

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas**

**“EFECTO DE LA PERSISTENCIA DEL VIRUS  
SINCITAL RESPIRATORIO EN LA EXPRESIÓN DEL  
GEN DE LA INTERLEUCINA 8**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
PRESENTA

M en C ROCIO GABRIELA TIRADO MENDOZA

DIRECTORA DE TESIS DRA. BEATRIZ GOMEZ GARCIA

CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO, DF, JUNIO 2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## AGRADECIMIENTOS

A los miembros del comité tutorial:

Dra. Beatriz Gómez García, por su apoyo y guía en el desarrollo de mi proyecto doctoral y trayectoria académica.

Dr. Roberto Coria Ortega, por su amplia disponibilidad a escuchar y discutir mi trabajo aún fuera de tiempo.

Dr. Arturo Ortega Soto, por su valiosa participación en la discusión y desarrollo del trabajo, pero principalmente por brindarme un espacio abierto en su laboratorio, su confianza y su amistad.

A los miembros del jurado, Dra. Susana López Charretón, Dra. Beatriz Gómez García, Dr. Jaime Berúmen Campos, Dr. Eduardo García Zepeda, Dr. Luis Padilla Noriega, Dra. Ivonne Rosenstein Azoulay y Dr. Roberto Coria Ortega, por el tiempo brindado a la revisión del trabajo escrito y por sus valiosos comentarios que lo mejoraron en fondo y forma.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, por participar día con día en mi formación como estudiante y como profesional y por brindarme la oportunidad de seguir siendo hasta al día de hoy, parte de su comunidad.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado, Sudirección de Apoyo al Posgrado (PAEP98 y PAEP99), por el apoyo otorgado a este proyecto doctoral (clave 102373).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca para la realización del proyecto doctoral.

Al Sistema Nacional de Investigadores (SNI), por el apoyo otorgado durante mi periodo como CANDIDATO.

A los compañeros de la hemeroteca, Paty, Dan, Javier, Egbert y especialmente Rafa†, porque siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en la búsqueda de bibliografía.

Al Dr. Gustavo Pedraza Alva (Instituto de Biotecnología, UNAM), por su incondicional ayuda en la captura y análisis de resultados de citometría de flujo.

A la Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay, a quien agradezco especialmente sus críticas y comentarios tanto al trabajo experimental como a la tesis.

A la Bióloga Rashidi Springall del Departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” y al Dr. Felipe Vadillo del Instituto Nacional de Perinatología por su colaboración en las determinaciones de IL-1.

A la Dra. Yolanda López Vidal por escucharme y apoyarme a terminar con cada trámite del doctorado

Al Dr. Efraín Garrido Guerrero y a cada uno de los miembros de su laboratorio por su disponibilidad e incondicional apoyo durante mi estancia en CINVESTAV.

A los compañeros de laboratorio del Dr. Arturo Ortega Soto, quienes hicieron agradable mi estancia en CINVESTAV, Clara, Blanca, Anita, Martita, Moni, Alejandro, Jorge Cruz, Oscar, Roberto†, Alfredo, Yadira, Carlos Cabello, Roque, Citlalli y Alfonso, gracias por su compañerismo y amistad.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Enrique, Lino, Mirza, Laura, Nancy, Gerardo y Rosa Elena, gracias por acompañarme a lo largo de este trayecto que fue el doctorado.

A mis nuevos compañeros de laboratorio, Carla, Abel, Jorge y Carlos.

Un agradecimiento particularmente especial a Ignacio Palacios, Jesús Núñez, Consuelo Rodríguez y Margarita Ibarra por su invaluable ayuda en el laboratorio, pero sobretodo por su amistad.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento, por su colaboración incondicional en el desarrollo de este proyecto.

## DEDICATORIAS

*A mis Padres Arturo y Carolina, con todo mi amor, a quienes les agradezco por siempre su amor y apoyo incondicional y les dedico especialmente este trabajo porque junto conmigo han recorrido el camino hasta el final.*

*Con todo mi cariño para cada uno de los miembros de la familia Mendoza y de manera muy especial para los nuevos integrantes por inyectarnos una enorme dosis de amor y felicidad.*

*A la Fam. Valencia por haberme abierto de par en par las puertas de su casa y hacerme sentir parte de su familia*

*A mis amigos Mirza, Pablo, Olivia, Laura González, Laura Aguilar, Mayra, Edith, Guille y por supuesto el Lic. Díaz, muchas gracias por compartir conmigo tantos momentos y estar justo cuando me han hecho falta.*

*Al Dr. Rafael Romero†, un abrazo donde quiera que estés.*

*Al Dr. Jorge Mariné, por tu invaluable ayuda cuando más sola estuve.*

*A Rosa Elena Sarmiento, quien es y ha sido sinónimo de compañerismo, solidaridad, complicidad, y por sobretodo sinónimo de amistad, gracias por ser mi amiga y estar conmigo codo a codo a lo largo del camino.*

*A la pequeña princesa Ana Díaz Sarmiento con todo mi corazón.*

*A los pequeñines Díaz Sarmiento..... BIENVENIDOS!!!!!!!!!!!!*

***A mis compañeros favoritos, Armando, Eric y Saúl, va para ustedes una dedicatoria especial, por darle a mi vida un nuevo sentido, por llenarla de risas y gestos graciosos, por llenarla de nuevas y maravillosas experiencias y sobretodo por llenarla de amor.....los amo inmensamente.***

## INDICE

<b>I. RESUMEN</b>	1
<b>II. INTRODUCCION</b>	3
VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO (VSR)	3
IMPORTANCIA DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO EN INFECCIONES DEL TRACTO RESPIRATORIO	6
VSR y PERSISTENCIA	8
VSR: PATOGÉNESIS VIRAL Y REPUESTA INMUNE E INFLAMATORIA	11
CXCL8	12
GLICOPROTEÍNAS VIRALES: SU PARTICIPACIÓN EN LA PATOGÉNESIS VIRAL	16
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	21
<b>IV. HIPOTESIS</b>	21
<b>V. OBJETIVOS</b>	21
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	23
Células	23
Virus	23
Obtención de anticuerpos	26
Purificación de IgG's por cromatografía de afinidad	26
Determinación del título de anticuerpos neutralizantes (Microneutralización)	27
Anticuerpos monoclonales	28
Infección aguda en células A549	28
Infección persistente en células A549	28
RT-PCR del gen de CXCL8	35
Inactivación de la infectividad de cA549per y de cA549a	36
Precipitación de partículas solubles en cA549per	36
Inducción de la expresión del mRNA de CXCL8 en células A549norm por las fracciones sPEG y pPEG de cA549per	37
Determinación de CXCL8 extracelular	37
SDS-PAGE. Inmunoblot para proteínas del virus sincital respiratorio	39
Análisis estadístico	39
<b>VII. RESULTADOS</b>	41
Establecimiento del cultivo persistentemente infectado	41
Confirmación del cultivo persistentemente infectado	42
Efecto de la persistencia viral en la inducción de la interleucina 8 (CXCL-8)	49



Mediadores solubles presentes en el sobrenadante cA549per del cultivo persistentemente infectado como inductores de CXCL8	50
Efecto en la síntesis del mRNA de CXCL8 por tratamiento con luz UV o calor de los sobrenadantes cA549per	52
Participación de IL-1 $\alpha$ en la inducción de la síntesis del mRNA y de la proteína de CXCL8	54
Identificación de los componentes virales que participan en la inducción de la síntesis del mRNA de CXCL8	56
Inducción del mRNA y de la proteína de CXCL8 por la interacción de las glicoproteínas virales F y G solubles presentes en cA549per con su receptor	59
<b>VIII DISCUSION</b>	61
<b>IX CONCLUSIONES</b>	71
<b>X PERSPECTIVAS</b>	72
<b>XI APENDICE</b>	73
<b>XII BIBLIOGRAFIA</b>	78
<b>XIII ARTÍCULO</b>	97

## RESUMEN

La infección viral severa en los primeros años de vida se asocia a problemas pulmonares crónicos recurrentes como asma y enfermedad obstructiva crónica pulmonar, que se caracterizan por presentar procesos inflamatorios crónicos. El mecanismo responsable de la reacción inflamatoria del tracto respiratorio no está claro, sin embargo, es probable que citocinas proinflamatorias principalmente interleucina 8 (CXCL8) producidas en forma local por células (epiteliales, macrófagos y linfocitos) en respuesta a la infección viral, participen en la patología. Es probable que las células epiteliales del tracto respiratorio sean la fuente principal de CXCL8 ya que son el sitio primario de la infección y replicación viral.

En esta investigación nos planteamos como hipótesis de trabajo el hecho de que la cronicidad de los procesos inflamatorios pueda estar asociada a la continua producción y secreción de CXCL8 inducida por la infección persistente del VSR en células del epitelio respiratorio.

Para determinar el efecto del virus sincitial respiratorio sobre la expresión del gen de la interleucina CXCL8, se estableció un modelo *in vitro* de persistencia del VSR en la línea celular A549 epitelial alveolar de origen humano (A549per). Se determinó el efecto de la persistencia viral en la expresión del mRNA de CXCL8 en los cultivos por RT-PCR y la producción de la proteína por ELISA.

Los resultados obtenidos demostraron que la persistencia del VSR en los cultivos A549per indujo un incremento en la síntesis del mRNA de CXCL8, así como en la producción y secreción de la proteína. Además, se analizó el efecto del sobrenadante obtenido del cultivo A549per en la inducción de CXCL8 (mRNA y

proteína) en las células A549, mostrando un incremento en la expresión de mRNA de CXCL8 así como en la concentración de la proteína secretada, sugiriendo la participación de mediadores solubles en la inducción de CXCL8. Los sobrenadantes del cultivo A549 se analizaron por inmunoblot y se identificaron a las glicoproteínas virales F (fusión) y G (unión) como algunos de los mediadores solubles de la inducción e incremento en la síntesis del mRNA, producción y secreción de CXCL8

La inducción de la expresión de CXCL8 en células del tracto respiratorio por una infección persistente y por mediadores virales solubles puede representar uno de los factores involucrados en el proceso inflamatorio local asociado a la fisiopatología de VSR.

## INTRODUCCION

### I. VIRUS SINCITIAL RESPIRATORIO (VSR).

El VSR pertenece a la familia *Paramixoviridae*, subfamilia *pneumovirinae*. Es un virus envuelto con un diámetro entre 150 y 300 nm; su material genético consta de RNA no segmentado de una sola cadena, de polaridad negativa, de 15,385 nucleótidos; posee regiones no codificantes en el extremo 3' (leader) y en el extremo 5' (trailer). El RNA viral codifica para 11 proteínas, 9 estructurales y 2 no estructurales (1, 2).

El RNA viral codifica para 10 mRNA subgenómicos, todos tienen un solo marco de lectura, excepto uno de ellos que presenta dos marcos de lectura y por lo tanto codifica para dos proteínas. Al inicio de cada gen, en el extremo 3', se localiza una secuencia de inicio de la transcripción de 10 nucleótidos altamente conservada (3'-CCCCGUUUA), excepto para el gen L que codifica para la polimerasa viral y cuya señal es 3'-CCCUGUUUUA, cada gen termina con una secuencia de termino de la transcripción semiconservada de 12-13 nucleótidos que dirige la señal de poliadenilación "(UCA(A)UUUUUU<sub>4</sub>)/(UCA(A)AGAAAU<sub>4</sub>)" y la liberación del mRNA. Los primeros 9 genes están separados por regiones intergénicas variables de 1-56 nucleótidos y los dos últimos genes se traslapan por 68 nucleótidos (2, 3), (Fig. 1).

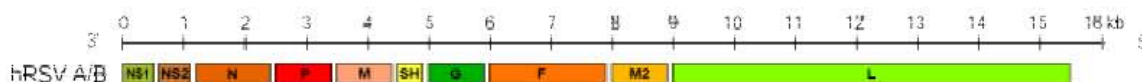


Fig.1: **Representación esquemática del genoma de VSR.** En los extremos 3' y 5', se localizan las regiones extragénicas de 40 a 60 nucleótidos de longitud, en las cuales se encuentran los elementos básicos del promotor viral. Los genes virales están representados por rectángulos y en cada uno de ellos se indica la proteína (s) para la cual codifican. NS1 y NS2 (proteínas no estructurales); N (Nucleocápside); P (fosfoproteína); M (Matriz); SH (proteína hidrofóbica pequeña); G (Proteína de unión); F (fusión); M2-1/M2-2 (proteínas estructurales pequeñas) y L (polimerasa viral).

El VSR contiene una doble capa lipídica, que se deriva de la membrana plasmática de la célula hospedera, ésta envoltura contiene 3 glicoproteínas virales, la de unión a la célula (**G**), la de fusión (**F**) y una pequeña proteína hidrofóbica (**SH**) cuya función aún no está clara (1). Cubriendo a la nucleocápside se encuentra la proteína **M** (matriz) y formando la nucleocápside están las proteínas **N** (nucleocápside), **P** (fosfoproteína) y **L** (polimerasa viral dependiente de RNA) (1). La proteína **M2-1** presenta un dominio de dedos de zinc en el extremo amino terminal, fundamental en su función como factor de anti-terminación de la transcripción en la síntesis del mRNA (4, 5, 6), además se une a la proteína N por lo que puede formar parte del complejo proteico N-P. Se sugiere que la proteína **M2-2** participa en la síntesis del RNA viral (7, 8) (Fig. 2). Las proteínas **NS1 y NS2** son no estructurales y aunque no se ha identificado su función, se sugiere que pueden participar en la regulación de la transcripción y replicación del genoma viral (9), además se ha reportado que interfieren con la actividad del interferón  $\alpha$  y  $\beta$  (10).

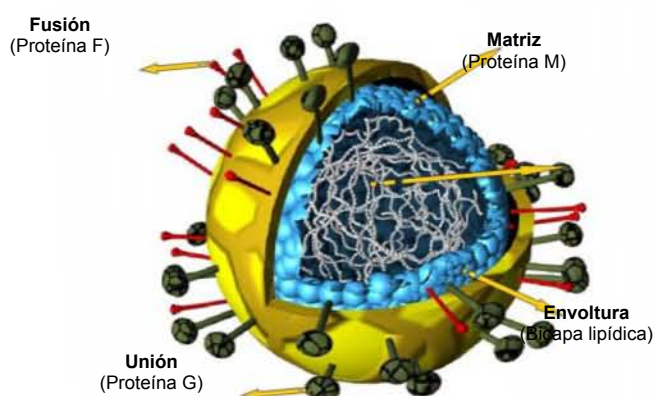


Figura 2. Diagrama esquemático de la estructura del RSV, en color amarillo se muestra la envoltura viral (proteínas G, F), en azul la matriz (proteína M) y en gris se representa la estructura del complejo ribonucleoprotéico (proteínas N, P y L asociadas al RNA viral) (<http://www.bio.warwick.ac.uk/easton/diagrams.htm>).

La diversidad antigénica de los diferentes aislados virales está determinada por la variación en las glicoproteínas F y G (11, 12) y con base en la diversidad genética de la glicoproteína G, el VSR se divide en dos grupos A y B (13, 14). La secuencia completa del genoma de los grupos A y B tiene el 81% de homología. La divergencia más grande se encuentra en el ectodominio de la proteína G, la cual tiene el 44% de identidad entre los dos grupos; dentro de un mismo grupo la secuencia de aminoácidos de la proteína G puede variar hasta en un 20% (15-17). Estos dos grupos circulan en la población, en una misma epidemia, siendo el de mayor prevalencia el grupo A. Sin embargo, la severidad de la enfermedad no se asocia preferentemente con alguno de los tipos virales en particular (1), más bien se asocia con el polimorfismo genético de la proteína surfactante A y D del hospedero (19-21).

## **II. IMPORTANCIA DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO EN INFECCIONES DEL TRACTO RESPIRATORIO.**

El VSR es considerado el principal agente etiológico de infecciones del tracto respiratorio inferior en niños menores de dos años (22). Este virus es altamente contagioso y es responsable de epidemias anuales, que se presentan principalmente durante el periodo invernal (diciembre-marzo). Durante las epidemias, el 50% de los niños menores de 18 meses de edad están infectados y presentan síntomas respiratorios (22, 23). En países desarrollados, aproximadamente la mitad de los niños menores de un año, han sido infectados por el VSR durante su primera temporada invernal (24, 25). Se estima que entre el 40 y 50% de niños hospitalizados con bronquiolitis y 25% de los casos de neumonía son consecuencia de la infección por VSR, dando lugar a un total de 100,000 admisiones hospitalarias

y anualmente se reportan 4500 muertes en Estados Unidos de América (EE.UU.) y cerca de 20,000 en el Reino Unido (25, 26). La tasa de mortalidad asociada al VSR es de aproximadamente 1% y se incrementa hasta el 3% en niños que además de infección respiratoria padecen hipertensión pulmonar, problemas congénitos cardiacos, inmunosupresión por tratamiento o que fueron sometidos a tratamiento quirúrgico (23-30). En México no existen reportes que señalen a VSR como principal agente etiológico de las enfermedades de las vías respiratorias inferiores (bronquitis, bronquiolitis y neumonía) en niños menores de dos años. Sin embargo, las infecciones agudas del tracto respiratorio bajo constituyen la primera causa de mortalidad infantil por enfermedades infecciosas en nuestro país (3318 defunciones, tasa 118.57 por cada 100,000 nacidos vivos registrados) [Fuente: Base de datos de defunciones INEGI/SSA, Dirección General de Información y Evaluación del Desempeño 2000 (31)].

La infección por VSR se inicia en la nasofaringe y por lo general se controla a ese nivel. No obstante, en gran parte de los infantes, el virus pasa al tracto respiratorio inferior e infecta los bronquiolos y alvéolos donde se presenta una respuesta inflamatoria que se asocia con la patología y la sintomatología de la enfermedad (32-35). Además, las infecciones severas del tracto respiratorio inferior durante la infancia constituyen un factor de riesgo en la edad adulta para el desarrollo posterior de padecimientos crónicos recurrentes de las vías respiratorias como asma y enfermedad obstructiva crónica pulmonar que se caracterizan por presentar procesos inflamatorios crónicos (32, 33, 36-43).

El mecanismo por el cual se induce la reacción inflamatoria no se ha determinado, sin embargo, es probable que citocinas producidas por células infectadas (epiteliales, macrófagos y linfocitos B) participen en la patogénesis viral

(44). En apoyo a esta interpretación, se tienen observaciones *in vitro* y *ex vivo* que demuestran que dichas estirpes celulares son permisivas al VSR y la infección induce la producción de citocinas proinflamatorias (45-53).

Estudios *in vivo* han demostrado en células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior (sitio primario de replicación de VSR), así como en células en tránsito como macrófagos alveolares y eosinófilos, que el VSR es un potente estimulador de la expresión y/o secreción de mediadores proinflamatorios e inmunomoduladores en células epiteliales del tracto respiratorio, eosinófilos y macrófagos (45, 46, 54-57). Además estudios realizados *in vitro* han demostrado que la infección por VSR induce la expresión de diferentes interleucinas (IL-) como IL-1, IL-6, IL-8/CXCL8, IL-10, IL-13, factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MCP-1/CCL2, TARC/CCL17, RANTES/CCL5, eotaxina/CCL11 e IFN- $\beta$  (48, 58-65).

### **III. VSR y PERSISTENCIA.**

Estudios epidemiológicos indican que la frecuencia y severidad de síntomas pulmonares como asma, reactividad bronquial y anormalidades funcionales pulmonares en adultos están asociadas con antecedentes de enfermedad severa por VSR durante la infancia (66). El mecanismo o mecanismos involucrados en la o las disfunciones respiratorias que persisten por periodos prolongados y posteriores a una infección respiratoria aguda aun se desconocen; sin embargo, se sugiere la persistencia de VSR como un factor predisponente en las enfermedades crónicas pulmonares (30, 34, 37, 38, 67, 68).

Aunque la persistencia del VSR en humanos no está claramente demostrada, una serie de observaciones lo sugieren: 1) el virus se ha aislado de la nasofaringe de niños aparentemente sanos (69); 2) el antígeno viral ha sido detectado en



osteoclastos y células de pacientes con la enfermedad de Paget (70-72); 3) en análisis post-mortem realizados a partir de tejidos de niños, se ha encontrado mRNA viral, durante los meses en los cuales no es posible aislar al virus; esto sugiere la persistencia, puesto que el humano es el único hospedero natural (1, 73); 4) constantes reinfecciones en niños y los casos reportados de bronquitis obstructiva crónica y bronquitis recurrente (74-76); 5) persistencia del virus en pacientes adultos enfermos de SIDA y en niños con inmunodeficiencias congénitas (1, 32) y 6) evidencia *in vivo* de infección persistente por el VSR en linfocitos de pacientes infantiles que adquirieron el virus en forma natural (77).

Igualmente la persistencia viral se ha reportado tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. *In vivo*: 1) en el modelo animal de cobayo se ha documentado que durante la infección por el VSR, es posible detectar la presencia del genoma y proteínas del virus en pulmón, aún después de que el cuadro agudo desaparece (78). Otros reportes señalan que es posible detectar la presencia del genoma del VSR hasta 6 semanas después de la infección y recuperar el virus infeccioso en presencia de altos títulos de anticuerpos (79, 80). 2). El modelo de ratón permitió evaluar el curso de la infección por VSR por 154 días, señalando al virus como responsable de un proceso inflamatorio crónico asociado a hiperreactividad respiratoria y a obstrucción respiratoria, signos que se presentaron después del cuadro de infección aguda.

*In vitro*: 1) En infecciones en células HEp-2 (humano), BS-C-1 (mono) y Linfocitos B (humano) se reportó disminución en la producción de virus extracelular con respecto a una infección aguda, no se observó muerte celular en estos cultivos y por inmunocitoquímica se detectó la presencia de antígenos virales en las células infectadas (81-84). 2) En células derivadas de embriones de ratones Balb/c infectadas persistentemente, se reportó un alto porcentaje de células que

expresaron antígeno viral y producción de virus infeccioso extracelular en bajos niveles (85). 3) Bangham *et al.* 1986 (83), reportaron la persistencia del VSR en una línea celular de origen linfoide (células B de linfoma de ratón), con resultados similares a los reportados por Fernie *et al* 1981 (85). 4) Otros reportes señalan el establecimiento de infección persistente por VSR en una línea similar a macrófagos (86) y 5) También se ha reportado la persistencia de este virus en líneas celulares de pulmón de origen humano H358 y A549 (87, 88).

Para el establecimiento de la persistencia viral de VSR, en la línea celular H358 fue necesario utilizar una suspensión enriquecida con partículas defectuosas. Las partículas defectuosas son mutantes que se producen durante pases seriados a altas multiplicidades de infección, son incapaces de multiplicarse sin la coinfección con el virus completo, pero durante la coinfección se enriquecen las partículas e inhiben la multiplicación del virus parental.

Las partículas defectuosas son capaces de interferir con la infectividad viral del virus parental. Los títulos de virus infeccioso son menores en una infección persistente de los que se encuentran en una infección aguda, y no se observa efecto citopático en las células persistentemente infectadas (86-88). El fenómeno de interferencia varía de un modelo viral a otro y puede ser por: incompetencia a nivel de adsorción o penetración, o por síntesis limitada de algunos productos virales (proteínas estructurales). Cuando las mutantes son por delección, éstas pueden variar grandemente, llegándose a encontrar mutantes donde sólo han cambiado 7 nucleótidos del extremo 3' del genoma viral (89), hasta aquellas en las que sólo se conserva el 5% del genoma original. Sin embargo, aún las partículas defectuosas más pequeñas deben retener las secuencias necesarias para su replicación y encapsidación (90).

