am J Respir Crit Care Med.* 156(1):190-5.

Sakai S., Ochiai H., Kawamura H., Kogure T., Shimada Y., Nakajima K. and Terasawa K. (1997). Contribution of tumor necrosis factor-α and interleukin -1β on the production of macrophage inflammatory protein-2 in response to Respiratory Syncytial virus infection in murine macrophage cell line RAW264.7. *J. Med. Virol.* 53:145-149.

Sarmiento RE., Tirado R. and Gomez B. (2002). Characteristics of a Respiratory Syncytial virus persistently infected macrophage-like culture. *Virus Reser.* 84:45-58.

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.

Sugrue RJ., 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.

Techaarpornkul S., Collins P. and Peeples ME. (2002). Respiratory Syncytial Virus with the fusion protein as its only viral glycoprotein is less dependent on cellular glycosaminoglycans for attachment than complete virus. *Virology.* 294:296-304

Tirado SM. and Yoon KJ. (2003). Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease. *Viral Immunol.* 16(1):69-86.

Trine H. and Soren R. (2001). Virus-cell interactions: impact on cytokine production, immune evasion and tumor growth. *Europ. Cytok. Netw.* 12(3):382-390.

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 der Laan LJ., Dopp EA., Haworth R., Pikkarainen T., Kangas M., Elomaa O., Dijkstra CD., Gordon S., Tryggvason K. and Kraal G. (1999). Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo.. *J. Immunol.* 162:939-947.

Wayde PR. (1998). Respiratory Syncytial Virus (RSV) disease and prospects for its control. *Antiviral Res.* 39:63-79.

Zimmer G., Budz L. and Herler G. (2001). Proteolytic activation of Respiratory Syncytial Virus fusion protein: cleavage at two furin consensus sequences. *J. Biol. Chem.* 276(34):31642-31650.