Las partículas defectuosas se han reportado casi en todas las familias de virus animales. Aunque se han asociado principalmente con los virus de RNA, ya que estos presentan una alta tasa de mutación. Conjuntamente a esto, la recombinación entre homólogos y no homólogos permiten la generación de secuencias nuevas. Muchas mutaciones pueden ser deletéreas y eliminadas por selección natural, pero otras se seleccionan con base al ambiente particular en el que el virus se está replicando, de esta forma las mutaciones pueden ser dominantes en la población (91, 92).

#### **IV. VSR: PATOGÉNESIS VIRAL Y REPUESTA INMUNE E INFLAMATORIA.**

Estudios clínicos realizados en secreciones nasales de niños menores de seis meses de edad con infección respiratoria por VSR, mostraron una relación directa entre la eliminación del VSR y la aparición de anticuerpos secretores (IgA) (93). Estos resultados, demostraron la participación de la inmunidad de mucosas en el control de la infección por VSR (93). Asimismo, la administración de inmunoglobulina (IgG), con altos títulos de anticuerpos anti-VSR a niños con enfermedad cardíaca congénita o prematuros, demostró la participación de anticuerpos séricos (IgG's), tanto en el control de la infección, como en la re-infección por VSR (94). Sin embargo, es importante mencionar que el título de anticuerpos protectores tanto séricos como secretores, decae varios meses después de la infección, por lo que se considera a esta disminución como un factor de riesgo en las reinfecciones por VSR (95). La presencia de anticuerpos maternos circulantes clase IgG protege a los niños menores de dos años contra la infección del tracto respiratorio inferior por este virus. Esta observación se basa en estudios clínicos realizados en niños menores de seis meses, a los cuales se les determinó el título de anticuerpos maternos circulantes

anti-VSR, y se correlacionó el nivel de anti-VSR y la severidad de la enfermedad (96, 97). Por otro lado, la infección severa se presenta en los primeros meses de vida sugiriendo que en los neonatos afectados los títulos de anticuerpo son inferiores a los requeridos para protección (97).

La inmunidad humoral puede jugar un papel muy importante en la patogénesis de la enfermedad ya que los anticuerpos anti-VSR pueden facilitar la entrada y la infección por VSR en las estirpes celulares que expresen receptores Fc (efecto ayudador del anticuerpo), tales como macrófagos y linfocitos B (98, 99), favoreciendo la persistencia viral (100-102).

Estudios realizados en pacientes con deficiencia en la inmunidad mediada por células T, demostraron la participación de éstas células en la protección contra la infección por VSR, así como, el control en la excreción de virus (103, 104). En niños con infección por VSR se determinó la presencia de células T citotóxicas (CTLs) y su papel en el control de la enfermedad (105, 106). Asimismo en adultos se evaluó y se estableció la respuesta de estas células a diferentes proteínas virales como NS2, N, M, M2, F y SH siendo las inmunodominantes M2, F y N (107, 108). Sin embargo, en modelos animales se ha demostrado no solo la participación de la inmunidad celular (CD4+ y CD8+), en el control de la infección por VSR sino también su contribución a la patogénesis de la enfermedad (109-112). Diversos estudios señalan la participación de las células CD4+ (Th2) y de las citocinas que producen en la patogénesis por este virus.

Aún cuando el mecanismo asociado a la fisiopatología por VSR no se ha definido, el daño histopatológico característico de las vías respiratorias (inflamación, infiltrado celular y necrosis), es el resultado de un proceso multicelular en el que participan fundamentalmente células epiteliales, macrófagos, CTL's, eosinófilos,

basófilos y neutrófilos (54, 55, 68, 113-116). Además, la presencia de moduladores inflamatorios solubles en secreciones del tracto respiratorio, principalmente factores con actividad quimiotáctica (quimiocinas), sugieren su participación en la regulación de la migración y activación de leucocitos y, por lo tanto, su contribución al proceso inflamatorio en el pulmón (117, 118). Entre las quimiocinas con mayor participación en el proceso inflamatorio y en la patogénesis durante la infección por VSR, se han considerado a CXCL8, RANTES, MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$  y MCP-1 (54, 59, 61, 119-123).

El proceso inflamatorio en tracto respiratorio por una infección por VSR se ha asociado en gran medida al incremento en la secreción de CXCL8, por células del epitelio respiratorio (61). Existen evidencias experimentales en células del epitelio respiratorio nasal, obtenidas por raspado de donadores sanos (humanos), que indican a CXCL8, como la principal quimiocina producida y secretada en respuesta tanto a la infección por VSR como a inductores celulares proinflamatorios como IL-1 (61). Conjuntamente, estudios *in vitro* en células epiteliales bronquiales, demostraron que el tratamiento con IL-1 indujo un incremento significativo tanto en los niveles de mRNA como en la secreción de CXCL8 (124). La participación de IL-1 en la inducción CXCL8 se comprobó con el uso de drogas anti-inflamatorias como el nedocromil, la cual reduce en forma dosis-dependiente la producción de CXCL8 (124). Por otra parte, la utilización del recombinante del antagonista del receptor para IL-1 (rIL1Ra), bloquea la actividad de IL-1 en la inducción de CXCL8 (125).

## **V. CXCL8.**

Las quimiocinas, son citocinas denominadas de esta forma debido a su capacidad de inducción de la migración dirigida de células leucocitarias (126), las quimiocinas funcionan como una clase de mensajero intracelular, que se encargan

de la movilización de células inflamatorias hacia la zona infectada, por lo que son consideradas como fundamentales en los procesos inflamatorios dentro de los mecanismos de defensa del hospedero (127).

Los miembros de la superfamilia de las quimocinas están estructuralmente relacionados, presentan del 20 al 70% de homología en su secuencia aminoacídica (128) y tienen un motivo de 4 cisteínas altamente conservado en su estructura primaria (129-131). Los cuatro residuos de cisteína altamente conservados y localizados cerca de la región amino terminal de estas proteínas, forman dos puentes disulfuro, el primero de ellos entre Cys1-Cys3 y el segundo Cys2-Cys4 (129, 132). Aun cuando estructuralmente están altamente relacionados, los miembros de esta familia pueden subdividirse en cuatro grupos de acuerdo a la posición de las cisteínas: a)  $\alpha$ -quimocinas (CXC), los miembros de esta familia se caracterizan por presentar un aminoácido intermedio entre las dos cisteínas; b)  $\beta$ -quimocinas (CC), en este caso los dos residuos de cisteína son contiguos; c) C (linfotactina), este grupo consta de un solo miembro que presenta una cisteína única en su región amino terminal y d) CX<sub>3</sub>C (Fractalcina o neurotactina), en este caso los dos primeros residuos de cisteína están separados por tres aminoácidos (128, 129).

Las  $\alpha$ -quimocinas (CXC) pueden a su vez ser subdivididas en dos subgrupos. En el primero, se incluyen aquellas que presentan una secuencia *glutámico-leucina-arginina (ELR)*, localizada en la región amino terminal de la proteína y precediendo a la secuencia CXC y en el segundo, se encuentran aquellas que carecen de la secuencia **ELR** (128, 129). La diferencia funcional entre estos dos subgrupos se basa en que aquellas que presentan la secuencia **ELR** ejercen quimiotaxis principalmente sobre neutrófilos y las carentes actúan mayoritariamente sobre linfocitos (128).

Las quimocinas son sintetizadas por una gran variedad de estirpes celulares, como es el caso de CXCL8 (alfa-quimocina), la cual es secretada por células inflamatorias, leucocitos, plaquetas, fibroblastos, células endoteliales y células epiteliales (126). La expresión de las citocinas es casi nula en células en reposo, pero ante un estímulo que induzca su síntesis los niveles de mRNA sobrepasan el 1% del RNA celular total (126). En el caso de infecciones virales se ha observado que el influxo de células inflamatorias a la zona afectada, particularmente linfocitos y monocitos, constituye un evento representativo o característico de una infección de este tipo (1, 130-133).

La participación de la CXCL8 en el reclutamiento celular tiene dos funciones principales, la primera, facilita la interacción y unión de células leucocitarias (granulocitos, monocitos y linfocitos T) al endotelio a través de cambios conformacionales en las moléculas de adhesión LFA-1 y CR3 (134, 135), y la segunda regula la migración de células granulocíticas y monocíticas a favor del gradiente de concentración de CXCL8 en la zona infectada, además de activar el estallido respiratorio en neutrófilos (116, 136).

Estudios realizados *in vitro* con la línea celular (A549, células alveolares de pulmón de origen humano), han demostrado que durante la infección con VSR se incrementa de 4 a 10 veces la expresión del gen de CXCL8, así como, la producción de la proteína (60, 137-139). Este incremento dosis-dependiente está en relación directa con la replicación viral ya que cuando la infectividad del virus es inactivada por tratamiento con luz UV o por calor, la inducción de la síntesis de CXCL8 se abate hasta valores equivalentes a los de células normales sin infectar (137, 139, 140). Este mismo resultado se obtuvo utilizando un inhibidor de la replicación viral como la ribavirina (141). Sin embargo, estos resultados no coinciden con lo

reportado por otros autores, quienes demostraron que la infectividad del VSR no es indispensable para la inducción de la síntesis de CXCL8 (136, 137).

## **VI. GLICOPROTEÍNAS VIRALES: SU PARTICIPACIÓN EN LA PATOGÉNESIS VIRAL**

De las once proteínas virales codificadas por el genoma de VSR, las glicoproteínas G y F son las responsables de la unión y fusión del virus a su célula blanco, respectivamente (142). La proteína G se presenta en dos formas, una anclada a la membrana (G<sub>m</sub>) y otra soluble (G<sub>s</sub>) (143). Aproximadamente el 15% de la proteína G sintetizada es G<sub>s</sub>, la cual carece de los 65 aminoácidos del extremo amino terminal, que corresponde a la señal de anclaje a la membrana celular (143, 144). La síntesis de ambos tipos de proteína es una característica que se conserva en todas las cepas de VSR, lo que sugiere que la producción de G<sub>s</sub> es un factor importante en la “funcionalidad” del virus (145).

La proteína G se ha asociado a procesos inflamatorios lo que contribuye a la patogénesis de la enfermedad (146). Estudios realizados en ratones han demostrado que la glicoproteína G modifica el patrón de quimiocinas (146). En este modelo *in vivo*, se encontró un incremento en la expresión del mRNA de MIP1 $\alpha/\beta$ , MIP-2, MCP-1 y RANTES, en células broncoalveolares después de una infección aguda (146). Estos datos coinciden con lo observado en niños con bronquiolitis asociada a VSR (146). La modificación del patrón de expresión de quimiocinas (146), por la proteína G, trae como resultado una alteración en el reclutamiento de leucocitos en el pulmón (146, 147). Principalmente, el incremento de eosinófilos en pulmón, así como, su activación y producción de citocinas contribuyen significativamente a la patogénesis del proceso inflamatorio durante la infección por



VSR (146, 147). Además, se ha demostrado en modelos murinos que la inmunización con la Gs induce eosinofilia asociada a un incremento en la producción de citocinas como IL-4, IL-5, IL-13 y eotaxina (147).

La infección del epitelio respiratorio por VSR inicia con la interacción de las glicoproteínas virales con los glicosaminoglicanos de matriz extracelular; sin embargo, en el proceso de unión virus-célula, principalmente participa el dominio de unión a heparina presente en la proteína G. Además del dominio de unión a heparina, la proteína G presenta una región central no glicosilada rica en cisteínas que va del aminoácido 182 al 186 cuya característica principal es su analogía a la quimiocina CX3C (fractalcina), lo que permite la unión de la proteína G al receptor CX3CR1 (148). Esta analogía estructural facilita la infección por VSR y altera: (1) el tráfico de células CXCR1<sup>+</sup>, como linfocitos T, células NK, monocitos, macrófagos (148); (2) la respuesta inmune tipo Th1 y de células NK mediada por CX3C y (3) el patrón de expresión de citocinas y quimiocinas (149).

Recientemente, se han reportado otras dos moléculas como posibles receptores para VSR, ambas interactúan con el dominio similar a heparina de la proteína G. La primera de ellas es la molécula de adhesión L-selectina (142) y la segunda es la anexina II, molécula que se expresa en la superficie de células endoteliales y epiteliales (principalmente respiratorias y urinarias) (142, 150). La interacción virus-célula mediada por este tipo de receptores puede estar también asociada a la inducción de citocinas y quimiocinas. La glicoproteína F es sintetizada como un precursor inactivo de fusión (F0), el cual es modificado postraduccionalmente por la adición de N-oligosacáridos (151). El precursor F0 es procesado proteolíticamente por una endoproteasa celular con actividad de tripsina (furina), el resultado de este corte genera dos subunidades F1 y F2 unidas por

puentes disulfuro (151). Además, se ha descrito una forma soluble de esta proteína que es posible detectar en el medio extracelular (152).

Se han descrito diferentes moléculas celulares que interactúan con la proteína F y que pueden participar como receptores extracelulares. La primera de ellas es RhoA, proteína esencial en el hospedero con actividad de GTPasa que participa en una gran variedad de funciones básicas celulares como: ciclo celular, transcripción, transporte de vesículas, adhesión, morfología y motilidad (153), y se expresa en todos los tejidos; aunque mayormente en pulmón, riñón y bazo (154). La expresión diferencial de esta proteína en pulmón es muy importante durante la infección por VSR, ya que la señalización mediada por esta proteína, está asociada con eventos celulares que participan en la patogénesis de la infección (153, 154). La interacción entre F y RhoA, involucra la región comprendida entre los aminoácidos (a.a) 146 al 155 de la proteína F, subunidad F1, y del a.a. 67 al 110 de la proteína RhoA (155); esta región de RhoA es importante para la interacción de diversos efectores celulares localizados corriente abajo de esta molécula y que regulan múltiples procesos celulares. La interacción de RhoA con la proteína F puede activarla y así estimular las funciones efectoras mediadas por ésta, tales como: (1) fosforilación de miosina de cadena ligera, la cual induce contracción del músculo liso en bronquiolos (hiperreactividad), evento importante en pacientes asmáticos (156, 157), y/o (2) expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL1, IL-6 y CXCL8. También, durante la infección por VSR, hay un incremento de la expresión de RhoA lo que facilita la entrada y la fusión celular (152, 158). Estos eventos se suman a otros ya descritos que también contribuyen a la patogénesis por VSR (158).

Como otros posibles receptores para la proteína F se han descrito a TLR-4 (ratones) y CD14 (monocitos humanos de sangre periférica) (159). Recientemente

se ha demostrado que la proteína F participa en la inducción de citocinas proinflamatorias a través de su interacción con éstas moléculas y es probable que su activación contribuya a la patogénesis de la infección por VSR (159). La tercera molécula propuesta como receptor para la proteína F es ICAM-1, molécula de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresa en células epiteliales (160). Además, se ha demostrado que el resultado de la interacción ICAM-1 con la proteína F es la inducción de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6,  $TNF\alpha$ ) y quimiocinas (CXCL8, RANTES) (160), las cuales pueden contribuir a la severidad de la enfermedad.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La cronicidad de los procesos inflamatorios en las vías respiratorias puede estar asociada a una continua producción y secreción de CXCL8 inducida por la infección persistente del VSR en células del epitelio respiratorio. Para responder esta pregunta se estableció un cultivo persistente con VSR en una línea celular epitelial alveolar de origen humano (A549). Este cultivo fue el modelo *in vitro* utilizado para determinar el efecto de la persistencia del virus en la inducción, producción y secreción del mRNA y de la proteína de CXCL8.

## **HIPOTESIS**

Componentes virales extracelulares producidos durante una infección persistente de VSR en células epiteliales regulan la producción continua de CXCL8.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar si la persistencia de VSR induce la expresión continua de la proteína de CXCL8 en líneas celulares alveolares humanas.

### **Objetivos Particulares**

1. Investigar si VSR origina infección persistente en la línea celular epitelial humana A549.
2. Comparar la inducción de la expresión del mRNA de CXCL8 en cultivos persistentemente infectados, en células A549 infectadas en forma aguda y en células A549 normales.
3. Determinar la participación de componentes virales producidos y secretados durante la infección persistente en la inducción de CXCL8.
4. Identificar las proteínas virales involucradas en la inducción de CXCL.

## **2. MATERIAL Y METODOS**

### **2.1 Células.**

Células VERO (fibroblastos de riñón de mono verde), adquiridas de ATCC CCL-81 (American Type Culture Collection), se propagaron en medio mínimo esencial Dulbecco modificado (DMEM, GIBCO), suplementado con 5 % de suero bovino fetal (SBF, GIBCO) inactivado a 56°C durante 30 minutos y glutamina (GIBCO) a una concentración final de 2mM, al cual denominaremos DMEM completo (DMEM<sub>C</sub>).

Células A549, línea celular humana similar a células epiteliales alveolares tipo II, ATCC CCL-185 donada por el Dr. A. Brassier (Department of Pediatrics, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas), se propagaron en DMEM<sub>C</sub>.

### **2.2 Virus.**

En este trabajo se utilizó la cepa Long del Virus Sincitial Respiratorio (VSR) ATCC VR-6, donada por el Dr. Michael Trudel (Instituto Armand Frappier, Ville de Laval, Canadá).

#### **2.2.1 Propagación del Virus**

Monocapas de células VERO semiconfluentes propagadas en botellas de 180 cm<sup>2</sup> se infectaron con VSR, cepa Long, previamente purificado por placa (2 veces en células VERO), a una multiplicidad de infección (moi) de 1 en DMEM suplementado con 2.5% de SBF y glutamina (2mM), al cual denominaremos DMEM para infectar (DMEM<sub>i</sub>). Después de dos horas de adsorción a 37°C, se retiró el sobrenadante y se reemplazó con DMEM<sub>i</sub>. A las 48 horas post-infección los sobrenadantes de células infectadas se colectaron y se clarificaron por centrifugación a baja velocidad (1500 rpm) durante 10 minutos a 4°C. Para estabilizar la infectividad del virus se añadió MgSO<sub>4</sub> a una concentración final de 0.1 M (161) y se almacenó a -70°C.

## 2.2.2 Titulación de la infectividad viral en células VERO

Por TCID<sub>50</sub> (del inglés: Tissue culture infectious dose affecting 50% of the cultures, dosis infectiva media). La suspensión viral se diluyó en serie 1:3 en DMEM<sub>i</sub> (35 µl/105 µl) y se utilizaron 50 µl de cada dilución para infectar monocapas semiconfluentes de células VERO, cultivadas en placas de 96 pozos y después de dos horas a 37°C se retiró el inóculo y se reemplazó por 150 µl de DMEM<sub>i</sub> y se incubó por 72 horas. Cada ensayo se realizó por cuadruplicado y el título se determinó por TCID<sub>50</sub> utilizando para ello la fórmula de Kärber (162).

$TCID_{50} = -\Delta + [-\delta (s - \frac{1}{2})]$  donde:

$\Delta$  = última dilución donde todos los pozos presentan efecto

S= suma de los % de todas las diluciones donde se presentó efecto citopático (100% a 0%).

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

El título se expresó en TCID<sub>50</sub>/ml. Una unidad de TCID<sub>50</sub> corresponde a 0.70 unidades formadoras de placa, por lo tanto, la sensibilidad de esta técnica es de 1.5 logaritmos menos que el ensayo en placa.

*En cada ensayo en placa viral.* La suspensión viral se diluyó en serie 1:10 en DMEM<sub>i</sub> y se utilizaron 250 µl de cada dilución para infectar monocapas semiconfluentes de células VERO, cultivadas en placas de 6 pozos, después de dos horas a 37°C se retiró el inóculo y se reemplazó con 2ml de DMEM<sub>i</sub> + agarosa estéril al 0.8%, incubando durante 3 a 4 días a 37°C. Las placas se observaron diariamente hasta evidenciar efecto citopático (sincitio). Cada ensayo se realizó por duplicado y el título se expresó en Unidades Formadoras de Placa por mililitro (UFP/ml), que se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula (162):

UFP= dilución x  $\frac{P1+P2+\dots Pn}{v}$  x 1/v

donde:

P= No. de placas contadas por ensayo

n= No. de ensayos

v= volumen del inóculo en mililitros.

### 2.2.3 Concentración y purificación de la suspensión viral.

La suspensión viral se concentró con 6 % de polietilenglicol (PEG 8000, SIGMA Cat. P-2138) durante 18 a 24 horas a 4°C; posteriormente se centrifugó a 9500 rpm durante una hora a 4°C, utilizando un rotor Beckman de ángulo fijo (45 Ti). El botón se resuspendió en 2ml de TNE (50 mM TRIS-HCl, pH 7.5; 0.1 M NaCl, 10 mM EDTA). Las fracciones concentradas se purificaron mediante un gradiente lineal de sacarosa del 20-60%, centrifugando a 25000 rpm durante 6 horas a 4°C en un rotor Beckman de columpio (SW27). La banda viral se colectó y se determinó la concentración de proteínas y ácidos nucleicos por espectrofotometría a 280 y 260 nm, respectivamente. La densidad ( $\text{g/cm}^3$ ) de la banda se analizó por refractometría (reflectómetro Carl Zeiss modelo 120371). La densidad se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:  $\rho_{20^\circ\text{C}} = 2.7329\eta - 2.6425$ ;  $\eta$ = unidades de refracción

### 2.3 Obtención de anticuerpos.

Conejos machos Nueva Zelanda de 2.0-2.5 Kg de peso se inmunizaron con un volumen de 150 $\mu\text{l}$  a 200 $\mu\text{l}$  de virus purificado con título de  $4.3 \times 10^4$ , TCID<sub>50</sub>/ml y con una concentración de proteína de 200 a 300  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Se aplicaron tres inyecciones subcutáneas a intervalos de 21 días; utilizando adyuvante completo de Freund en la primera aplicación e incompleto en las dos siguientes. Los conejos con anticuerpos



séricos neutralizantes anti-VSR se sangraron a blanco. Los anticuerpos obtenidos fueron purificados por columna de afinidad de sefarosa acoplada a proteína A y titulados por un ensayo de neutralización de la infectividad. El título se expresó en unidades neutralizantes por mililitro (UN/ml). Una unidad neutralizante neutraliza  $4.3 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml.

#### **2.4 Purificación de IgG's por cromatografía de afinidad.**

Para una columna de 7 ml se hidrató 1g de proteína A con 4 ml de H<sub>2</sub>O desionizada y se montó en una jeringa de 20 ml. La columna se lavó con 40 ml de amortiguador de fosfatos 0.5 M, pH 8.0 (fosfato monobásico de sodio 0.5 M, fosfato dibásico de sodio 0.5 M), seguido por un lavado con 20 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 8. Se aplicaron 7 ml de suero hiperinmune y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Se eluyó con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 8 hasta obtener una densidad óptica de cero (280 nm) en las fracciones recogidas (1ml). Las IgG's se eluyeron con una solución de ácido acético 0.1 M y NaCl 0.15 M y se colectaron fracciones de un mililitro, que se neutralizaron con PBS 10X. Las fracciones colectadas se leyeron a 280 nm en un espectrofotómetro y se utilizaron las de densidad óptica entre 1.241-2.172. La columna se lavó con amortiguador de fosfatos 0.5 M, pH 8 y se dejó con amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 8 para su uso posterior. La mezcla de fracciones se dializó contra PBS pH 7.4 y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry, obteniéndose un valor de 2.6 mg/ml. La composición protéica de la mezcla se analizó en geles de acrilamida al 10% en condiciones reductoras (163, 164).

## **2.5 Determinación del título de anticuerpos neutralizantes (Microneutralización).**

El título de anticuerpos neutralizantes se determinó de dos maneras: 1) Una suspensión viral con un título de  $2.8 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml se diluyó en serie 1:3 en medio DMEM<sub>i</sub>, cada una de las diluciones se mezcló con un volumen igual de suero hiperinmune sin diluir, se incubaron 60 minutos a 37°C. Se añadieron 50 µl de la mezcla virus-anticuerpo a monocapas de células VERO cultivadas en placas de 96 pozos, se dejaron adsorber durante 2 horas a 37°C, después de éste tiempo el inóculo se retiró y se reemplazó por 150 µl de medio DMEM<sub>i</sub>, se incubó a 37°C hasta observar efecto citopático y el título se expresó como la última dilución donde no se observa efecto citopático. 2) Se realizaron diluciones seriadas del suero hiperinmune 1:3 en el medio anteriormente descrito, a 50 µl de cada dilución se le agregaron 50 µl de la suspensión viral sin diluir ( $2.8 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml) y se continuó de acuerdo al procedimiento anteriormente descrito (165). Cada ensayo se realizó por duplicado. Para confirmar la ausencia de anticuerpos anti-VSR en el SBF utilizado en el mantenimiento de las líneas celulares se determinó paralelamente el título de anticuerpos neutralizantes.

## **2.6 Anticuerpos monoclonales.**

Los anticuerpos monoclonales anti-F (48F) y anti-G (64G), fueron donados por el Dr. José Antonio Melero del Instituto de Salud Carlos Tercero, Madrid, España.

## **2.7 Infección aguda en células A549.**

Células A549 se infectaron con VSR a una moi de 1.0, se incubó por dos horas a 37°C y posteriormente se retiró el inóculo y se reemplazó por DMEM<sub>i</sub>. Las células se

mantuvieron durante 48 horas a 37°C. La infectividad viral del sobrenadante obtenido de esta infección (cA549a) se tituló en células VERO, los títulos se expresaron en TCID<sub>50</sub>/ml.

## **2.8 Infección persistente en células A549.**

Para el establecimiento de la infección persistente, las células A549 se infectaron con VSR a una moi de 0.001 en presencia de DMEM<sub>i</sub>. Se incubó por dos horas a 37°C, después de este tiempo se retiró el medio y se reemplazó por DMEM<sub>i</sub> y se incubaron por 24 horas a 37°C. Posteriormente, los pases sucesivos se mantuvieron en presencia de 5% de SBF y se realizaron 2 a 3 pases por semana. La presencia del virus sincitial respiratorio en los cultivos persistentes (A549per) se determinó por: **1.** Titulación de virus extracelular por TCID<sub>50</sub> y ensayo en placa viral; **2.** Determinación de partículas defectuosas por interferencia con la infectividad del virus de referencia; **3.** Detección de antígeno viral por: focos de infección, inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo **4.** Expresión del genoma viral por amplificación de un fragmento de 278pb del mRNA del gen N por RT-PCR. El cultivo A549per ha sido mantenido por más de siete años.

### **2.8.1 Determinación de partículas defectuosas que interfieren con la infectividad viral.**

La presencia de partículas defectuosas que interfieren con la infectividad viral se determinó de acuerdo a la técnica descrita por Threuhaf W.M. con algunas modificaciones (165). La determinación se fundamenta en evaluar indirectamente la interferencia viral de las partículas defectuosas con la infectividad viral a través de la determinación de la viabilidad celular, por lo tanto hay una correlación directa entre

interferencia con la infección y sobrevivida celular. Brevemente, monocapas de células VERO confluentes en placa de 96 pozos ( $1 \times 10^5$  células/pozo), se infectaron con 50  $\mu$ l del sobrenadante de cada pase del cultivo A549per (cA549per) y se incubaron por 2 horas a 37°C. Posteriormente, se retiró el inóculo, se lavaron con PBS y se infectaron con 50  $\mu$ l de una suspensión viral a una multiplicidad de infección de 0.3, y se incubaron por 2 horas a 37°C. Se retiró el inóculo y se adicionó medio DMEM<sub>i</sub> e incubaron por 72 horas a 37°C. Se retiró el inóculo y se adicionaron 100  $\mu$ l de solución salina balanceada de EARLE (Sigma), complementada con rojo neutro al 0.033%, se incubaron durante dos horas a 37°C, las células que sobrevivieron a la infección incorporaron el colorante. Posteriormente se lavaron con PBS para eliminar el excedente de colorante y se añadió una solución de etanol al 50% en solución de fosfato monobásico de sodio 0.1M por 15 minutos y se determinó la absorbancia a 540nm. El porcentaje de interferencia se calculó de la siguiente manera: el valor de densidad óptica para las células control no infectadas corresponde al 100% de viabilidad celular con base a este dato se determina el porcentaje de viabilidad celular en el control de células infectadas a una moi de 0.3, este valor se resta al porcentaje de viabilidad celular determinada para las muestras problema.

#### 2.8.2 Confirmación de la presencia de partículas defectuosas en cA549per.

Sobrenadantes del cultivo persistente se purificaron por un gradiente continuo de sacarosa (20-60%), a cada banda colectada (500 $\mu$ l), se le determinó la densidad por refractometría, como se describió anteriormente, y la presencia de proteínas y ácidos nucleicos por espectrometría. Así mismo, en cada banda se confirmó la presencia de partículas defectuosas de acuerdo lo descrito anteriormente.

### 2.8.3 Inhibición de la interferencia viral.

La interferencia de las partículas defectuosas a la infectividad viral se confirmó inactivándolas con luz U.V. La irradiación se hizo con una lámpara universal de luz UV (UVGL-25, 365 nm) durante 10 minutos a 10 cm de distancia y posteriormente se realizó el ensayo de interferencia descrito anteriormente.

### 2.8.4 Detección de antígeno viral.

- *Focos de infección.*

Células A549 normales (A549norm) cultivadas en placas de 96 pozos se infectaron con 50µl del cA549per de cada pase del cultivo A549per, se incubó por dos horas a 37°C, se retiró el inóculo y se reemplazó por DMEM<sub>i</sub>. Las células se mantuvieron por 24 horas a 37°C. Las células infectadas se fijaron con 200 µl de una solución de metanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se bloqueó con 150 µl de PBS-ASB (Albúmina Sérica Bovina) al 1% durante 90 minutos a 37°C. Se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.05%-ASB al 0.1% (PBS-T20) y se incubaron durante 60 minutos a 37°C con 200 µl del primer anticuerpo [inmunoglobulinas clase G (IgG's) obtenido y purificado en el laboratorio] a una dilución de 1:100 en PBS-ASB al 0.5%. Se adicionaron 100µl del conjugado anti-IgG de conejo-peroxidasa (Amersham) a una dilución de 1:500 en PBS-ASB al 0.5%, se incubó durante 60 minutos a 37°C y se lavó con PBS-T20, durante 3 minutos por lavado. Se adicionaron 100 µl del sustrato (3,3-diaminobencidina 0.5mg/ml en Tris pH 7.6, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.04%), se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se detuvo la reacción después de 20 minutos con 50 µl/pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 N. La presencia de focos de

infección se observó en el microscopio invertido Nikkon Diaphot. Como control se usaron células A549norm no infectadas las cuales se procesaron en forma paralela.

- *Inmunofluorescencia indirecta.*

La inmunofluorescencia indirecta se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por García-Barreno y col (166). Células A549per se cultivaron durante 24 horas a 37°C en cámaras para inmunofluorescencia, previamente tratadas con 500 µl de polilisina a una concentración de 10 µg/ml durante 20 minutos a temperatura ambiente y lavadas una vez con PBS estéril. Las células se fijaron con metanol a -20°C durante 5 minutos y con acetona a -20°C durante 30 segundos. Se dejó secar al aire y se bloqueó con PBS-ASB al 1% durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavaron las células con PBS y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con el primer anticuerpo [inmunoglobulinas clase G (IgG's)] purificado a una dilución de 1:100 en PBS-ASB al 0.25%, se lavó la preparación dos veces con PBS durante diez minutos y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con el conjugado anti-IgG de conejo hecho en burro unido a fluoresceína (Amersham) como segundo anticuerpo. Después de la incubación, se lavaron tres veces las células con PBS durante diez minutos y finalmente se lavó con agua destilada. Como control positivo se usaron células A549 infectadas en forma aguda (A549a) y como control negativo células A549 normales (A549norm) las cuales se procesaron en forma paralela.

- *Citometría de flujo.*

En células A549norm, A549a y A549per se determinó la expresión de antígenos virales de superficie. El ensayo se realizó en tubos eppendorf tratados por 30 minutos a 37°C con 1ml de PBS-ASB al 0.1% (PBS-ASB) estéril. Se retiró la solución de PBS-ASB y se adicionaron de  $3 \times 10^5$  a  $5 \times 10^5$  células. Las células se

lavaron 1 vez con PBS-ASB, posteriormente se bloqueó con PBS-SBF al 2% durante 30 minutos a 4°C en agitación constante. Se lavaron dos veces con PBS-ASB y se adicionaron 100 µl del primer anticuerpo [inmunoglobulinas clase G (IgG's)] purificado a una dilución de 1:25 en PBS-ASB al 0.5% y se incubó por 2 horas a 4°C en agitación constante. Después de dos lavados con PBS-ASB se adicionaron 100 µl del segundo anticuerpo, conjugado anti-IgG de conejo unido a fluoresceína a una dilución de 1:500 en PBS-ASB al 0.5% y se incubaron 2 horas a 4°C en agitación constante. Se lavaron dos veces y se fijaron con paraformaldehído al 0.5% en PBS por 30 minutos a 4°C. Se lavaron dos veces más y se analizaron en un citómetro de flujo (FACScan flow cytometer Becton Dickinson).

Los controles fueron: 1. A549a con suero preinmune (control de isotipo); 2. A549a 48 horas post-infección con anti-VSR (control positivo) y 3. A549norm como control de fluorescencia basal e integridad celular.

#### 2.8.5 RT-PCR del gen N de VSR.

La extracción de RNA total se obtuvo de acuerdo a la técnica de Chomczynski y Sacchi (167).

*Síntesis del DNAc del gen N.* En un tubo eppendorf (0.6 ml) se adicionaron 4 µl del amortiguador de reacción 5X, 2 µl de DTT 0.1M, 1µl de dNTPs 10mM, 0.5 µl de inhibidor de RNasa, 3 µg de RNA y se adicionó H<sub>2</sub>O-DEPC hasta completar un volumen final de 20 µl. Se adicionaron 35 µl de aceite mineral y se incubó a 80°C durante 5 minutos, los tubos de reacción se colocaron en hielo, posteriormente se adicionó 1 µl de oligo-dT e incubó durante 10 minutos a 60°C y los tubos se colocaron nuevamente en hielo durante 5 minutos. Se adicionó 1 µl de transcriptasa reversa (200 U GIBCO) y los tubos de reacción se incubaron a 42°C durante 1 hora.

*Amplificación del DNAc del gen N de VSR.* En un tubo eppendorf (0.2 ml) se adicionaron 2  $\mu$ l del DNAc (templado), 5  $\mu$ l de amortiguador 1X para PCR, 1  $\mu$ l de dNTPs (10mM), 1.5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  (50 mM), 40 pmol de cada iniciador, 0.2  $\mu$ l de Taq polimerasa y  $H_2O$ -DEPC para aforar a un volumen final de 50  $\mu$ l; finalmente se adicionaron 35  $\mu$ l de aceite mineral. La reacción se calentó a 99°C durante 2 minutos con 30 segundos para eliminar la transcriptasa reversa que puede actuar como inhibidor de la polimerasa. La amplificación se llevo a cabo durante 35 ciclos a una temperatura de desnaturalización de 94°C durante 1 minuto, la temperatura de hibridación de los iniciadores a 65°C durante 1 minuto 30 segundos y la extensión a 72°C durante 1 minuto. Un ciclo final de extensión a 72°C durante 7 minutos.

Los productos de la amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (BioRad).

Los iniciadores que se utilizaron fueron diseñados para amplificar la región entre los nucleótidos 858-1135 del gen N del VSR (168).

sentido: 5'-GGAACAAGTGTTGAGGTTTATGAATATGC-3'

anti-sentido: 3'-CTTCTGCTGTCAAGTCTAGTACACTGTAGT-5'

## **2.9 RT-PCR del gen de CXCL8.**

La extracción de RNA total se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito anteriormente.

*Síntesis del DNAc del gen de CXCL8.* La síntesis de la cadena complementaria del gen de CXCL8 se llevo a cabo de acuerdo al protocolo general descrito anteriormente con la única variación del uso de oligo-dT (1  $\mu$ l/reacción) para la síntesis del DNAc a partir del mRNA.

*Amplificación del DNAc del gen de CXCL8.* La reacción de amplificación para el DNAc del gen de CXCL8 se realizó de acuerdo al protocolo descrito en el apartado



anterior, excepto que la concentración de los iniciadores utilizada en la reacción fue de 40 pmol.

Los iniciadores que se utilizaron fueron diseñados para amplificar la región entre los nucleótidos 847-1345 del mRNA de CXCL8 (Gene Bank, No. de acceso: M26383)

sentido: 5'-CTGCTAGCCAGGATCCAACAA-3'

anti-sentido: 3'-CAACACAGCTGGCAATGCACA-5'

La amplificación de  $\beta$ 2-microglobulina se utilizó como control interno, en la reacción de PCR:

*Amplificación del DNAc del gen de  $\beta$ 2-microglobulina.* La reacción de amplificación para el DNAc del gen de  $\beta$ 2-microglobulina se realizó de acuerdo al protocolo descrito en el apartado anterior. La concentración de los iniciadores utilizada en la reacción fue de 40 pmol.

Los iniciadores que se utilizaron fueron diseñados para amplificar la región entre los nucleótidos 340-430 del mRNA de  $\beta$ 2-microglobulina (Gene Bank, No, de acceso: NM\_004048).

sentido: 5'-ACCCCCCATGAAAAAGATGAGTAT-3'

anti-sentido: 3'-ATGATGCTGCTTACATGTCTCGAT-5'

Los productos de la amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio. El análisis densitométrico de la imagen capturada con una cámara digital Kodak DC 290, se realizó con el programa Quantity One V 4.3.1 de BioRad.

## **2.10 Inactivación de la infectividad de cA549per y de cA549a.**

cA549per se irradió con una lámpara universal de luz UV (UVGL-25, 365nm) a 10 cm de distancia, durante 5 minutos. La inactivación por calor se llevó a cabo a 92°C, durante 5 minutos. La inactivación de la infectividad se confirmó a través de la

determinación de la expresión de antígeno viral en células A549 infectadas por citometría de flujo, de acuerdo a lo descrito anteriormente. Después del tratamiento de inactivación se determinó por ensayos de RT-PCR en A549norm la inducción de la síntesis del mRNA de CXCL8. El sobrenadante cA549a se trató y analizó de la misma forma.

### **2.11 Precipitación de partículas solubles en cA549per.**

El cA549per se inmunoprecipitó de acuerdo a lo reportado por Millan, et al (169). Brevemente, a un volumen de 125  $\mu$ l de cA549per se le adicionaron 125  $\mu$ l del anticuerpo policlonal comercial anti-VSR (Biogénesis), se incubó durante 1 hora a 37°C, posteriormente se adicionaron 5  $\mu$ l de proteína A-agarosa (GIBCO) y se dejó en agitación durante toda la noche a 4°C. A continuación, los complejos inmunes se separan por centrifugación y la fracción soluble, que corresponde al sobrenadante, se precipitó con 6 % de polietilenglicol (PEG 8000, SIGMA) durante 18 a 24 horas a 4°C; posteriormente, se centrifugó a 9500 rpm durante 1 hora a 4°C en un rotor de ángulo fijo TLA-100.2. Se obtuvieron dos fracciones: sobrenadante (sPEG) y precipitado (pPEG). El sobrenadante cA549a se trató y analizó de la misma forma.

### **2.12 Inducción de la expresión del mRNA de CXCL8 en células A549norm por las fracciones sPEG y pPEG de cA549per.**

Células A549norm crecidas en placas de 48 pozos se trataron con 20  $\mu$ l de cA549a o con 20  $\mu$ l del cA549per durante 1 minuto a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el inóculo y se reemplazó con PBS estéril y se incubaron durante dos horas a 37°C. El RNA total se extrajo de las células tratadas 2 horas después y se utilizó en el ensayo de RT-PCR para el análisis del RNAm de la CXCL8

### **2.13 Determinación de CXCL8 extracelular.**

La concentración de proteína se determinó por un inmunoensayo de ELISA de captura ENDOGEN (PIERCE EH2-CXCL8) en cA549per sin inactivar y previamente inactivadas con UV o calor, de acuerdo a lo descrito anteriormente, así como en cA549a y en las fracciones sPEG y pPEG. El cA549per, cA549a y las fracciones sPEG y pPEG, se diluyeron 1:50 en PBS y se utilizaron en ensayos de interacción en células A549norm, posteriormente se retiró el inóculo, se adicionaron 2 ml de DMEM sin indicador y en ausencia de suero fetal y se incubaron durante seis horas a 37°C. Transcurrida la incubación se adicionaron 500µl de amortiguador de lisis a 4°C (10mM de Tris-HCL; 140mM de NaCl; 5mM de EDTA; 1% de Triton X-100, 1% de desoxicolato de sodio), y se rasparon las células para recuperarlas. La suspensión celular se agitó en vórtex durante 30 segundos, para posteriormente centrifugarla durante 5 minutos a 15000g en una microfuga Eppendorf a 4°C, el sobrenadante se recuperó y se obtuvieron los extractos celulares.

En tiras de pozos para ELISA se añadieron 50µl/pozo de la solución estándar con las siguientes concentraciones 0, 25, 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 pg/ml ó 50 µ l/pozo de cada muestra problema, posteriormente se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Transcurrido este tiempo la placa se lavó 3 veces con el amortiguador de lavado ( $A_l$ ) a continuación se agregaron 50 µl/pozo de anticuerpo biotilado y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados con el  $A_l$  y se adicionaron 100µl/pozo de la solución estreptavidina-peroxidasa, se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con el  $A_l$ , posteriormente se adicionaron 100µl/pozo del sustrato e incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 100µl/pozo de la solución de paro y la densidad óptica fue leída a 550nm. Los datos obtenidos de las

muestras problema fueron extrapolados a la curva patrón y se graficaron con el programa Microsoft Excel.

#### **2.14 SDS-PAGE. Inmunoblot para proteínas del virus sincitial respiratorio.**

Las proteínas de cA549per, cA549a y de las fracciones sPEG y pPEG se separaron en geles en gradiente SDS-poliacrilamida 8-20% en condiciones reductoras [1% de mercaptoetanol y 8M de urea y se calentaron a ebullición durante 12 min] y cargando 1 µg de proteína por carril (170). Posteriormente fueron electrotransferidas a papel de nitrocelulosa (hybond C extra, Amersham) durante 30 minutos a 20 volts. Las proteínas virales transferidas se hicieron reaccionar con anticuerpos anti-VSR obtenido en cabra (Biogenesis), a una dilución 1:400 o con los anticuerpos monoclonales 48F o 64G a una dilución de 1:5 y como segundo anticuerpo se utilizó un conjugado anti-IgG o anti-ratón unido a peroxidasa (ZYMED), a una dilución 1:500, respectivamente, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las diluciones y los lavados se hicieron en PBS-Tween 20 al 0.3%. Los complejos antígeno-anticuerpo se revelaron por quimioluminiscencia, de acuerdo a las instrucciones del proveedor (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, UK).

#### **2.15 Análisis estadístico.**

Los datos se expresaron como la media de tres determinaciones  $\pm$  el error estándar. Las diferencias entre la inducción del mRNA o de la proteína de CXCL8 entre A549per y A549norm se determinaron con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (171), para lo cual se empleó el programa estadístico JMP versión 3.1. Valores de  $P \leq 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

### **3. Resultados:**

#### **3.1 Establecimiento del cultivo persistentemente infectado.**

*Establecimiento de la infección persistente en la línea celular A549.*

Para el establecimiento de la infección persistente en células A549 con el Virus Sincitial Respiratorio (VSR) se utilizaron diferentes estrategias: a) infectar a una moi de 0.1 o de 1 en presencia de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ); b) infectar a una moi de 0.1 o de 1 en presencia de suero hiperinmune anti-VSR y c) infectar a diferentes multiplicidades de infección (0.001, 0.01, 0.1 y 1). Las dos primeras estrategias empleadas para el establecimiento no tuvieron éxito debido a que con estas multiplicidades de infección el daño citopático debido a la infección ocasionaba una alta mortalidad celular, lo que hizo imposible recuperar subcultivos bajo estas condiciones. Finalmente, el cultivo persistentemente infectado se logró establecer mediante el procedimiento de infectar a una baja multiplicidad de infección (moi= 0.001). Las células que sobrevivieron a la infección continuaron subcultivándose y los pases se realizaron de 2 a 3 veces por semana. A los subcultivos se les denominó cultivos persistentemente infectados (A549per). Durante los pases del cultivo no se observó un cambio significativo en la tasa de crecimiento entre las células persistentemente infectadas y los cultivos de células A549 normales, tampoco se observó lisis celular, sin embargo, en algunos casos fue posible observar de forma transitoria la formación del sincitio característico del VSR. El cultivo A549per se ha propagado por más de 7 años pasando éstas células de 2 a 3 veces por semana en DMEMc.

#### **3.2 Confirmación de la presencia de VSR en el persistentemente infectado.**

La presencia del VSR en el cultivo se determinó por:

a) *Detección de virus extracelular en los sobrenadantes de los cultivos A549per a través de la titulación de la infectividad por muerte celular (TCID<sub>50</sub>) y ensayo en placa viral.*

La detección de virus infectivo extracelular por TCID<sub>50</sub> y ensayo en placa viral se realizó en monocapas de células VERO y se probaron los sobrenadantes obtenidos de los cultivos A549per (cA549per). Se titularon 60 sobrenadantes cA549per (pase 1 al 60), ninguno de ellos produjo células muertas suficientes para observar efecto citopático o placas en la monocapa.

b) *Expresión de antígeno viral por focos de infección.*

De acuerdo a los resultados obtenidos por TCID<sub>50</sub> y ensayo en placa viral se decidió analizar por ensayo de focos de infección si en las células persistentes se producían partículas infecciosas, para esto, células A549 normales fueron infectadas con el cA549per de 35 pases diferentes. Los resultados de este ensayo demostraron la presencia de partículas virales infecciosas en los 35 pases analizados. Ver figura 1.

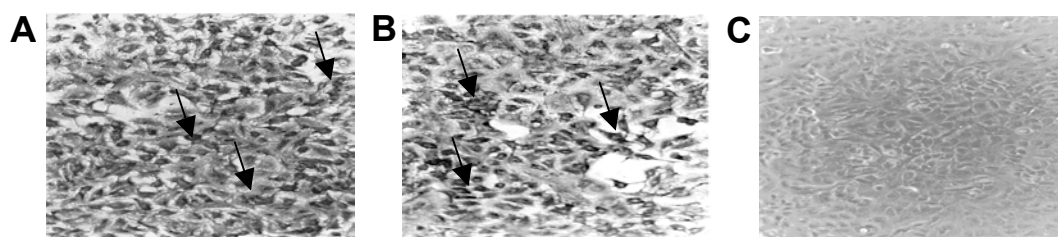


Fig. 1: Focos de infección del sobrenadante de cultivos A549per en células A549 normales. El ensayo de focos de infección se tiñó utilizando como primer anticuerpo suero hiperinmune anti-VSR obtenido y purificado en el laboratorio y como segundo anticuerpo un anti-Ig de conejo conjugado con peroxidasa. La reacción se reveló con 3,3 diaminobencidina. A. Control positivo (células A549a). B. cA549per (pase 58). C. Control negativo (células A549norm). Las flechas indican focos de infección.

c) *Determinación de partículas defectuosas en el sobrenadante cA549per del cultivo A549per por ensayo de interferencia a la infectividad viral.*

Los resultados obtenidos por el ensayo de focos de infección indican que las células expresan el antígeno viral, que podría deberse a la presencia de partículas virales defectuosas o a mezcla de estas partículas con virus infecciosos, por lo que se decidió llevar a cabo la detección de partículas defectuosas en los sobrenadantes cA549per de los cultivos A549per a través de ensayos de interferencia a la infectividad del virus de referencia. La determinación se fundamenta en evaluar indirectamente la interferencia viral de las partículas defectuosas con la infectividad viral a través de un ensayo de medición de la viabilidad celular.

Se analizaron los sobrenadantes cA549per de 37 pases. Los resultados obtenidos de estos ensayos señalan un porcentaje de interferencia que fluctúa entre el 14% y 60% como se muestran en la figura 2.

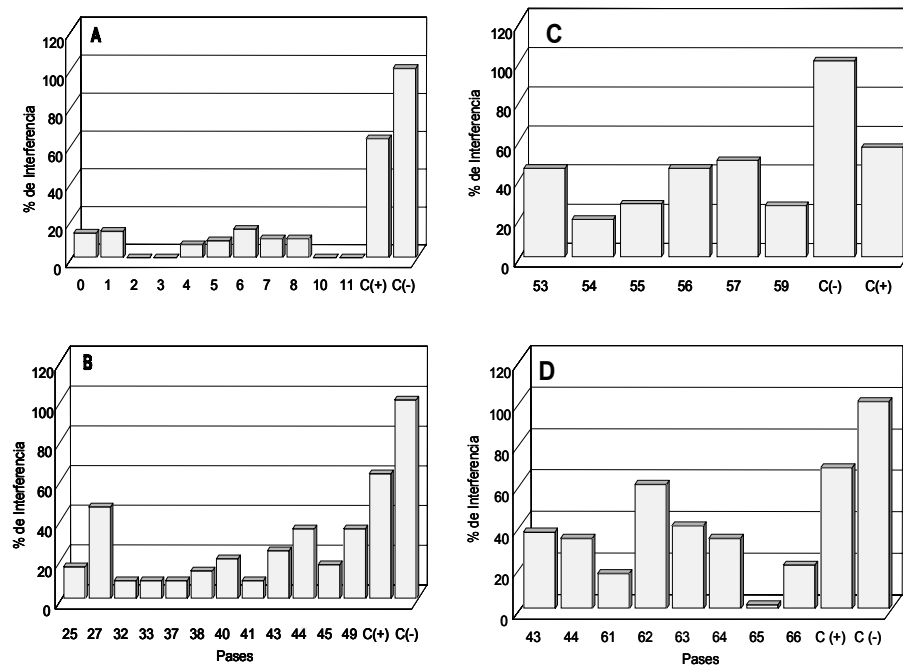
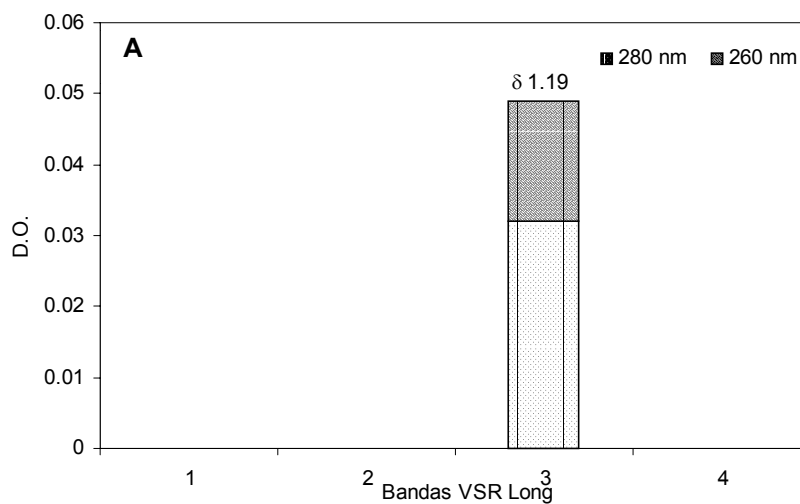


Fig. 2: Interferencia con la infectividad viral. Monocapas de células VERO se infectaron con los sobrenadantes cA549per obtenidos de los cultivos A549per y se dejaron adsorber por 2 horas a 37°C, posteriormente se retiró el inóculo y se infectó con la cepa de referencia Long a una multiplicidad de infección (moi) de 0.3 y se dejó adsorber por 2 horas a 37°C, después de este tiempo el inóculo se retiró y se reemplazó por DMEM<sub>i</sub>. Se incubó de 48 a 72 h a 37°C. Posteriormente se adicionó una solución de rojo neutro y se incubó por 2 horas a 37°C, transcurrido este tiempo, el colorante es liberado de las células viables con una solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en etanol. La reacción se dejó por 20-30 minutos y se leyó la absorbancia a 540 nm. Control positivo (células VERO infectadas con la cepa de referencia Long a una moi de 0.3). Control negativo (células VERO sin infectar). Los valores graficados corresponden al promedio de tres determinaciones. A, B, C, D, representan el análisis gráfico de la interferencia viral de los diferentes pases estudiados.

Los datos obtenidos sugieren la presencia de partículas defectuosas en los sobrenadantes cA549per. Para confirmar la presencia de éstas partículas defectuosas se realizaron dos diferentes ensayos: en primer lugar se hizo el análisis de la densidad de las partículas virales en los sobrenadantes de los diferentes pases en gradiente continuo de sacarosa (20-60%); para esto, se analizaron dos stocks de cA549per [stock1 (pool de los pases 43, 44, 49, 53 y 55) y stock2 (pool de los pases 56, 57, 62, 63 y 64)]. Para el stock 1 se obtuvieron cuatro bandas ( $\delta$ 1.03;  $\delta$ 1.06;  $\delta$ 1.13;  $\delta$ 1.21) y tres bandas para el stock 2 ( $\delta$ 1.04;  $\delta$ 1.08;  $\delta$ 1.19); la banda con densidad de 1.19, coincide con el



valor reportado para la cepa de referencia (Fig. 3). Se determinó la concentración de proteínas y ácidos nucleicos a cada banda por espectrofotometría, los valores más altos de densidad óptica coincidieron con cada una de las bandas colectadas. Por otra parte, se realizó un ensayo de interferencia de las partículas defectuosas a la infectividad viral con las bandas colectadas inactivadas y sin inactivar con luz U.V. Los datos indican que en los sobrenadantes tratados con UV se perdió o disminuyó la capacidad de interferir con la infectividad lo que indica la presencia de partículas defectuosas en los sobrenadantes cA549per (Fig. 4).



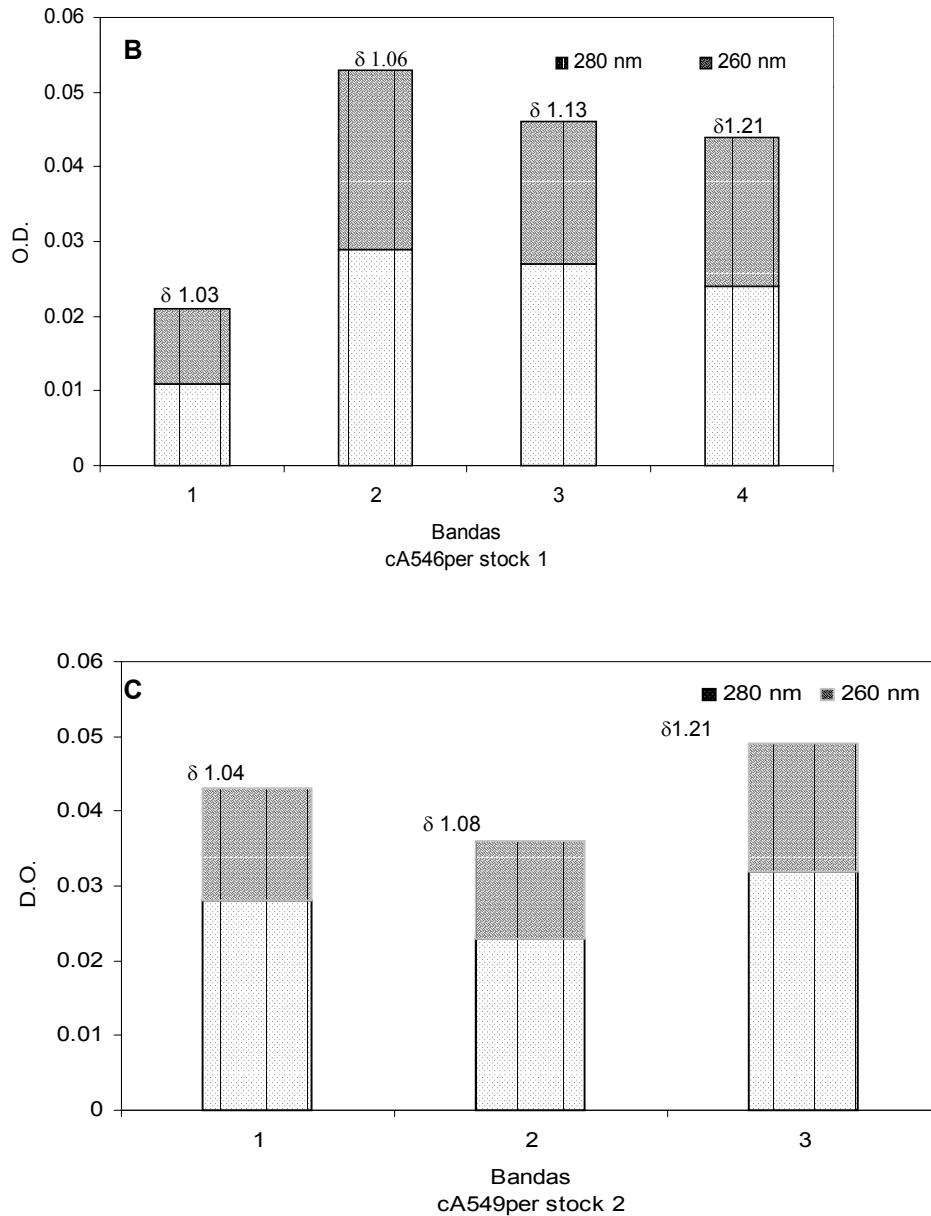


Fig.3: Gradiente de sacarosa. Se obtuvieron dos stocks (stock1 y stock 2) a partir del cultivo persistente A549per y se fraccionaron en gradiente continuo de sacarosa (20-60%). Un stock de la cepa de referencia VSR Long se utilizó como control. Las bandas obtenidas se colectaron y se les determinó la concentración de proteínas (280nm) y de ácidos nucleicos (260nm) por espectrofotometría, así como la densidad ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) medida por refractometría (refractómetro Carl Zeiss 120371; fórmula  $\rho_{20^\circ\text{C}} = 2.7329\eta - 2.6425$ ;  $\eta$  = unidades de refracción). **A.** Cepa de referencia VSR long. **B.** cA549per stock 1 y **C.** cA549per stock 2.

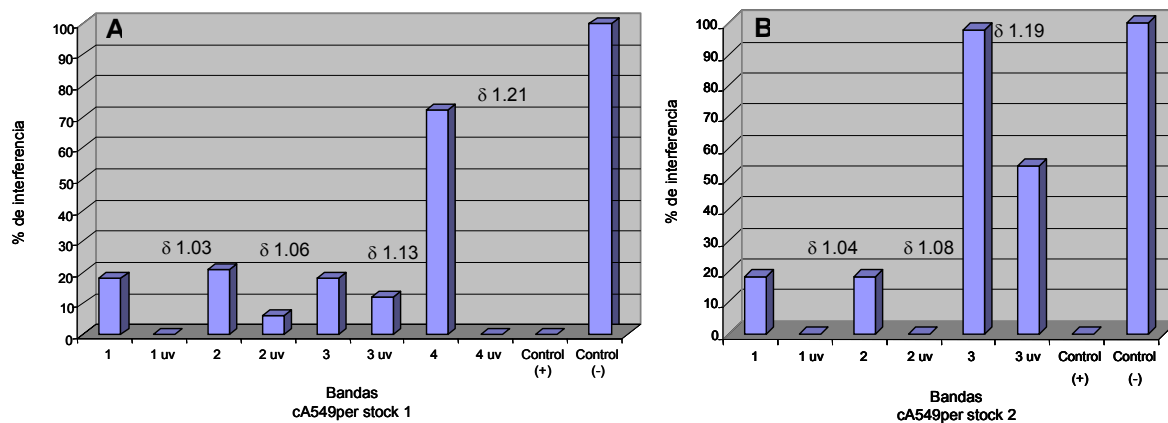


Fig. 4. Inactivación de la infectividad. Las bandas obtenidas del gradiente de sacarosa se inactivaron o no con luz UV, y posteriormente se utilizaron en el ensayo de interferencia a la infectividad viral. **A.** cA549per stock 1. **B.** cA549per stock 2. Para ambos ensayos el control positivo se refiere a células VERO infectadas con el VSR a una moi de 0.3 y el control negativo a células VERO no infectadas. El valor de 100% de interferencia representa al 100% de viabilidad celular.

*d) Expresión de antígeno viral en células persistentemente infectadas por ensayos de inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo.*

En los cultivos A549per se determinó cualitativamente, mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta, la expresión de antígeno viral en la superficie de las células infectadas. La figura 5 muestra el porcentaje de células positivas que fluctuó entre 20-65% en los pases 1 al 43.



Fig. 5: Ensayo de inmunofluorescencia indirecta para determinar la expresión de antígeno viral en la células de cultivos A549per. El ensayo de IF que se realizó utilizando como primer anticuerpo suero hiperinmune anti-VSR obtenido y purificado en el laboratorio y un anti-IgG de conejo conjugado con fluoresceína como segundo anticuerpo. A. Control positivo (células A549a). B. Control negativo (células A549norm) y C. A549per (pase 21).

La determinación cuantitativa del porcentaje de células que expresan antígeno viral en los cultivos A549per se realizó por citometría de flujo. Se analizaron del pase 14 al 73 (Fig. 6). El porcentaje de células que expresaron antígeno viral fluctuó entre 25 y el 98%. Además, se observó que en la población celular

persistentemente infectada hay subpoblaciones que expresan antígeno viral en diferentes cantidades como lo muestra el pase 73 (Fig. 6C).

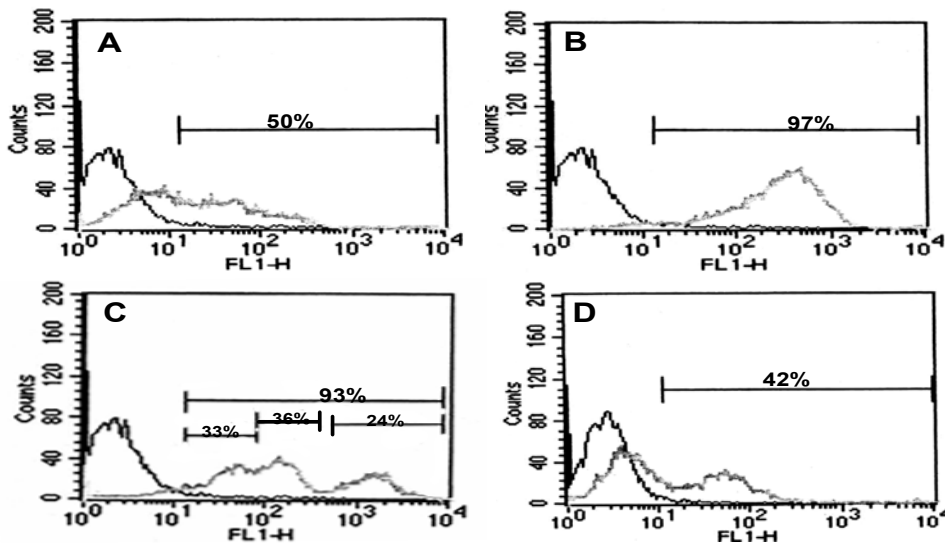


Fig. 6: Cuantificación de la población persistentemente infectada. Para la citometría de flujo se utilizó como primer anticuerpo suero hiperinmune anti-RSV obtenido y purificado en el laboratorio y como segundo un anti-Ig de conejo unido a fluoresceína. A. A549per (Pase 43.). B. A549per (Pase 65). C A549per (Pase 73) y D. Control positivo (células A549norm infectadas con la cepa de referencia Long por 48 horas a una moi de 1. El control de isotipo (células A549a, utilizando como primer anticuerpo suero preinmune de conejo y como segundo un anti-Ig unido a fluoresceína). Los números sobre las barras representan el porcentaje de células que expresan antígeno viral.

#### e) Expresión del genoma viral en células persistentemente infectadas.

Con la finalidad de confirmar la expresión del genoma viral se evaluó la síntesis del mRNA del gen N (nucleocápside) por RT-PCR. Se seleccionó este gen porque su secuencia varía poco en las cepas aisladas de la naturaleza.

Los resultados obtenidos por RT-PCR mostraron una banda de 278pb, correspondiente al segmento amplificado del mRNA de N. La banda se observó en todos los pases analizados (Fig. 7), pero no en el control de células A549norm.



Fig. 7: Detección del genoma viral en el cultivo A549per, mediante la detección del mRNA del gen N. Control positivo A549a (+) y control negativo A549norm (-). Carril 1; Pase 2; 2 Pase 4; 3 Pase 12; 4 Pase 14; 5 Pase 43, 6 Pase 62.

### **3.3 Efecto de la persistencia viral en la inducción de la interleucina 8 (CXCL8).**

La inducción de CXCL8 en células A549 se evaluó a través de la síntesis de su mRNA mediante ensayos de RT-PCR. La inducción de la síntesis del mRNA de CXCL8 se cuantificó por densitometría de la banda obtenida en geles de agarosa del producto de RT-PCR y se definió como la relación entre los niveles de expresión del mRNA de CXCL8 y los niveles de expresión del mRNA de  $\beta$ -2 microglobulina como control interno (CXCL8/ $\beta$ -2). Para este ensayo se amplificó un fragmento de 498 pb que corresponde a los nucleótidos 847 al 1345 del mRNA de CXCL8. Los resultados obtenidos (Fig. 8), demostraron que la relación de los mRNA (CXCL8/ $\beta$ -2) para las células sin infectar fue de 1.0; en las células infectadas en forma aguda la relación fue de 1.8, y valores de 2 a 2.7 en los pases del cultivo infectado en forma persistente. Como se muestra en la figura 8, el incremento en la inducción en la síntesis del mRNA de CXCL8 en los diferentes pases del cultivo A549 sugiere una inducción continua de la síntesis del mRNA de CXCL8 por la persistencia del virus.

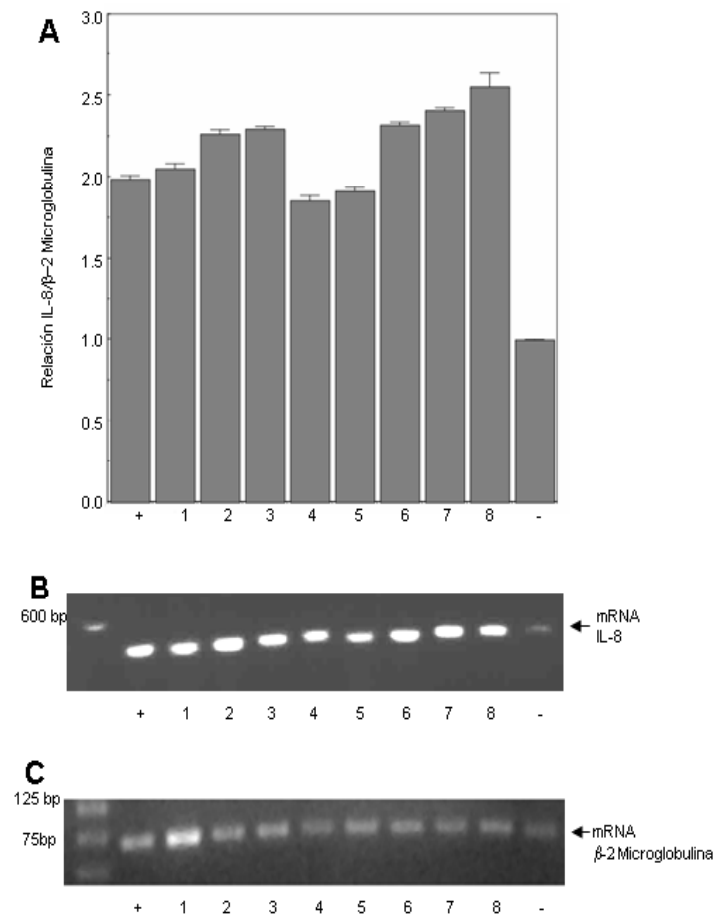


Fig. 8. **A.** Relación de los mRNA CXCL8/ $\beta$ -2 microglobulina obtenida en diferentes pases, así como, los controles positivo y negativo. **B.** RT-PCR del mRNA de IL-8. **C.** RT-PCR del mRNA de  $\beta$ -2 Microglobulina (control interno). Control positivo A549a (+) y control negativo A549norm (-). Carril 1; Pase 65; 2 Pase 66; 3 Pase 67; 4 Pase 68; 5 Pase 69, 6 Pase 70; 7 Pase 72; 8 Pase 73. (Kruskall-Wallis test;  $\chi^2 = 28.114$ , d.f. = 9,  $P = 0.0009$ ).

### 3.4. Mediadores solubles presentes en el sobrenadante cA549per del cultivo persistentemente infectado como inductores de CXCL8.

Se ha reportado que la exposición de células A549 al medio condicionado, obtenido a partir de una infección aguda con VSR, inducía la producción de CXCL8, y que este incremento se asociaba con la síntesis de mediadores solubles e inductores de CXCL8. En este mismo estudio se trató el medio condicionado con anticuerpos neutralizantes contra IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , y con

el antagonista del receptor de IL-1, los resultados demostraron que IL-1 $\alpha$  era el principal mediador soluble que inducía el incremento en la expresión de CXCL8 (172).

Una vez establecida la inducción de CXCL8 en el cultivo persistente decidimos estudiar el efecto de factores solubles, ya sea celulares o virales en esta inducción. Para estudiar estos factores, se realizó una cinética de infección en células A549norm tratadas con el sobrenadante cA549per. Los resultados obtenidos, mostraron un incremento en la relación CXCL8/ $\beta$ -2 para cada punto de la cinética versus el valor constitutivo (Fig. 9). Aunque es importante mencionar que a las 48 y 96 horas postratamiento este valor disminuyó con respecto a las 4 y 24 horas (Fig. 9); este resultado puede estar relacionado con el mecanismo autocrino de regulación de CXCL8. No obstante, las variaciones observadas en los valores de la relación CXCL8/ $\beta$ -2 para los dos últimos puntos de la cinética, el efecto global del tratamiento de las células A549norm con el sobrenadante cA549per, sugiere que mediadores solubles del cA549per pueden ser los responsables de la inducción de la síntesis del mRNA de CXCL8.

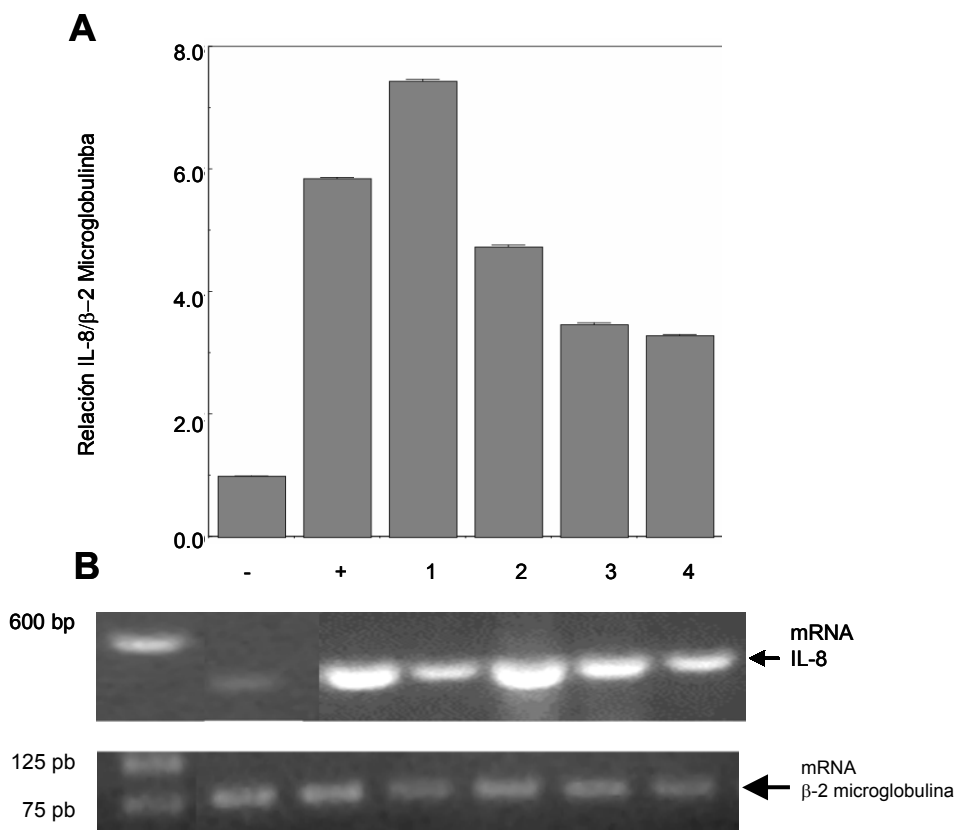


Fig. 9. A. Relación de los mRNA CXCL8/ $\beta$ -2 microglobulina obtenida a diferentes tiempos de interacción entre cA549per y células A549norm así como los controles positivo y negativo. B. RT-PCR del mRNA de CXCL8. Control positivo A549a (+) y control negativo A549norm (-). Carril 1, 4 h; 2, 24 h; 3, 48 h; 4, 96 h. (Kruskall-Wallis test;  $\chi^2 = 16.6477$ , d.f. = 5,  $P = 0.0052$ ).

### 3.5 Efecto en la síntesis del mRNA y de la proteína de CXCL8 por tratamiento con luz UV o calor de los sobrenadantes cA549per.

El incremento observado en la inducción del mRNA de CXCL8, podría deberse a la replicación viral del VSR y/o factores celulares presentes en el sobrenadante del cultivo persistente. Con la finalidad de descartar la participación de partículas infecciosas y/o alterar la conformación de proteínas virales o celulares presentes en el sobrenadante de las células A549per, se realizó el ensayo de inducción de CXCL8 con sobrenadantes cA549per tratados con UV o calor para inactivar la infectividad viral o destruir proteínas. Los sobrenadantes de cA549a y cA549norm utilizados como controles se



procesaron paralelamente.

Por citometría de flujo se determinó la presencia de antígeno viral en células tratadas con los sobrenadantes sometidos a UV o calor y se confirmó que estos tratamientos inactivaron de manera eficiente la infectividad, por lo que se descartó la participación de VSR infeccioso. Los resultados de la citometría de flujo mostraron que del porcentaje del 45% de células que expresaban antígeno viral cuando se infectaron con cA549a y del 65% cuando se infectaron con cA549per, estos valores disminuyeron hasta 4.87% y 0.96% respectivamente, después del tratamiento con calor. Para el caso de inactivación con UV los valores se redujeron a 2.79% y 3.23%.

Sorprendentemente los sobrenadantes inactivados mostraron inducción de CXCL8 con valores de CXCL8/ $\beta$ -2 que fluctuaron entre 1.5 y 1.8 (Fig. 11A), indicando que no hubo diferencia significativa en la actividad de inducción del sobrenadante cA549per antes y después del tratamiento con UV o calor, en cambio si difieren del valor basal (valor de la relación de 1.0), del control de células A549norm tratadas con cA549norm (Fig. 10A). Los resultados de la cuantificación de la proteína CXCL8 extracelular en cA549per antes y después del tratamiento con UV o calor, señalan un incremento de 2 a 2.5 veces de CXCL8 con respecto a los niveles basales del control de células A549 normales tratadas con cA549norm, lo que demostró que no hay cambios significativos en la proteína extracelular aún después del tratamiento (Fig. 10B). Los resultados anteriores sugieren que tanto la inducción del mensajero de CXCL8 como la producción de la proteína son procesos independientes a la infección viral y/o a la integridad de proteínas.

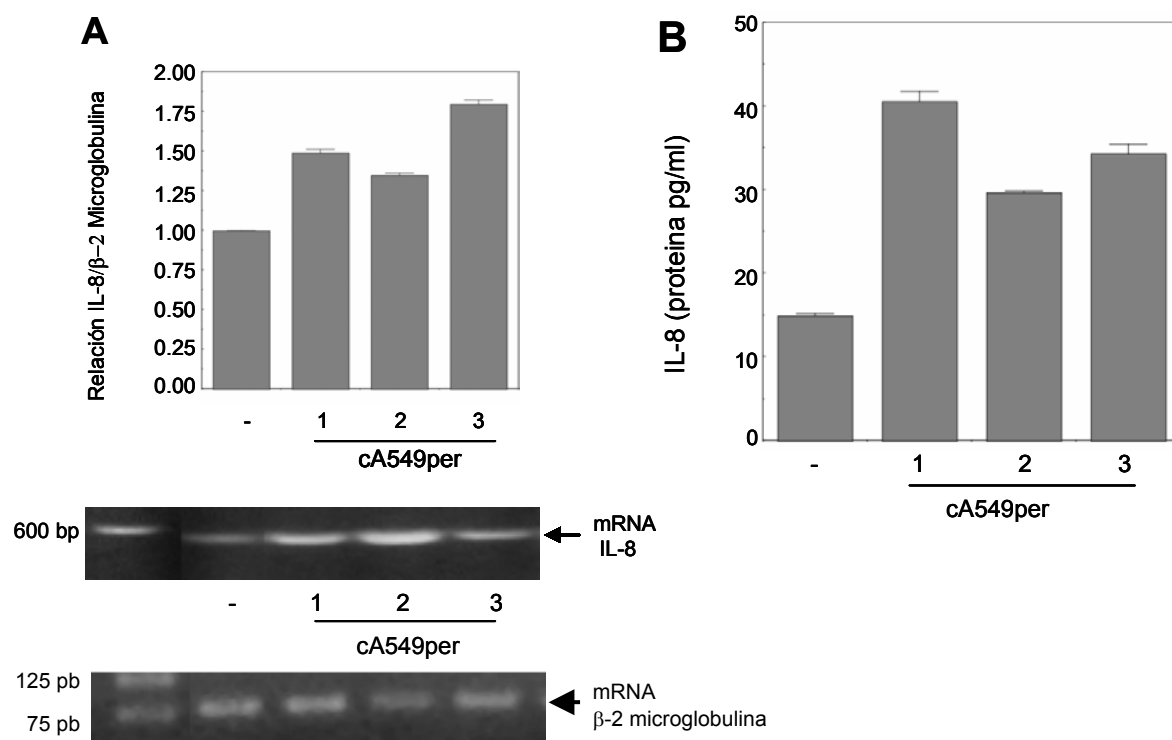


Figura 10A y B. Inactivación de cA549per y su efecto en la inducción de CXCL8. **A.** Histograma de la relación de los mRNA CXCL8/β-2 de cA549per inactivado y sin inactivar con UV o calor. Control negativo cA549m (-). Carril 1, cA549per sin tratar; 2, cA549per/UV; 3, cA549per/calor. (Kruskall-Wallis test;  $\chi^2 = 14.6416$ , d.f. = 4,  $P = 0.0057$ ). **B.** ELISA para determinar CXCL8 extracelular. Barra 1, cA549per sin tratar; 2, cA549per/UV; 3 cA549per/calor; control negativo cA549m. (Kruskall-Wallis test;  $\chi^2 = 5.6416$ , d.f. = 2,  $P = 0.0067$ ).

### 3.6 Participación de IL-1 $\alpha$ en la inducción de la síntesis del mRNA y de la proteína de CXCL8.

Considerando que IL-1 $\alpha$  es uno de los inductores más importantes de CXCL8 (172), se determinó por ELISA su concentración en los sobrenadantes cA549per, cA549a y cA549norm antes y después del tratamiento con UV o calor. Por este método solo pudo cuantificarse la concentración de IL-1 $\alpha$  en cA549a, mientras que para cA549a inactivado y para cA549per sin tratar y tratado no se detectaron niveles cuantificables de IL-1 $\alpha$ , considerando que el resultado anterior estuviera asociado a la sensibilidad de la ELISA (sensibilidad 15 pg/ml), y para descartar completamente la participación de IL-1 $\alpha$  como inductor de CXCL8, los sobrenadantes cA549a, cA549per y cA549norm se

trataron con el antagonista del receptor celular para IL-1 (rIL-1ra; RD systems) de acuerdo a lo descrito por Patel, et al (172). Los resultados muestran que los valores de CXCL8/ $\beta$ -2 para el sobrenadante de las células persistentemente infectadas no tuvieron cambios antes y después del tratamiento con el antagonista del receptor para IL-1 $\alpha$  (Fig. 11), no así con el sobrenadante de una infección aguda, para el cual tanto la expresión del mRNA como la concentración de proteína de CXCL8 disminuyeron (Fig. 11), lo que indica la participación de IL-1  $\alpha$ , en la inducción de CXCL8, pero únicamente para el caso de una infección aguda. Por otra parte, de acuerdo con los resultados obtenidos para el sobrenadante cA549per, IL1 $\alpha$  no tiene participación en la inducción continua de CXCL8 en los cultivos persistentemente infectados.

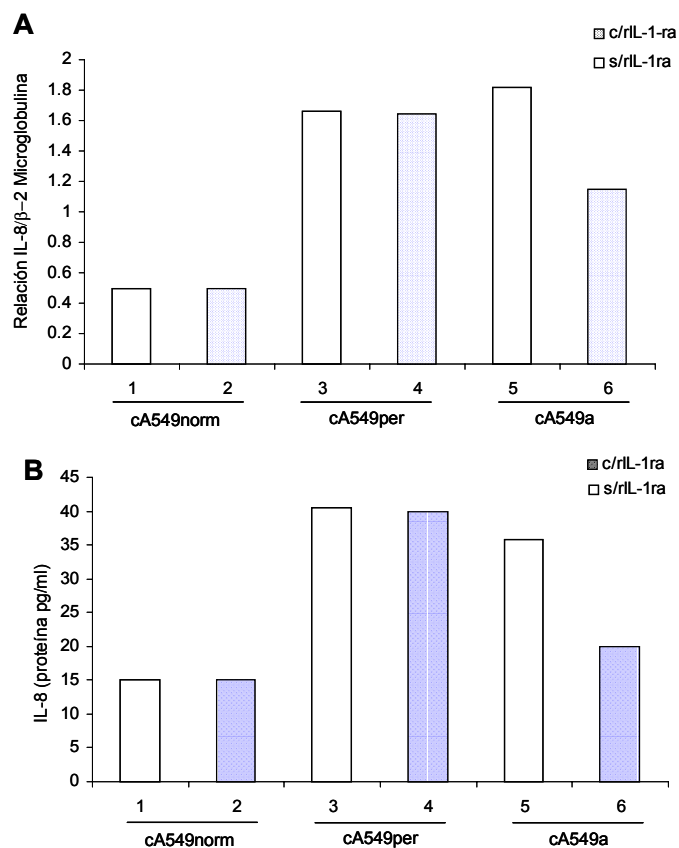


Figura 11A y B. IL-1 $\alpha$  y su participación en la inducción de CXCL8. **A.** Histograma de la relación de los mRNA CXCL8/ $\beta$ -2 microglobulina de cA549per tratado y sin tratar con el antagonista del receptor celular para IL-1 (rIL-1ra). **B.** ELISA para determinar CXCL8 extracelular. Barra 1, cA549norm sin tratar; 2, cA549norm/rIL-1ra; 3, cA549per sin tratar; 4, cA549per/rIL-1ra; 5, cA549a; 6, cA549a/rIL-1ra.

### **3.7 Identificación de los componentes virales que participan en la inducción de la síntesis del mRNA de CXCL8.**

Los resultados obtenidos sugieren que componentes virales solubles presentes en el sobrenadante cA549per están involucrados en la inducción de la síntesis del mRNA de CXCL8, por lo que se decidió retirar componentes de cA549per por inmunoprecipitación y determinar la inducción con la fracción soluble recuperada. El sobrenadante cA549per se inmunoprecipitó con anti-VSR comercial. Sin embargo, el tratamiento no resultó eficiente para la remoción de los componentes ya que en la fracción soluble del inmunoprecipitado se identificaron por inmunoblot dos proteínas virales con peso molecular aparente entre 35 y 70 kDa. Este resultado se observó también para el sobrenadante obtenido a partir de una infección aguda con VSR, por lo tanto, los ensayos de inducción de CXCL8 con estas fracciones solubles resultaron positivos. Debido a estos datos, la fracción soluble recuperada de la inmunoprecipitación se precipitó con PEG 8000. Después de la precipitación, con PEG, las fracciones recuperadas, el sobrenadante (sPEG) y el pellet (pPEG) se analizaron por geles en gradiente (8-20%) y las proteínas presentes se identificaron por ensayo de inmunoblot con un anticuerpo policlonal anti-VSR comercial. Los resultados mostraron que el anti-VSR comercial identifica a proteínas virales con un peso molecular entre 40-70 kDa. De manera interesante, este rango de peso molecular aparente coincide con los reportados para las proteínas virales F y/o G (Fig. 12A). Para confirmar el resultado anterior, las fracciones de PEG (sPEG y pPEG) se separaron nuevamente en geles en gradiente y el ensayo de inmunoblot se realizó con anticuerpos monoclonales anti-F (48F) y anti G (64G). Los datos obtenidos de estos ensayos demostraron que ambas

glicoproteínas virales se encontraban en la fracción soluble del sobrenadante cA549per analizada, ya que los pesos moleculares aparentes de las bandas identificadas corresponden a los valores reportados (43-45 y 74 kDa) (1, 173), como se muestra en la figura 12B. Los resultados anteriores sugieren que estas glicoproteínas virales son secretadas al medio extracelular y pueden participar como mediadores solubles en cA549per en la inducción de la síntesis del mRNA y la secreción de la proteína de CXCL8.

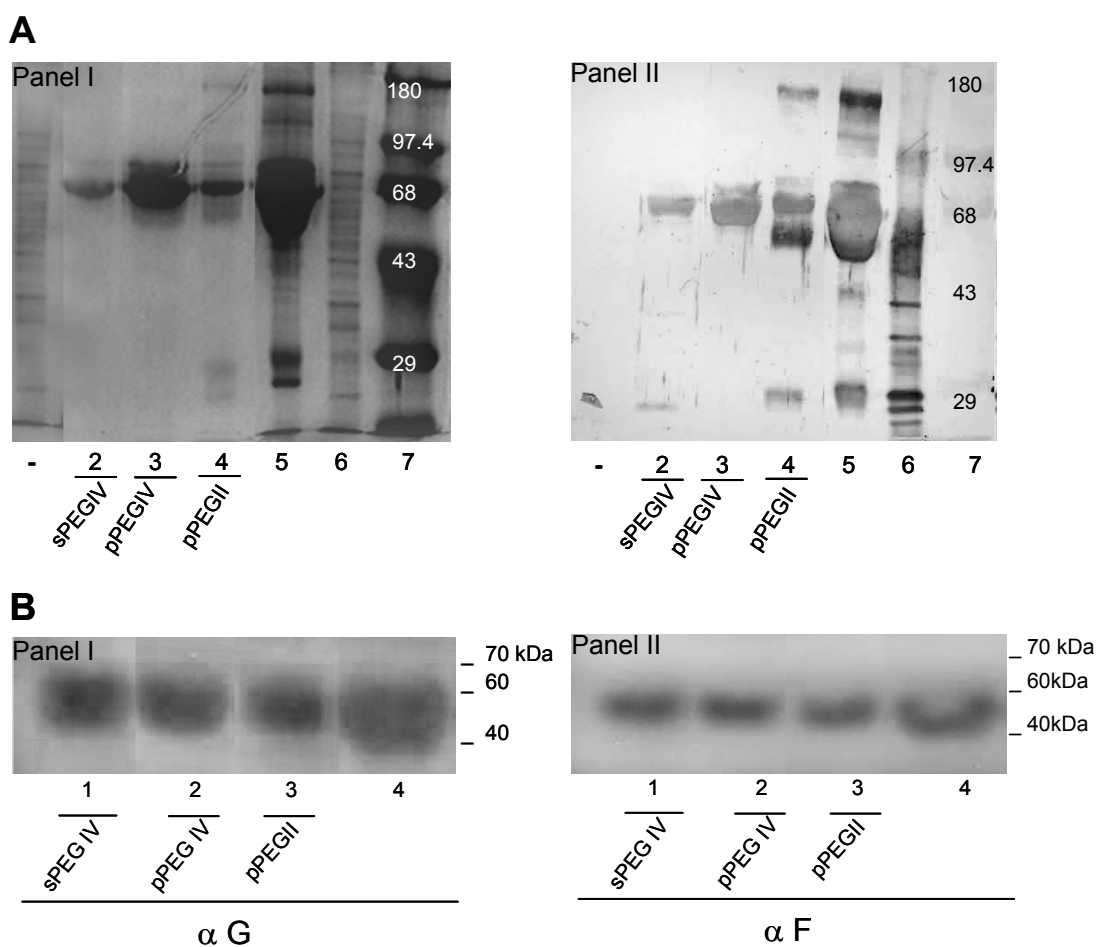


Figura 12 A y B. Identificación de los componentes virales presentes en cA549per. **A.** SDS-PAGE en gradiente (8-20%), tinción de plata. Panel II. Para el ensayo de inmunoblot se utilizó como primer anticuerpo un policlonal anti-RSV comercial y como segundo un anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa y revelado con el sistema de detección ECL (Amersham). Carril 1, cA549norm (-); carril 2, cA549per, sPEGIV; carril 3, cA549per, pPEGIV; carril 4, pA549per, pPEGII; carril 5, cA549per; carril 6, cA549a; carril 7 Marcadores de peso molecular. **B.** Reconocimiento de las glicoproteínas virales en cA549per con anticuerpos monoclonales. Para el ensayo de inmunoblot se utilizó como primer anticuerpo un monoclonal anti-G o anti-F y como segundo un anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa y revelado con el sistema de detección ECL (Amersham). Panel I (anti-G). Panel II (anti-F). Carril 1, cA549per, sPEGIV; carril 2, cA549per, pPEGIV; carril 3, cA549per, pPEGII; carril 4, cA549per.

### **3.8 Inducción del mRNA y de la proteína de CXCL8 por la interacción de las glicoproteínas virales F y G solubles presentes en cA549per con su receptor.**

De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente se demostró que: 1) la replicación viral no es un factor indispensable para la inducción de la síntesis del mRNA de CXCL8; 2) la presencia de mediadores solubles en cA549per inducen la síntesis del mRNA y la secreción de proteína de CXCL8; y 3) la identificación de proteínas virales, específicamente las glicoproteínas F y G (solubles) en cA549per. En conjunto, estos datos sugieren que la interacción de estas proteínas virales solubles con su receptor podría ser el factor responsable de la inducción continua de la síntesis del mRNA y secreción de la proteína de CXCL8 en el cultivo A549per. Para demostrar lo anterior se propuso realizar un ensayo de interacción entre células A549norm y cA549per inmunoprecipitado y concentrado con PEG 8000. Los resultados demostraron que un minuto de interacción es suficiente para incrementar tanto la inducción de la síntesis del mRNA así como la secreción de la proteína de CXCL8 con respecto a los niveles basales (Fig. 13), estos datos sugirieron que el solo evento de interacción del ligando con su receptor es el factor responsable de los cambios observados en la inducción de la síntesis del mRNA de CXCL8 en el cultivo A549per.

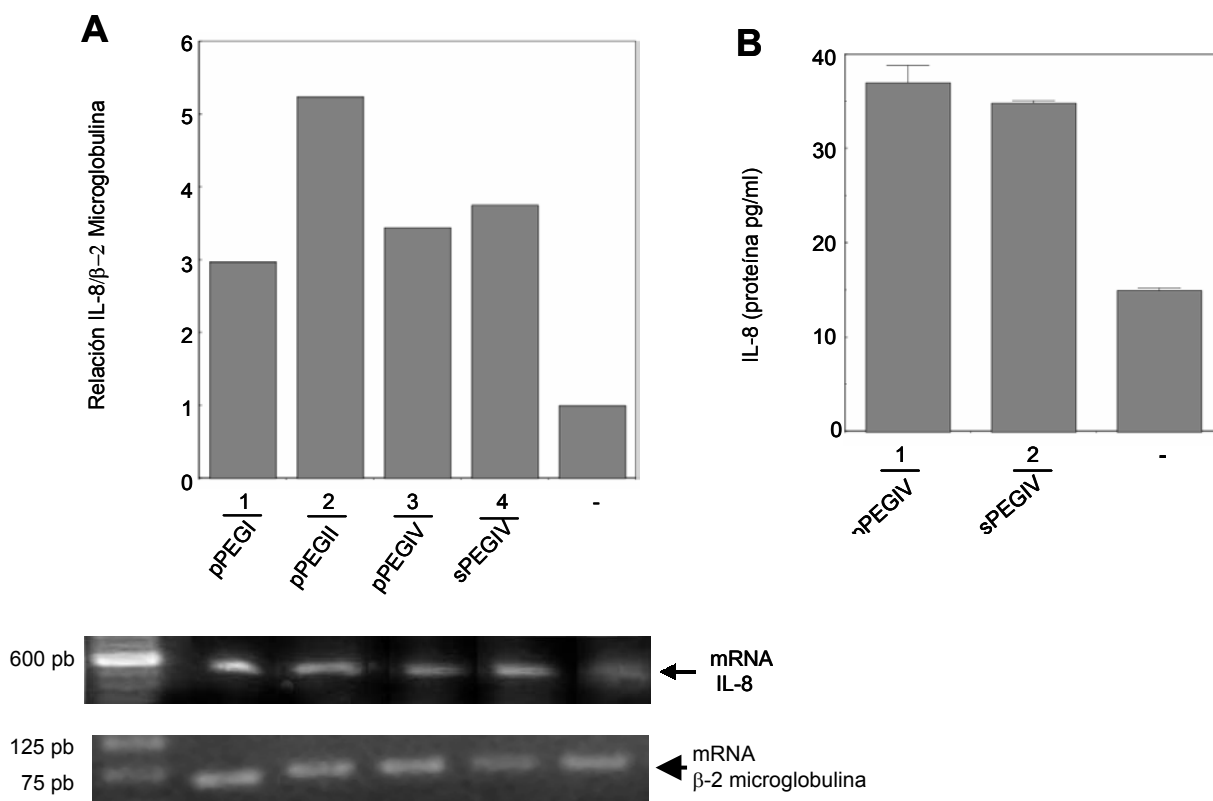


Figura 14A y B. Participación de las glicoproteínas virales de cA549per en la inducción de CXCL8 después de un minuto de interacción con células A549norm. **A.** Ensayo de RT-PCR para el mRNA de CXCL8. Carril 1, cA549per, pPEGI; 2, cA549per, pPEGII; 3, cA549per, pPEGIV; 4, cA549per, sPEGIV. Control negativo cA549norm (-). (Kruskall-Wallis test;  $\chi^2 = 13.6216$ ,  $P \leq 0.0086$ ). **B.** ELISA para determinar CXCL8 extracelular. Barra 1, cA549per, pPEGIV; 2, cA549per, sPEGIV. Control negativo cA549m (-). (Kruskall-Wallis test;  $\chi^2 = 5.6471$ ,  $P=0.0594$ ).

## Discusión

### 1. Establecimiento y caracterización de la infección persistente.

Se han obtenido infecciones persistentes con diversos virus de RNA en diferentes líneas celulares, en algunas de ellas se han utilizado factores externos como anticuerpos antivirales o agentes lisosomotrópicos para lograr la persistencia, o bien se han utilizado suspensiones virales enriquecidas con partículas defectuosas (174), o con mutantes termosensibles (175) o usando células semi-permisivas a la infección (86).

Para el establecimiento del cultivo persistentemente infectado (A549per) en el laboratorio se abordaron diferentes estrategias tales como 1) infección en presencia de anticuerpos antivirales, esto con el objetivo de neutralizar el virus extracelular producido por las células infectadas y con ello evitar la infección de la población celular no infectada inicialmente; 2) infección en presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , el uso de este agente lisosomotrópico tuvo como objetivo reducir la eficiencia de infección en los cultivos celulares ya que inhibe la entrada del virus a la célula por fusión con membranas internas (endocitosis) (176) y 3) infectar a diferentes multiplicidades de infección (0.001, 0.01, 0.1 y 1). Sin embargo, las dos primeras estrategias así como la infección a multiplicidades de 0.01, 0.1 y 1 no resultaron exitosas debido a la alta mortalidad celular, por lo que fue difícil recuperar un cultivo persistente a partir de un porcentaje muy bajo de células viables que además probablemente no estaban infectadas.

El cultivo persistentemente infectado (A549per) se logró establecer cuando las células A549 se infectaron a una multiplicidad de 0.001, si bien es cierto que a esta multiplicidad de infección el porcentaje de células infectadas



inicialmente fue muy bajo, no obstante, esto garantizó una tasa de replicación baja que con llevo a una menor producción de virus extracelular y, por lo tanto, disminuyó la tasa de mortalidad celular, con esta estrategia se recuperó un mayor número de células viables que pudieron subcultivarse, a partir de las cuales se estableció el cultivo A549per. Durante los pases del cultivo A549per no se observó un cambio significativo en la tasa de crecimiento entre las células infectadas persistentemente y los cultivos de células normales, tampoco se observó lisis celular, sin embargo, en algunos pases fue posible observar de forma transitoria la formación del sincitio característico del VSR. A pesar de la presencia de sincitios en algunos de los pases del cultivo A549per nunca se presentaron periodos de crisis asociados al incremento en la producción de virus extracelular y como consecuencia el incremento en la tasa de mortalidad como se reporta para otros cultivos persistentes (177).

El cultivo A549per se caracterizó por niveles mínimos de producción de virus extracelular que no fue posible cuantificar ni por TCID<sub>50</sub>, ni por ensayo en placa, este resultado se explica considerando que la cantidad de partículas infectivas estaba por debajo de los límites de sensibilidad de las técnicas utilizadas, por lo que fue necesario hacer la determinación de partículas infectivas por ensayo de focos de infección; los resultados obtenidos de este ensayo demostraron la presencia de partículas infectivas en todos los sobrenadantes analizados. Los datos obtenidos de este ensayo indican que las células que expresan antígeno viral pudo deberse a la presencia de virus infectivo y partículas virales defectuosas. Las partículas defectuosas tienen, como se ha reportado para otros virus de RNA (178),

participación en el establecimiento y mantenimiento de una infección persistente. No obstante, la participación de estas partículas en el establecimiento del cultivo A549per queda descartada principalmente por dos razones, la primera de ellas es que en el stock viral a partir del cual se inicio la infección no se detectaron partículas defectuosas ni por ensayo de interferencia a la infectividad ni por gradiente de sacarosa y la segunda es que la infección se estableció a una baja multiplicidad de infección lo que reduce inicialmente la replicación de partículas defectuosas. Sin embargo, nuestros resultados sugieren la participación de estas partículas defectuosas en el mantenimiento de la infección persistente, puesto que aparecieron y se mantuvieron presentes durante todos los pases. Nuestros datos coinciden con lo descrito por Holland JJ et al (178), quienes reportan una infección persistente con VSV (virus de la familia Paramixoviridae), que se caracteriza por la presencia constante de partículas defectuosas y un alto porcentaje de células que expresan antígeno viral aun cuando hay una baja producción de virus extracelular, lo que sugiere, según los autores, que las partículas defectuosas son necesarias para mantener un estado no citocida y así modular la virulencia en células altamente susceptibles a la infección como es el caso de las células A549.

La cuantificación del porcentaje de células que expresaban antígeno viral en el cultivo A549per por citometría de flujo fluctuó entre 25 y 98%, además un dato importante de señalar es que en algunos de los pases analizados se encontraron subpoblaciones celulares que expresaron antígeno viral en diferente proporción (Fig. 6C). Además de evaluar la expresión de antígeno viral en la superficie de las células A549per, la persistencia se confirmó por

la presencia del genoma viral en todos los pases analizados del cultivo A549per.

El modelo de persistencia desarrollado en este trabajo, permite estudiar el efecto de la continua presencia y expresión del genoma viral en la síntesis de mediadores celulares proinflamatorios (CXCL8), que han sido asociados a procesos crónicos pulmonares y que se sugiere pudieran estar relacionados con infecciones por VSR durante la infancia.

## **2. Efecto de la persistencia viral en la inducción de la interleucina 8 (CXCL8).**

En el análisis del efecto de la persistencia viral sobre la síntesis de CXCL8, nuestros resultados demostraron que en los diferentes pases analizados del cultivo A549per se indujo la síntesis del mRNA de CXCL8. Los valores de la relación  $CXCL8/\beta\text{-}2_{(mRNA)}$  para los pases analizados fluctuaron entre 2 a 2.7, indicando que no hubo diferencia significativa entre ellos, en cambio si difieren del valor basal que fue de 1.0 en células A549 normales, estos datos sugirieron que la persistencia del VSR podría estar induciendo en forma continua la síntesis del mRNA de CXCL8.

## **3. Participación de los componentes extracelulares (virales y/o celulares) presentes en el sobrenadante del cultivo persistentemente infectado en la inducción de CXCL8.**

En estudios recientes (172), se demostró la presencia de mediadores solubles presentes en el medio condicionado obtenido a partir de una infección aguda con VSR y su participación en la inducción de CXCL8. De acuerdo con estos antecedentes y los resultados observados en la inducción de CXCL8 en los pases del cultivo A549per, se consideró factible

la presencia de mediadores solubles en el sobrenadante cA549per del cultivo A549per y, por lo tanto, se determinó en una cinética de infección contra el tiempo (cA549per vs células A549 normales), su participación en la inducción de CXCL8. Los datos obtenidos demostraron la presencia de mediadores solubles que indujeron la síntesis de CXCL8. Es importante mencionar que la inducción del mRNA de CXCL8 mediada por el sobrenadante de los cultivos A549per se observó desde las 4 horas posinfección con un valor de relación  $CXCL8/\beta\text{-}2_{(mRNA)}$  de 7.5, mientras que el valor para el control fue de 0.5; este incremento en la inducción de CXCL8 coincide con lo reportado con Patel, et al (172), quien demostró que la inducción con el medio condicionado (mediadores solubles) se presentó a las 4 horas posinfección, no así, con la suspensión viral purificada que obtuvieron, la cual indujo hasta las 8 horas posinfección. Nuestros datos también coinciden con lo reportado por Fiedler (137) quien señala una inducción de fase inicial independiente de la replicación viral (2 horas después de la infección). Sin embargo, este autor señala que durante la fase tardía de inducción de CXCL8, el proceso de replicación viral es un requisito indispensable para mantener los niveles de inducción. Esta observación es válida para nuestros resultados de 24 horas posinfección, para el cual el valor de la relación de  $CXCL8/\beta\text{-}2_{(mRNA)}$  fue de 5 comparado contra el control, cuyo valor fue de 0.5.

En cambio, se observa una disminución en los valores de la relación  $CXCL8/\beta\text{-}2_{(mRNA)}$  en la cinética en los puntos 48 y 96 horas posinfección de 3.7 y 3.5, respectivamente. El decremento en la inducción, reflejado por los valores de la relación  $CXCL8/\beta\text{-}2_{(mRNA)}$ , puede deberse a una baja tasa de

replicación viral, relacionada con la presencia de partículas defectuosas en el sobrenadante del cultivo A549per (179) y /o al mecanismo autocrino de regulación de la inducción de CXCL8 de acuerdo a lo reportado por Patel, et al (172).

**4. Efecto del tratamiento de los sobrenadantes cA549per con UV, calor o con el antagonista del receptor de IL-1 $\alpha$  en la síntesis del mRNA de CXCL8.**

El incremento observado en la inducción del mRNA de CXCL8 a 24 horas posinfección con el sobrenadante cA549per (valores de la relación CXCL8/ $\beta$ -2<sub>(mRNA)</sub> fueron de 5 y 1.0 respectivamente), sugiere la participación de la replicación viral y/o factores celulares presentes en el sobrenadante del cultivo A549per, para confirmar lo anterior se realizaron los ensayos de inducción, utilizando el sobrenadante cA549per inactivado con UV o calor.

Los resultados demostraron la inducción del mRNA y de la proteína de CXCL8 aún con los sobrenadantes de A549per inactivados, lo que indica que el proceso de inducción fue independiente de la replicación viral. No obstante este resultado no descartamos la participación de factores celulares en la regulación de CXCL8, como lo reportado por Patel, et al (172) quien demuestra la participación de IL-1 $\alpha$  en la inducción de CXCL8.

Para descartar la participación de IL-1 $\alpha$  se realizó la determinación de esta citocina en el sobrenadante cA549per sin tratar o tratado con UV o calor. Nuestros datos indicaron que la inducción del mRNA de CXCL8 y la producción de la proteína extracelular de CXCL8 no estaba regulada por IL-1 $\alpha$  ya que no fue detectada en los sobrenadantes del cultivo A549per tratados y sin tratar, lo que sugirió la ausencia de IL-1 $\alpha$  en los sobrenadantes cA549per, o bien que los niveles de IL- $\alpha$  estuvieran por

debajo de la sensibilidad de la técnica. Para descartar completamente la participación de IL-1 $\alpha$  en la inducción se realizó el ensayo con el antagonista del receptor celular de IL-1 $\alpha$ . Los datos obtenidos de este ensayo demostraron que el tratamiento del sobrenadante del cultivo A549per con el antagonista del receptor celular no mostró cambios significativos en el valor de la relación de CXCL8/ $\beta$ -2<sub>(mRNA)</sub> (Fig. 11A) ni en la producción la proteína de CXCL8 extracelular (11B). Con este ensayo se descartó la presencia de IL-1 $\alpha$  en el sobrenadante del cultivo A549per y su participación como mediador soluble inductor de CXCL8.

#### **5. Componentes virales que participan en la inducción de la síntesis del mRNA de CXCL8.**

Con la finalidad de identificar los componentes virales presentes en el sobrenadante de cA549per, responsables de la inducción de CXCL8, se realizó una inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo policlonal comercial anti-VSR, los resultados mostraron que aún después del tratamiento se identificaron dos proteínas virales con un peso molecular aparente entre 40-75 kDa en la fracción soluble. Debido a la limitante del ensayo de inmunoprecipitación para retirar en su totalidad los componentes virales se decidió precipitar la fracción soluble con PEG, sin embargo, aun cuando se realizaron precipitaciones sucesivas el resultado fue similar al obtenido con la inmunoprecipitación ya que al analizar el cA549per tratado con PEG 8000 se identificó en la fracción soluble una banda ancha con un peso molecular aparente de entre 40 y 70 kDa. De acuerdo con este rango de peso molecular, los datos sugerían a las proteínas virales F y/o G. Utilizando los

anticuerpos monoclonales 48F o 64G se identificaron a las glicoproteínas F y G solubles (180). Nuestros resultados sugieren la posible participación de ambas glicoproteínas como mediadores solubles de la inducción de CXCL8. Para establecer la participación de las proteínas virales F y G en la inducción de CXCL8, se llevo a cabo un ensayo de proteólisis exhaustiva del sobrenadante cA549per con tripsina al 1.5% durante 5 horas a 37°C. Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento proteolítico destruyó la actividad inductora de los sobrenadantes, ya que no se observó incremento en los valores de la relación de CXCL8/ $\beta$ -2 ni para el mRNA ni para la proteína en las células A549norm tratadas con los sobrenadantes proteolizados. Conjuntamente, no fue posible detectar las bandas correspondientes a las glicoproteínas virales por ensayo de inmunoblot. No obstante este resultado no descartamos la participación de otras proteínas virales que pudieran participar en la inducción.

**6. Inducción del mensajero y de la proteína CXCL8 por la interacción de las glicoproteínas virales F y G solubles en cA549per con su receptor.**

La identificación de las glicoproteínas virales como componentes del sobrenadante cA549per y su posible participación como mediadores solubles en la inducción de CXCL8 en los cultivos persistentemente infectados nos sugirió que probablemente el proceso de inducción estuviera mediado por la interacción de estas proteínas virales con su receptor (142, 180-184); para probar esta hipótesis se realizaron ensayos de inducción por un minuto, como se describe en el punto 2.12 de material y métodos. Nuestros datos indicaron que la inducción de CXCL8 en los cultivos

A549per es resultado de la interacción de estas proteínas virales en su forma soluble con su receptor.

La patogénesis de los padecimientos crónicos recurrentes asociada a VSR es un proceso multifactorial, no obstante, uno de estos factores es CXCL8, cuya participación se ha señalado ampliamente en procesos inflamatorios crónicos tales como asma, hiperreactividad y obstrucción crónica pulmonar entre otros. Además, de acuerdo con lo reportado por Jafri, et al (185), la persistencia de algunos de estos factores puede contribuir a alteraciones de la función pulmonar así como en anomalías histológicas, sin ser necesaria la replicación viral. Estudios recientes sugieren que la patogénesis de padecimientos crónicos pulmonares pudiera deberse a la asociación entre VSR y CXCL8. El desarrollo del modelo *in vitro* **A549per** que se describe en esta tesis permite estudiar el efecto de la persistencia viral en la inducción continua de CXCL8 y analizar su contribución en la patogénesis de padecimientos crónicos pulmonares.



## Conclusiones

- Se estableció la infección persistente con el virus sincitial respiratorio en células A549.
- La persistencia viral indujo en el cultivo A549per, la síntesis continua del mRNA de CXCL8 en una proporción de 2 a 2.5 vs 0.5 del control de células A549 normales.
- El medio condicionado obtenido de cA549per induce la producción y secreción de CXCL8 en células A549norm.
- Se identificaron a las glicoproteínas virales F y G solubles como componentes de cA549per.
- El tratamiento proteolítico del cA549per (F y G solubles), anuló la inducción del mRNA y de la proteína de CXCL8 en células A549 normales.
- La inducción del mRNA de CXCL8, así como, la producción y secreción de la proteína en células A549 por cA549per son eventos que podrían estar asociados a las glicoproteínas virales F y G solubles.

## **Perspectivas**

Nuestros resultados demostraron la presencia de las glicoproteínas F y G solubles en el sobrenadante cA549per y con base en estos datos sugerimos que estas proteínas son posibles responsables de la inducción continua de CXCL8 en los cultivos A549per como resultado de la interacción con su receptor. Para demostrar lo anterior se propone analizar de forma individual su participación en la inducción de la siguiente forma: 1) tratar al sobrenadante cA549per con los anticuerpos 48F ó 64G y 2) evaluar la inducción del mRNA y la proteína de CXCL8 en células A549 normales de acuerdo a los protocolos descritos en el apartado de material y métodos. Conjuntamente, tratar células A549 con diferentes mutantes de VSR ya reportadas en la literatura (rgVSR-F (186), rgVSR-SF (186) y VSR-ΔGs (187) y determinar su efecto tanto en la síntesis del mRNA como en la producción y secreción de la proteína de CXCL8, de acuerdo con la metodología reportada en material y métodos. También se plantea evaluar por ensayos de quimiotaxis la actividad biológica de CXCL8 presente en los sobrenadantes del cultivo persistentemente infectado en presencia y en ausencia anti-CXCL8.

## **Apendice**

### **MATERIAL Y REACTIVOS.**

#### Células y Virus:

Células Vero, ATCC (CCL 81)

Células A549 donada por el Dr. A. Brassier (Departament of Pediatrics, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas)

Cepa Long del Virus Sincitial Respiratorio (VSR), donada por el Dr. Michael Trudel (Instituto Armand Frappier, Ville de Laval, Canadá).

#### Medios y suplementos para cultivo:

Medio de cultivo para las células VERO y A549.

DMEM (GIBCO 12100-046)

DMEM suplementado con 5% de SFB, 2.2 g/lit de Hepes, 2.2. g/lit de bicarbonato de sodio, 2 mM de concentración final de glutamina

Suero fetal bovino (GIBCO-BRL 10437-028)

Hepes (SIGMA H-0763)

Bicarbonato de sodio (Productos químicos Monterrey 1290)

Glutamina (SIGMA G-1517)

#### Reactivos:

NaCl (MERCK 6404)

Cloruro de calcio anhidro (JT Baker 790)

Cloruro de potasio (Merck 6404)

Acido acético (JT Baker 9507-05)

Acido sulfúrico (JT Baker 9604-05)

Citrato de sódio (JT Baker 3646)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck 6586)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (J.T. Baker 790)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (JT Baker 4873)

MgSO<sub>4</sub> (J.T. Baker 2500)

EDTA (JT Baker 8993)

EDTA (SIGMA E-5134)

Tween 20 (BIO-RAD 170-6531)

TRIS-HCl (SIGMA 3253)

Tripsina (SIGMA 1989)  
Rojo Neutro (Sigma N-7005)  
Albúmina Sérica Bovina (SIGMA A-3350)  
Polilisina (SIGMA P-1399)  
Polietilenglicol (PEG 6000 SIGMA, P-2138)  
3,-3' Diamino benzidina (SIGMA D-5637)  
Sacarosa (Merck K-3985251)  
Agarosa (SIGMA A-6013)  
Metanol (Merck MX04488-1)  
Acetona (Merck 15852)  
Paraformaldehído (SIGMA P6148)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Productos químicos Monterrey 5600)  
Acrilamida (BIO-RAD 161-0101)  
Bis-acrilamida (BIO-RAD 161-0201)  
2-Mercapto etanol (BIO-RAD 21277)  
Urea (JT Baker 4204)  
Isotiocianato de guanidina (GIBCO 15535-016)  
N-lauril sarcocilato de sodio (SIGMA L-5125)  
Fenol (GIBCO 15509-011)  
Acetato de sodio (Merck 6267)  
Etanol (Merck 15853)  
Isopropanol (Merck 21582)  
Cloroformo (Merck 15854)  
Alcohol isoamílico (SIGMA I-9392)  
Agarosa grado molecular (BIO-RAD 162-0134)  
Bromuro de etidio (BIO-RAD 161-0430)  
Dietilpirocarbonato (DEPC D5758)  
dNTP's (Invitrogen 18427-013)  
Superscript II (GIBCO-BRL 18064-014)  
Inhibidor de RNasa (GIBCO-BRL 15518-012)  
Taq DNA polimerasa (GIBCO-BRL 10342-053)  
Oligo-dT (GIBCO 18418 012)  
DTT (GIBCO 15508-013)  
Proteína A-sepharosa (SIGMA P-6649)

Proteína A-agarosa (GIBCO 15918 014)  
Adyuvante completo de Freund (SIGMA F-4258)  
Adyuvante incompleto de Freund (SIGMA F-5506)  
Triton X-100 (SIGMA X-100)  
Desoxicolato de sodio (D-6750)

Anticuerpos y conjugados.

Inmunoglobulinas clase G (IgG's) obtenido y purificado en el laboratorio  
Anti-IgG conejo conjugado con peroxidasa, obtenido en cabra (Amersham NA 933)  
Anti-IgG conejo conjugado con FITC, obtenido en burro (Amersham N 1034).  
Anti-VSR (Biogenesis )  
Anti-IgG de cabra (ZYMED 81-1620)  
Anticuerpos monoclonales anti-F y anti-G fueron donados por el Dr. José Antonio Melero del Instituto de Salud Carlos Tercero, Madrid, España.  
Anti-ratón conjugado con peroxidasa (ZYMED 62-6720)

Amortiguadores y soluciones.

PBS  
NaCl 8 gr  
KCl 0.2 gr  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.96 gr  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 gr  
Se afora a 1 litro, se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza por autoclave

TNE

Tris-HCl 50 mM, pH 7.5  
NaCl 0.1M  
EDTA 10 mM

EARLE

CaCl<sub>2</sub> anhidro 0.002 gr.  
KCl 0.004 gr

MgSO<sub>4</sub>-7 H<sub>2</sub>O 0.02 gr

NaCl 0.668 gr

NaHCO<sub>3</sub> 0.22 gr.

D-Glucosa 0.1 gr.

Para el ensayo de interferencia utilizar rojo neutro 3.3 mg.

Aforar a 100 ml.

#### TAE (50X)

Tris base 242 gr

57.1 ml de ácido acético glacial

100 ml de EDTA 0.5M, pH=8

#### TE

Tris HCl 10 mM

EDTA 1mM

pH=7.5

#### Amortiguador de carga para geles de agarosa.

Glicerol 1% en TAE 1X

Orange G (Sigma O-1625) trazas.

Bromuro de etidio 10 µg/ml en agua estéril.

#### Material de plástico.

Portaobjetos de poliestireno de 8 pozos (Nunc 177445).

Botellas para cultivo celular de 162 cm<sup>2</sup>

Cajas petri para cultivo celular 60 cm<sup>2</sup>

Cajas petri para cultivo celular 100 cm<sup>2</sup>

Placas de 96 pozos para cultivo celular

Placas de 6 pozos para cultivo celular

Tubos Eppendorf presiliconizados de 0.6 y 1.5 (Costar 3208 y 3210).

## INDICE DE ABREVIATURAS

**VSR** Virus sincitial respiratorio

**DMEM<sub>c</sub>** DMEM completo, Medio mínimo esencial Dulbecco modificado suplementado con suero bovino fetal

**DMEM<sub>i</sub>** DMEM incompleto, Medio mínimo esencial Dulbecco modificado sin suero bovino fetal para infectar

**UV** Luz ultravioleta

**CTLs** Células T citotóxicas

**NK** Células asesinas naturales

**IL** interleucinas

**CXCL8** Interleucina 8

**mRNA** RNA mensajero

**DNAc** DNA complementario

**β-2** β-2- microglobulina

**A549norm** células A549 normales

**A549per** Células A549 infectadas persistentemente

**A549a** Células A549 infectadas en forma aguda

**cA549per** sobrenadante de cada pase del cultivo persistente

**cA549a** sobrenadante de células A549 infectadas con el virus sincitial respiratorio en forma aguda

**cA549norm** sobrenadante de células A549 normales

**anti-F (48F)** Anticuerpo monoclonal anti-proteína de fusión

**anti-G (64G)** Anticuerpo monoclonal anti-proteína de unión

**sPEG** sobrenadante obtenido de la precipitación con polietilenglicol

**pPEG** precipitado obtenido la precipitación con polietilenglicol

**pPEGI** precipitado obtenido de la primera precipitación con polietilenglicol

**pPEGII** precipitado obtenido de la segunda precipitación con polietilenglicol

**pPEGIV** precipitado obtenido de la cuarta precipitación con polietilenglicol

**Gm** proteína G anclada a la membrana

**Gs** proteína G soluble

**rgVSRF** mutante con delección en los genes G y SH

**rgVSRSF** mutante con delección del gen G

**ΔGsVSR** mutante con delección de la proteína G soluble

## Bibliografia

1. P.L. Collins, R.M. Chanock, B.R. Murphy, in: D.M. Knipe, P.M. Howley (Eds), *Fields Virology*, Lippincott Williams & Williams, Philadelphia, 2001, pp 1443-1485.
2. J. Curran, D. Kalakofsky. Replication of paramyxoviruses. *Adv. Virus Res.* 54 (1999) pp 403-22.
3. R. Fearn , P.L. Collins , M.E. Peeples. Functional analysis of the genomic and antigenomic promoters of human respiratory syncytial virus. *J Virol.* 74 (2000) pp 6006-14.
4. R.W. Hardy, G.W. Wertz. The Cys(3)-His(1) motif of the respiratory syncytial virus M2-1 protein is essential for protein function. *J Virol.* 74 (2000) pp 5880-5.
5. R.S. Tang, N. Nguyen, X. Cheng, H. Jin. Requirement of cysteines and length of the human respiratory syncytial virus M2-1 protein for protein function and virus viability. *J Virol.* 75 (2001) pp 11328-35.
6. R. Fearn, P.L. Collins. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol.* 73 (1999) pp 5852-64.
7. A. Bermingham, P.L. Collins. 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 U S A.* 96 (1999) pp 11259-64.
8. H. Jin, X. Cheng, H.Z. Zhou, S. Li, A. Seddiqui. Respiratory syncytial virus that lacks open reading frame 2 of the M2 gene (M2-2) has altered growth characteristics and is attenuated in rodents. *J Virol.* 74 (2000) pp 74-82.
9. P.L. Atreya, M.E. Peeples, P.L. Collins. The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication.
10. B. Bossert, K.K. Conzelman. Respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural (NS) proteins as host range determinants: a chimeric bovine RSV with NS genes from human RSV is attenuated in interferon-competent bovine



cells. *J Virol.* 76 (2002) pp 4287-93.

11. M.A. Mufson, C. Orvell, B. Rafnar, E. Norrby. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 66 (1985) pp 2111-24.

12. L.J. Anderson, J.C. Hierholzer, C. Tsou, R.M. Hendry, B.F. Fernie BF, Y. Stone, K: McIntosh. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis.* 151 (1985) pp 626-33.

13. P.R. Johnson, R.A. Olmsted, G.A. Prince, B.R. Murphy, D.W. Alling, E.E. Walsh, P.L. Collins. Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation of the contributions of F and G glycoproteins to immunity. *J Virol.* 61 (1987) pp 3163-6.

14. W.B. Coggins, E.J. Lefkowitz, W.M. Sullender. Genetic variability among group A and group B respiratory syncytial viruses in a children's hospital. *J Clin Microbiol.* 36 (1998) pp 3552-7.

15. G.W. Wertz, R.M. Moudy. Antigenic and genetic variation in human respiratory syncytial virus. *Pediatr Infect Dis J.* 23 (2004) pp S19-24.

16. P.A. Cane. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol.* 11 (2001) pp 103-16.

17. W.M. Sullender, M.A. Mufson, G.A. Prince, L.J. Anderson, G.W. Wertz. Antigenic and genetic diversity among the attachment proteins of group A respiratory syncytial viruses that have caused repeat infections in children. *J Infect Dis.* 178 (1998) pp 925-32.

18. K.T. Zlateva, P. Lemey, E. Moes, A.M. Vandamme, M. Van Ranst. Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. *J Virol.* 79 (2005) pp 9157-67.

19. J. Lofgren, M. Ramet, M. Renko, R. Marttila, M. Hallman. Association between surfactant protein A gene locus and severe respiratory syncytial virus infection in infants. *J Infect Dis.* 185 (2002) pp 283-9.

20. M.H. Kerr, J.Y. Paton. Surfactant protein levels in severe respiratory syncytial virus infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 159 (1999) pp 1115-8.

21. J.L. Alcorn, J.M. Stark, C.L. Chiappetta, G. Jenkins, G.N. Colasurdo. Effects of RSV infection on pulmonary surfactant protein SP-A in cultured

human type II cells: contrasting consequences on SP-A mRNA and protein. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 289 (2005) pp L1113-22.

22. C.H. Breese. Prospects for a respiratory syncytial virus vaccine. *Science* 265 (1994) pp 1393-4.

23. K. McIntosh. Respiratory syncytial virus successful immunoprophylaxis at last. *N Engl J Med.* 329 (1993) pp 1572-4

24. A.D. Tristram, C.R. Welliver. Respiratory syncytial virus vaccines: Can we improve on nature?. *Pediatr. Ann.* 22 (1993) pp 715-8.

25. M.C. Cerqueiro, P. Murtagh, A. Halac, M. Avila, M. Weissenbacher. Epidemiologic risk factors for children with acute lower respiratory tract infection in Buenos Aires, Argentina: a matched case-control study. *Rev Infect Dis.* 12 (1990) pp S1021-8.

26. K. Mc Intosh, R.M. Chanock. Respiratory syncytial virus in: *Fields Virology*, Raven Press, New York, 1990, pp 1045-1071.

27. C.B. Hall, K.R. Powell, N.E. McDonald. Respiratory syncytial virus infection in children with compromised immune function. *N. England. J. Med.* 315 (1986) pp 77-81.

28. M.E. Milner, S.M. de la Monte, G.M. Hutchins. Fatal respiratory syncytial virus infection in severe combined immunodeficiency syndrome. *Am. J. Dis. Child.* 135 (1985) pp 1111-14.

29. R. Padman, M.R. Bye, D.V. Schidlow, N. Zaeri. Severe RSV bronchiolitis in an immunocompromised child. *Clin. Pediatr.* 24 (1985) pp 719-21.

30. R.B. Couch, J.A. Englund. Respiratory viral infections in immunocompetent and immunocompromised persons. *Am. J. Med.* 102 (1997) pp 2-9.

31. Base de datos de defunciones INEGI/SSA, Dirección General de Información y Evaluación del Desempeño 2000.

32. P.J. Openshaw. Immunopathological mechanisms in respiratory syncytial virus disease. *Springer Semin. Immunopathol;* 17 (1995) pp 187-201.

33. G. Piedimonte, The association between respiratory syncytial virus infection and reactive airway disease, *Respir. Med.* 96 (2002), pp. S25–S29.

34. P.J. Openshaw, G.S. Dean, F.J. Culley, Links between respiratory syncytial virus bronchiolitis and childhood asthma: clinical and research approaches, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 22 (2003), pp. S58–S64.
35. J.T. McBride, Pulmonary function changes in children after respiratory syncytial virus infection in infancy, *J. Pediatr.* 135 (1999), pp. 28–32.
36. R.T. Stein, D. Sherrill, W.J. Morgan, C.J. Holberg, M. Halonen, L.M. Taussig, A.L. Wright, F.D. Martinez, Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years, *Lancet* 354 (1999), pp. 541–545.
37. C.B. Hall, W.J. Hall, C.L. Gala, F.B. MaGill, J.P. Leddy, Long-term prospective study in children after respiratory syncytial virus infection, *J. Pediatr.* 105 (1984), pp. 358–364.
38. N. Sigurs, R. Bjarnason, F. Sigurbergsson, B. Kjellman, Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161 (2000), pp. 150–157.
39. N. Sigurs, P.M. Gustafsson, R. Bjarnason, F. Lundberg, S. Schmidt, F. Sigurbergsson, B. Kjellman, Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171 (2005), pp. 37–141.
40. N. Sigurs, Clinical perspectives on the association between respiratory syncytial virus and reactive airway disease, *Respir. Res.* 3 (2002), pp. S8–S14.
41. R.A. Tripp, C. Oshansky, R. Alvarez. Cytokines and respiratory syncytial virus infection. *Proc Am Thorac Soc.* 2 (2005) pp 147-9.
42. A. Hornsleth, L. Loland, L. B. Larsen. Cytokines and chemokines in respiratory secretion and severity of disease in infants with respiratory syncytial virus (RSV) infection. *J Clin Virol.* 21 (2001) pp 163-70.
43. R Seemungal. Harper-Owen, A. Bhowmik, I. Moric, G. Sanderson, S. Message, P. Maccallum, T.W. Meade, D.J. Jeffries, S.L. Johnston and J.A. Wedzicha, Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164 (2001), pp. 1618–1623.
44. R.A. Karron, D.A. Buonagurio, A.F. Georgiu, S.S. Whitehead, J.E.

Adamus, M.L. Clements-Mann, D.O. Harris, V.B. Randolph, S.A. Udem, B.R. Murphy, M.S. Sidhu. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94 (1997) pp 13961-6.

45. F. Midulla, Y.T. Huang, I.A. Gilbert, N.M. Cirino, E.R. McFadden Jr, J.R. Panuska. Respiratory syncytial virus infection of human cord and adult blood monocytes and alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis.* 140 (1989) pp 771-7.

46. J.L. Kimpen, R. Garofalo, R.C. Welliver, P.L. Ogra. Activation of human eosinophils in vitro by respiratory syncytial virus. *Pediatr Res.* 32 (1992) pp 160-4.

47. R. Garofalo, J.L. Kimpen, R.C. Welliver, P.L. Ogra. Eosinophil degranulation in the respiratory tract during naturally acquired respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr.* 120 (1992) pp 28-32.

48. G. Franke-Ullmann, C. Pfortner, P. Walter, C. Steinmuller, M.L. Lohmann-Matthes, L. Kobzik, J. Freihorst. *J. Immunol.* 154 (1995) pp 268-80.

49. J.R. Panuska, R. Merolla, N.A. Rebert, S.P. Hoffmann, P. Tsvitse, N.M. Cirino, R.H. Silverman, J.A. Rankin. Respiratory syncytial virus induces interleukin-10 by human alveolar macrophages. Suppression of early cytokine production and implications for incomplete immunity. *J Clin Invest.* 96 (1995) pp 2445-53.

50. J.R. Panuska, M.I. Hertz, H. Taraf, A. Villani, N.M. Cirino. Respiratory syncytial virus infection of alveolar macrophages in adult transplant patients. *Am Rev Respir Dis.* 145 (1992) pp 934-9.

51. F. Midulla, A. Villani, J.R. Panuska, I. Dab, J.K. Kolls, R. Merolla, R. Ronchetti. Respiratory syncytial virus lung infection in infants: immunoregulatory role of infected alveolar macrophages. *J Infect Dis.* 168 (1993) pp 1515-9.

52. T.L. Noah, A.M. Paradiso, M.C. Madden, K.P. McKinnon, R.B. Devlin. The response of a human bronchial epithelial cell line to histamine: intracellular calcium changes and extracellular release of inflammatory mediators. *Am J*

Respir Cell Mol Biol. 5 (1991) pp 484-92.

53. R. Arnold, B. Konig, H. Galatti, H. Werchau, W. Konig. Cytokine (CXCL8, IL-6, TNF-alpha) and soluble TNF receptor-I release from human peripheral blood mononuclear cells after respiratory syncytial virus infection. *Immunology*. 85 (1995) pp 364-72.

54. T.L. Noah and S. Becker, Chemokines in nasal secretions of normal adults experimentally infected with respiratory syncytial virus, *Clin. Immunol*. 97 (2000), pp. 43–49.

55. P. Sheeran, H. Jafri, C. Carubelli, J. Saavedra, C. Johnson, K. Krisher, P.J. Sanchez and O. Ramilo, Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 18 (1999), pp. 115–122.

56. J.L. Kimpen, R. Garofalo, R.C. Welliver, K. Fujihara, P.L. Ogra. An ultrastructural study of the interaction of human eosinophils with respiratory syncytial virus. *Pediatr Allergy Immunol*. 7 (1996) pp 48-53.

57. V. Bitko, N.E. Garmon, T. Cao, B. Estrada, J.E. Oakes, R.N. Lausch, S. Barik. Activation of cytokines and NF-kappa B in corneal epithelial cells infected by respiratory syncytial virus: potential relevance in ocular inflammation and respiratory infection. *BMC Microbiol*. 15 (2004) pp 28.

58. T.L. Noah, S. Becker. Respiratory syncytial virus-induced cytokine production by a human bronchial epithelial cell line. *Am J Physiol*. 265 (1993) pp L472-8.

59. M. Marini, E. Vittori, J. Hollemborg and S. Mattoli, Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8 in bronchial epithelial cells of patients with asthma, *J. Allergy. Clin. Immunol*. 89 (1992), pp. 1001–1009.

60. M.A. Fiedler, K. Wernke-Dollries and J.M. Stark, Respiratory syncytial virus increases CXCL8 gene expression and protein release in A549 cells, *Am. J. Physiol*. 269 (1995), pp. 865–872.

61. S. Becker, H.S. Koren and D.C. Henke, Interleukin-8 expression in normal nasal epithelium and its modulation by infection with respiratory syncytial

virus and cytokines tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 8 (1993), pp. 20–27.

62. P.S. McNamara, B.F. Flanagan, C.A. Hart, R.L. Smyth. Production of chemokines in the lungs of infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis.* 191 (2005) pp 1225-32.

63. S. Das, O.P. Palmer, W.D. Leight, J.B. Surowitz, R.J. Pickles, S.H. Randell, C.A. Buchman. Cytokine amplification by respiratory syncytial virus infection in human nasal epithelial cells. *Laryngoscope.* 115 (2005) pp 764-8.

64. B. Olszewska-Pazdrak, A. Casola, T. Saito, R. Alam, S.E. Crowe, F. Mei, P.L. Ogra, R.P. Garofalo. Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1 $\alpha$  by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. *J Virol.* 72 (1998) pp 4756-64.

65. L.H. Thomas, J.S. Friedland, M. Sharland, S. Becker. Respiratory syncytial virus-induced RANTES production from human bronchial epithelial cells is dependent on nuclear factor-kappa B nuclear binding and is inhibited by adenovirus-mediated expression of inhibitor of kappa B alpha. *J Immunol.* 161 (1998) pp 1007-16.

66. L.L. Han, J.P. Alexander, L.J. Anderson. Respiratory syncytial virus pneumonia among the elderly: an assessment of disease burden. *J Infect Dis.* 179 (1999) pp 25-30.

67. P.J. Openshaw, Potential mechanisms causing delayed effects of respiratory syncytial virus infection, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163 (2001), pp. S10–S13.

68. P.J. Openshaw, J.S. Tregoning. Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. *Clin Microbiol Rev.* 18 (2005) pp 541-55.

69. G. Isaia, O. Teodosiu, G. Popescu, P. Athanasiu, I. Sternberg and Z. Dumitriu, Persistence of viruses in the nasopharynx of apparently healthy children aged 0–5 years. Results of investigations performed in 1982–1983, *Virologie* 36 (1985), pp. 175–179.

70. B.G. Mills, F.R. Singer, L.P. Weiner and P.A. Holst, Immunohistological

demonstration of respiratory syncytial virus antigens in Paget disease of bone, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), pp. 1209–1213.

71. BG Mills, Singer FR, Weiner LP, Suffin SC, Stabile E, Holst P. Evidence for both respiratory syncytial virus and measles virus antigens in the osteoclasts of patients with Paget's disease of bone. Clin Orthop Relat Res. 1984 (183) pp 303-11.

72. B.G. Mills, F.R. Singer. Critical evaluation of viral antigen data in Paget's disease of bone. Clin Orthop Relat Res. 217 (1987) pp 16-25.

73. H.A. Cubie, L.A. Duncan, L.A. Marshall, N.M. Smith, Detection of respiratory syncytial virus nucleic acid in archival postmortem tissue from infants, Pediatr. Pathol. Lab. Med. 17 (1997), pp. 927–938.

74. N.N. Mickhalchenkova., L.D. Kaniazeva, A.N. Slepishkin. Respiratory syncytial virus infection in chronic bronchitis patients. Ter Arkh. 59(1987) pp 50-52.

75. V.Z. Krivitskai, N.V. Iakovleva. The characteristics of the humoral response to respiratory syncytial viral infection in adult patients with different forms of bronchitis. Vopr Virusol; 37 (1992) pp 146-149.

76. Krivitskai V.Z., Iakovleva N.V, N.I. Aleksandrova.. Characteristics of anti-respiratory syncytial humoral immunity during persistence of respiratory syncytial virus antigens in adult patients with chronic obstructive bronchitis. Vopr Virusol; 41 (1996) pp 234-237.

77. E Domurat, N.J. Roberts, E.E. Walsh, R. Dagan. RSV infection of human mononuclear leukocytes in vitro and in vivo. J. Infect. Dis; 152 (1985) pp 895-902.

78. R.G. Hegele., S. Hayashi., A.M. Bramley, J.C. Hogg.. Persistence of respiratory syncytial virus genome and protein after acute bronchiolitis in guinea pigs. Chest; 105 (1994) pp 1848-1854.

79. H. Streckert, S. Philippous, F. Riedel. 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 (1996) pp 401-410.

80. A. Dakhama, T.Z. Vitalis, R.G. Hegele. 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 (1997) pp 20-26.
81. P. Baldrige, L. Senterfit. Persistent infection of cells in culture by respiratory syncytial virus. *Proc Soc Exp Biol Med*; 151 (1976) pp 684-688.
82. C. Pringle. Initiation and maintenance of persistent infection by respiratory syncytial virus. *J Virol*; 28 (1978) pp 99-211.
83. C. Bangham, A. McMichael A. Specific human cytotoxic T cell recognize B-cell lines persistently infected with respiratory syncytial virus. *PNAS*; 83 (1986) pp 9183-9187.
84. O. Iankevich, R. Preizin. Chronic infection of HeLa cells with respiratory syncytial virus. *Vopr Virusol*; 2 (1977) pp 142-147.
85. B. Fernie, E. Ford J. Gerin. The development of BALB/c cells persistently infected with respiratory syncytial virus: presence of ribonucleoprotein on cell surface. *Proc Soc Exp Biol Med*; 167 (1981) pp 83-86.
86. R.E. Sarmiento, R. Tirado and B. Gomez, Characteristics of a respiratory syncytial virus persistently infected macrophage-like culture, *Virus Res*; 84 (2002), pp. 45–58.
87. M. Romero and B. Gomez, Establishment of respiratory syncytial virus persistence in cell lines: association with defective interfering particles, *Intervirology*; 46 (2003), pp. 190–198.
88. R. Tirado, A. Ortega, R.E. Sarmiento, B. Gomez. Interleukin-8 mRNA synthesis and protein secretion are continuously up-regulated by respiratory syncytial virus persistently infected cells. *Cell. Immunol*; 233 (2005) pp-61-71.
89. B.L. Semler, J.J. Holland. Persistent vesicular stomatitis virus infection mediates base substitutions in viral RNA termini. *J Virol*; 32 (1979) pp 420-8.
90. P. Lehtovaara, H. Soderlund, S. Keranen, R.F. Pettersson, L. Kaariainen. 18S defective interfering RNA of Semliki Forest virus contains a triplicated linear repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 78 (1981) pp 5353-7.
91. I. Novella. E. Domingo, J. Holland. Rapid viral quasispecies evolution: implications for vaccine and drug strategies. *Molecular Medicine Today*; 76



(1997) pp 248-253.

92. E. Domingo. *Virus en Evolución*. Eudema Eds. Madrid 1994 pp 51-66 y 83-8.

93. K. McIntosh, H.B. Masters, I. Orr, R.K. Chao, R.M. Barkin. The immunologic response to infection with respiratory syncytial virus in infants. *J Infect Dis*; 138 (1978) pp 24-32.

94. J.R. Groothuis, E.A. Simoes, M.J. Levin, C.B. Hall, C.E. Long, W.J. Rodriguez, J. Arrobio, H.C. Meissner, D.R. Fulton, R.C. Welliver. Prophylactic administration of respiratory syncytial virus immune globulin to high-risk infants and young children. The Respiratory Syncytial Virus Immune Globulin Study Group. *N Engl J Med*. 329 (1993) pp 1524-30.

95. C.B. Hall. Respiratory syncytial virus: A continuing culprit and conundrum. *J Pediatr*. 135 (1999) pp 2-7.

96. J.E. Crowe Jr. Respiratory syncytial virus vaccine development. *Vaccine*. 20 (2001) pp S32-7.

97. W.P. Glezen, A. Paredes, J.E. Allison, L.H. Taber, A.L. Frank. Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level. *J Pediatr*. 98 (1981) pp 708-15.

98. L.R. Krilov, L.J. Anderson, L. Marcoux, V.R. Bonagura, J.F. Wedgwood. Antibody-mediated enhancement of respiratory syncytial virus infection in two monocyte/macrophage cell lines. *J Infect Dis*. 160(5) (1989) pp 777-82.

99. J.F. Valarcher, H. Bourhy, A. Lavenu, N. Bourges-Abella, M. Roth, O. Androletti, P. Ave, F. Schelcher. Persistent infection of B lymphocytes by bovine respiratory syncytial virus. *Virology*. 291 (2001) pp 55-67.

100. A.M. Bramley, T.Z. Vitalis, B.R. Wiggs, R.G. Hegele. Effects of respiratory syncytial virus persistence on airway responsiveness and inflammation in guinea-pigs. *Eur Respir J*. 14 (1999) pp 1061-7.

101. A. Guerrero-Plata, E. Ortega, V. Ortiz-Navarrete, B. Gomez. Antigen presentation by a macrophage-like cell line persistently infected with respiratory syncytial virus. *Virus Res*. 99 (2004) pp 95-100.

102. J. Schwarze, D.R. O'Donnell, A. Rohwedder, P.J. Openshaw. Latency and persistence of respiratory syncytial virus despite T cell immunity. *Am J Respir Crit Care Med.* 169 (2004) pp 801-5.
103. S. Chandwani, W. Borkowsky, K. Krasinski, R. Lawrence, R. Welliver. Respiratory syncytial virus infection in human immunodeficiency virus-infected children. *J Pediatr.* 117 (1990) pp 251-4.
104. M. Fishaut, D. Tubergen, K. McIntosh. Cellular response to respiratory viruses with particular reference to children with disorders of cell-mediated immunity *J Pediatr.* 96 (1980) pp 179-86.
105. Y. Chiba, N. Saitoh, K. Matsuo, M. Misawa. Elevated nasal mucosal G protein levels and histamine receptor affinity in a guinea pig model of nasal hyperresponsiveness. *Int Arch Allergy Immunol.* 127 (2002) pp 285-93.
106. D. Isaacs, C.R. Bangham, A.J. McMichael. Cell-mediated cytotoxic response to respiratory syncytial virus in infants with bronchiolitis. *Lancet.* 2 (1987) pp 769-71.
107. C.R. Bangham, P.J. Openshaw, L.A. Ball, A.M. King, G.W. Wertz, B.A. Askonas. 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 (1986) pp 3973-7.
108. A.H. Cherrie, K. Anderson, G.W. Wertz, P.J. Openshaw. Human cytotoxic T cells stimulated by antigen on dendritic cells recognize the N, SH, F, M, 22K, and 1b proteins of respiratory syncytial virus. *J Virol.* 66 (1992) pp 2102-10.
109. B.S. Graham, T.R. Johnson, R.S. Peebles. Immune-mediated disease pathogenesis in respiratory syncytial virus infection. *Immunopharmacology.* 48 (2000) pp 237-47.
110. B.S. Graham, J.A. Rutigliano, T.R. Johnson. Respiratory syncytial virus immunobiology and pathogenesis. *Virology.* 297(2002) pp 1-7.
111. P.J. Openshaw, F.J. Culley, W. Olszewska. Immunopathogenesis of vaccine-enhanced RSV disease. *Vaccine.* 20 (2001) pp S27-31.
112. R.S. Peebles Jr, K. Hashimoto, B.S. Graham. The complex relationship between respiratory syncytial virus and allergy in lung disease. *Viral Immunol.*

16 (2003) pp 25-34.

113. A. Jones, J.M. Qui, E. Bataki, H. Elphick, S. Ritson, G.S. Evans and M.L. Everard, Neutrophil survival is prolonged in the airways of healthy infants and infants with RSV bronchiolitis, *Eur. Respir. J.* 20 (2002), pp. 651–657.

114. K.A. Neilson and E.J. Yunis, Demonstration of respiratory syncytial virus in an autopsy series, *Pediatr. Pathol.* 10 (1990), pp. 491–502.

115. W. Aherne, T. Bird, S.D. Court, P.S. Gardner and J. McQuillin, Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children, *J. Clin. Pathol.* 23 (1970), pp. 7–18.

116. P. Jaovisidha, M.E. Peeples, A.A. Brees, L.R. Carpenter, J.N. Moy. Respiratory syncytial virus stimulates neutrophil degranulation and chemokine release. *J Immunol.* 163 (1999) pp 2816-20.

117. A. Tuffaha, J.E. Gern and R.F. Lemanske Jr., The role of respiratory viruses in acute and chronic asthma, *Clin. Chest Med.* 21 (2000), pp. 289–300.

118. A. Seemungal and J.A. Wedzicha, Viral infections in obstructive airway diseases, *Curr. Opin. Pulm. Med.* 9 (2003), pp. 111–116.

119. T.L. Noah, F.W. Henderson, I.A. Wortman, R.B. Devlin, J. Handy, H.S. Koren and S. Becker, Nasal cytokine production in viral acute upper respiratory infection of childhood, *J. Infect. Dis.* 171 (1995), pp. 584–592.

120. R.L. Smyth, K.J. Mobbs, U. O’Hea, D. Ashby and C.A. Hart, Respiratory syncytial virus bronchiolitis: disease severity, interleukin-8, and virus genotype, *Pediatr. Pulmonol.* 33 (2002), pp. 339–346.

121. A.L. Miller, T.L. Bowlin, N.W. Lukacs. Respiratory syncytial virus-induced chemokine production: linking viral replication to chemokine production in vitro and in vivo. *J Infect Dis.* 189 (2004) pp 1419-30.

122. N. Mukaida. Potential involvement of CXCL8 and its receptors in the invasiveness of pancreatic cancer cells. *Int J Oncol.* 2003 Apr;22(4):765-71.

123. Reid PT, Sallenave JM. Cytokines in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Pharm Des.* 9 (2003) pp 25-38.

124. E.Vittori, F. Sciacca, F. Colotta, A. Mantovani, S. Mattoli. Protective effect of nedocromil sodium on the interleukin-1-induced production of interleukin-8 in

- human bronchial epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol.* 90 (1992) pp 76-84.
125. W.P. Arend, M. Malyak, C.J. Guthridge, C. Gabay. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol.* 16 (1998) pp 27-55.
126. D.H. Adams, A.R. Lloyd. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet.* 349 (1997) pp 490-5.
127. T. Gura. Chemokines take center stage in inflammatory ills. *Science.* 272 (1996) pp 954-6.
128. A.D. Luster. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 338 (1998) pp 436-45.
129. B.J. Rollins. Chemokines. *Blood.* 90 (1997) pp 909-28.
130. J.S. Friedland. Chemokines in viral disease. *Res Virol.* 147 (1996) pp 131-8.
131. L.M. Teran, M.C. Seminario, J.K. Shute, A. Papi, S.J. Compton, J.L. Low, G.J. Gleich, S.L. Johnston. RANTES, macrophage-inhibitory protein 1alpha, and the eosinophil product major basic protein are released into upper respiratory secretions during virus-induced asthma exacerbations in children. *J Infect Dis.* 179 (1999) pp 677-81.
132. M. Baggiolini. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* 392 (1998) pp 565-8.
133. M. Denis, E. Ghadirian. Dysregulation of interleukin 8, interleukin 10, and interleukin 12 release by alveolar macrophages from HIV type 1-infected subjects. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 10 (1994) pp 1619-27.
134. A.D. Crockard, J.M. Thompson, S.J. McBride, J.D. Edgar, T.A. McNeill, A.L. Bell. Markers of inflammatory activation: upregulation of complement receptors CR1 and CR3 on synovial fluid neutrophils from patients with inflammatory joint disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 65 (1992) pp 135-42.
135. B. Heit, P. Colarusso, P. Kubes. Fundamentally different roles for LFA-1, Mac-1 and alpha4-integrin in neutrophil chemotaxis. *J Cell Sci.* 118 (2005) pp 5205-20.
136. B. Konig, T. Krusat, H.J. Streckert, W. Konig. CXCL8 release from human neutrophils by the respiratory syncytial virus is independent of viral replication. *J*

Leukoc Biol. 60 (1996) pp 253-60.

137. M.A. Fiedler, K. Wernke-Dollries and J.M. Stark, Mechanism of RSV-induced CXCL8 gene expression in A549 cells before viral replication, *Am. J. Physiol.* 271 (1996), pp. 963–971.

138. A. Casola, R.P. Garofalo, M. Jamaluddin, S. Vlahopoulos and A.R. Brasier, Requirement of a novel upstream response element in respiratory syncytial virus-induced CXCL8 gene expression, *J. Immunol.* 164 (2000), pp. 5944–5951.

139. R. Garofalo, M. Sabry, M. Jamaluddin, R.K. Yu, A. Casola, P.L. Ogra, A.R. Brasier. Transcriptional activation of the interleukin-8 gene by respiratory syncytial virus infection in alveolar epithelial cells: nuclear translocation of the RelA transcription factor as a mechanism producing airway mucosal inflammation. *J Virol.* 70 (1996) pp 8773-81.

140. R. Arnold, F. Werner, B. Humbert, H. Werchau, W. König. Effect of respiratory syncytial virus-antibody complexes on cytokine (CXCL8, IL-6, TNF- $\alpha$ ) release and respiratory burst in human granulocytes. *Immunology.* 82 (1994) pp 184-91.

141. M.A. Fiedler, K. Wernke-Dollries, J.M. Stark. Inhibition of viral replication reverses respiratory syncytial virus-induced NF-kappa B activation and interleukin-8 gene expression in A549 cells. *J Virol.* 70 (1996) pp 9079-82.

142. R. Malhotra, M. Ward, H. Bright, R. Priest, M.R. Foster, M. Hurle, E. Blair and M. Bird, Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells, *Microbes Infect.* 5 (2003), pp. 123–133.

143. D.A. Hendricks, K. Baradaran, K. McIntosh, J.L. Patterson. Appearance of a soluble form of the G protein of respiratory syncytial virus in fluids of infected cells. *J Gen Virol.* 68 (1987) pp 1705-14.

144. D.A. Hendricks, K. McIntosh, J.L. Patterson. Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Virol.* 62 (1988) pp 2228-33.

145. S.R. Roberts, D. Lichtenstein, L.A. Ball, G.W. Wertz. The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment

glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *J Virol.* 68 (1994) pp 4538-46.

146. R.A. Tripp. Pathogenesis of respiratory syncytial virus infection. *Viral Immunol.* 17 (2004) pp 165-81.

147. B.S. Graham, T.R. Johnson, R.S. Peebles. Immune-mediated disease pathogenesis in respiratory syncytial virus infection. *Immunopharmacology.* 48 (2000) pp 237-47.

148. R.A. Tripp, L.P. Jones, L.M. Haynes, H. Zheng, P.M. Murphy, L.J. Anderson. CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat Immunol.* 2 (2001):732-8.

149. L.M. Haynes, L.P. Jones, A. Barskey, L.J. Anderson, R.A. Tripp. Enhanced disease and pulmonary eosinophilia associated with formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccination are linked to G glycoprotein CX3C-CX3CR1 interaction and expression of substance P. *J Virol.* 77 (2003) pp 9831-44.

150. R. Dreier, K.W. Schmid, V. Gerke, K. Riehemann. Differential expression of annexins I, II and IV in human tissues: an immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol.* 110 (1998) pp 137-48.

151. P.L. Collins, G. Mottet. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 72 (1991) pp 3095-101.

152. J. Zhou, R.E. Dutch, R.A. Lamb. Proper spacing between heptad repeat B and the transmembrane domain boundary of the paramyxovirus SV5 F protein is critical for biological activity. *Virology.* 22 (1997) pp 327-39.

153. T.L. Gower, M.E. Peebles, P.L. Collins, B.S. Graham. RhoA is activated during respiratory syncytial virus infection. *Virology.* 283 (2001) pp 188-96.

154. G. Fritz, P. Lang, I Just. Tissue-specific variations in the expression and regulation of the small GTP-binding protein Rho. *Biochim Biophys Acta.* 21 (1994) pp 331-8.

155. Y. Takai, T. Sasaki, K. Tanaka, H. Nakanishi. Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci.* 20 (1995) pp 227-31.

156. Y. Kureishi, S. Kobayashi, M. Amano, K. Kimura, H. Kanaide, T. Nakano, K. Kaibuchi, M. Ito. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem.* 272 (1997) pp 12257-60.
157. R.T. Clements, F.L. Minnear, H.A. Singer, R.S. Keller, P.A. Vincent. RhoA and Rho-kinase dependent and independent signals mediate TGF-beta-induced pulmonary endothelial cytoskeletal reorganization and permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 288 (2005) pp L294-306.
158. M.K. Pastey, J.E. Crowe Jr, B.S. Graham. RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus-induced syncytium formation. *J Virol.* 73 (1999) pp 7262-70.
159. E.A. Kurt-Jones, L. Popova, L. Kwinn, L.M. Haynes, L.P. Jones, R.A. Tripp, E.E. Walsh, M.W. Freeman, D.T. Golenbock, L.J. Anderson, R.W. Finberg. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol.* 1 (2000) pp 398-401.
160. A.K. Behera, H. Matsuse, M. Kumar, X. Kong, R.F. Lockey, S.S. Mohapatra. Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 280 (2001) pp 188-95.
161. B. Fernie, J. Gerin. The stabilization and purification of respiratory syncytial virus using MgSO<sub>4</sub>. *Virology* 106 (1982) pp 141-144.
162. P. Payment and M. Trudel. *Methods and Techniques in Virology.* Marcel Dekker, INC. N.Y. pp. 309 (1993).
163. P.L. Ey, S.J. Prowse, C.R. Jenkin. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry.* 15(1978) pp 429-36.
164. J.W. Goding. Genetics, cellular expression and function of IgD and IgM receptors. *Immunol Rev.* 37 (1977) pp 152-86.
165. M.W. Treuhaft. A colorimetric assay for quantification of defective interfering particles of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 64 (1983) pp 1301-9.

166. B. Garcia-Barreno, C. Palomo, C. Penas, T. Delgado, P. Perez-Brena, J.A. Melero. Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J Virol.* 63 (1989) pp 925-32.
167. P. Chomzaynsky, N. Sacchi. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanato-phenol-chloroform extraction. *Annal. Biochem.* 162 (1987) pp 156-9.
168. P.A. Cane, C.R. Pringle. Respiratory syncytial virus heterogeneity during an epidemic: analysis by limited nucleotide sequencing (SH gene) and restriction mapping (N gene). *J Gen Virol.* 72 (1991) pp 349-357.
169. . Millan, P. Aguilar, J.A. Mendez, J.A. Arias-Montano and A. Ortega, Glutamate activates PP125 (FAK) through AMPA/kainate receptors in Bergmann glia, *J. Neurosci. Res.* 66 (2001), pp. 723–729.
170. D.E. Garfin. One-dimensional gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 182 (1990) pp 425-41.
171. J.H. Zar, *Biostatistical analysis*, Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ (1999).
172. J.A. Patel, Z. Jiang, N. Nakajima and M. Kunimoto, Autocrine regulation of interleukin-8 by interleukin-1alpha in respiratory syncytial virus-infected pulmonary epithelial cells in vitro, *Immunology* 95 (1998), pp. 501–506.
173. .W. Wertz, M. Krieger and L.A. Ball, Structure and cell surface maturation of the attachment glycoprotein of human respiratory syncytial virus in a cell line deficient in O glycosylation, *J. Virol.* 63 (1989), pp. 4767–4776.
174. R. Ahmed and I. Chen. (1999). *Persistent Viral Infections*, Ed. John Wiley & Sons. England. pp. 725.
175. J.E. Parry, P.V. Shirodaria C.R. Pringle. Pneumoviruses: the cell surface of lytically and persistently infected cells. *J. Gen. Virol.* 44 (1979) pp 479-491.
176. K. San Roman, E. Villar, I. Munoz-Barroso. Acidic pH enhancement of the fusion of Newcastle disease virus with cultured cells. *Virology.* 260 (1999) pp 329-41.
177. R. Tirado, R.E. Sarmiento, B. Gomez. Spontaneous shift of an HSV type 1 productive, persistently infected macrophage-like culture to a non-productive



- culture. *Res Virol.* 149 (1998) pp 145-51.
178. J.J. Holland, L.P. Villarreal, M.M. Breindl. Factors involved in the generation and replication of rhabdovirus defective interfering T particles. *J Virol*; 17 (1976) pp 805-815.
179. T. Dudek, D.M. Knipe. Replication-defective viruses as vaccines and vaccine vectors. *Virology.* 344 (2006) pp 230-9.
180. K. Balabanian, J. Harriague, C. Decrion, B. Lagane, S. Shorte, F. Baleux, J.L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, L.A. Chakrabarti. CXCR4-tropic HIV-1 envelope glycoprotein functions as a viral chemokine in unstimulated primary CD4+ T lymphocytes. *J Immunol.* 173 (2004) pp 7150-60.
181. M.M. Monick, T.O. Yarovinsky, L.S. Powers, N.S. Butler, A.B. Carter, G. Gudmundsson and G.W. Hunninghake, Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin, *J. Biol. Chem.* 278 (2003), pp. 53035–53044.
182. A.J. Garcia-Pineros, A. Hildesheim, M. Trivett, M. Williams, L. Wu, V.N. Kewalramani, L.A. Pinto. Role of DC-SIGN in the activation of dendritic cells by HPV-16 L1 virus-like particle vaccine. *Eur J Immunol.* 36 (2006) pp 437-45.
183. J. Nattermann, H.D. Nischalke, G. Feldmann, G.Ahlenstiel, T. Sauerbruch, U. Spengler. Binding of HCV E2 to CD81 induces RANTES secretion and internalization of CC chemokine receptor 5. *J Viral Hepat.* 11 (2004) pp 519-26.
184. S.N. Fisher, P. Vanguri, H.S. Shin, M.L. Shin. Regulatory mechanisms of MuRantes and CRG-2 chemokine gene induction in central nervous system glial cells by virus. *Brain Behav Immun.* 9 (1995) pp 331-44.
185. H.S. Jafri, S. Chavez-Bueno, A. Mejias, A.M. Gomez, A.M. Rios, S.S. Nassi, M. Yusuf, P. Kapur, R.D. Hardy, J. Hatfield, B.B. Rogers, K. Krisher, O. Ramilo. Respiratory syncytial virus induces pneumonia, cytokine response, airway obstruction, and chronic inflammatory infiltrates associated with long-term airway hyperresponsiveness in mice. *J Infect Dis.* 189 (2004) pp 1856-65.
186. S. Techaarpornkul, N. Barretto, M.E. Peeples. Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small

hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. *J Virol.* 75 (2001) pp 6825-34.

187. R. Arnold, B. König, H. Werchau, W. König. Respiratory syncytial virus deficient in soluble G protein induced an increased proinflammatory response in human lung epithelial cells. *Virology.* 330 (2004) pp 384-97.

**Cellular Immunology**

Volume 233, Issue 1, January 2005, Pages 61-71

**Interleukin-8 mRNA synthesis and protein secretion are continuously up-regulated by respiratory syncytial virus persistently infected cells**Rocio Tirado<sup>a</sup>, Arturo Ortega<sup>b</sup>, Rosa Elena Sarmiento<sup>a</sup> and Beatriz Gómez<sup>a</sup>  <sup>a</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, Mexico D.F. 04510, Mexico<sup>b</sup>Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico D.F. 07300, Mexico

Received 23 February 2005; accepted 15 April 2005. Available online 4 June 2005.

**Abstract**

The aim of this study was to investigate whether respiratory syncytial virus persistence regulates interleukin 8 (IL-8) mRNA synthesis and protein secretion in a human lung epithelial cell line (A549). Therefore, we established RSV persistence in these cells (A549per) and determined the levels of interleukin-8 mRNA by RT-PCR and of protein through ELISA. Interleukin-8 mRNA synthesis and protein secretion were continuously up-regulated in A549per cells during passages and in A549 cells that had been incubated with supernatants (cA549per) obtained from A549per passages. These results suggested that the enhancement of interleukin-8 was stimulated either by the presence of the RSV genome in the cell or by soluble mediator(s) induced by RSV, which, in turn, increased interleukin-8 mRNA synthesis and protein secretion. Soluble RSV F and G proteins were identified as mediators. Moreover, interleukin-8 enhancement was observed after 1-min incubation with the soluble mediators, thus suggesting that interleukin-8 up-regulation was triggered by receptor–ligand interaction.

**Keywords:** Interleukin-8; Up-regulation; Extra-cellular RSV proteins; Human airway epithelial cells

-

**Article Outline**

1. Introduction
2. Materials and methods
  - 2.1. Cells and virus
  - 2.2. Anti-RSV antibodies
  - 2.3. Persistent RSV infection
  - 2.4. mRNA of IL-8 and of  $\beta$ 2-microglobulin
    - 2.4.1. mRNA of IL-8

- 2.4.2. mRNA  $\beta$ 2-microglobulin
- 2.5. Determination of IL-8 protein levels
- 2.6. Conditioned medium from A549per culture
- 2.7. Thermal and UV stability of IL-8 gene expression activity induced by cA549per
- 2.8. Precipitation of soluble particles in cA549per
- 2.9. Detection of viral proteins in precipitated pellet and supernatant of cA549
- 2.10. Effect of cA549per on IL-8 mRNA synthesis and protein secretion
- 2.11. Statistical analysis
- 3. Results
- 3.1. RSV persists in A549 cells
- 3.2. RSV persistence up-regulates IL-8 mRNA synthesis
- 3.3. cA549per up-regulates IL-8 mRNA synthesis
- 3.4. cA549per up-regulation of IL-8 is not altered after thermal and UV inactivation
- 3.5. Viral proteins were present in cA549per supernatant after immune and polyethylene glycol precipitation
- 3.6. Soluble F and G RSV proteins induce IL-8 in A549 cells
- 4. Discussion
- Acknowledgements
- References

-

## 1. Introduction

Respiratory syncytial virus (RSV) is the most important respiratory pathogen in infancy; by age 2 virtually 100% of children have been infected. The infection is rarely subclinical and mostly presents as an upper or lower tract infection. RSV infection in the lower respiratory tract in infants typically causes bronchiolitis and pneumonia; furthermore, clinical and epidemiological data show that early severe infection is associated with increased risk of long-term problems such as recurrent chronic obstructive pulmonary disease [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7] and [8]. The mechanisms, by which this infection leads to airway dysfunction that persists long after the acute disease has been resolved, are not well defined. However, involvement of RSV persistence in long-term respiratory problems has been suggested [1], [9], [10], [11] and [12].

RSV is a member of the Paramixoviridae (genus Pneumovirus), a large group of non-segmented, negative-strand RNA virus, which includes several viruses that persist in humans and in human cell lines [13] and [14]. RSV codes for 11 proteins, three being transmembrane surface glycoproteins (F, G, and SH), two of which, F and G, can be secreted [13], [15] and [16].

Although RSV persistence in humans (the natural host of RSV) has not been clearly demonstrated, some circumstantial evidences suggest it: RSV was isolated from the nasopharynx of apparently healthy children [17]; viral antigens in osteoclasts and cells from patients with Paget's disease have been reported [18]; and viral mRNA has been found in post-mortem tissue from infants who died during months in which no virus could be isolated [19]. Therefore, it is likely that RSV persists in humans at least during inter-epidemic periods, especially since no animal reservoir of RSV has been reported

[13]. Furthermore, viral persistence has been reported in immortalized eukaryotic cells lines [20], [21], [22], [23], [24] and [25].

The pathogenesis of RSV-induced airway injury appears to involve an extended inflammatory response, characterized by recruitment and activation of inflammatory cells. The main target for RSV is epithelial cells from upper and lower respiratory tracts [13], infected epithelial cells release pro-inflammatory mediators that cause an influx of cells into the airway; recruited cells prolong inflammation and bronchial hyper-responsiveness by releasing mediators that attract other inflammatory cells [26], [27] and [28]. Autopsies and studies in vivo have demonstrated that RSV infection results in airway inflammation with recruitment and activation of polymorphonuclear neutrophils (PMN) and lymphocytes [29] and [30]. Excessive cell recruitment, by causing inflammation and tissue damage, is implicated in the pathogenesis of chronic lung disease [31] and [32]. The airway inflammation that results from RSV infection is associated with a marked increase in interleukin-8 (IL-8) release in the respiratory tract [28], [33] and [34].

Although the mechanism of RSV-induced inflammation is not well understood, reports indicate that IL-8 is the major chemotactic and activating agent for PMN and lymphocytes in the lung, and that it plays an important role in the pathology [28], [33] and [34]. A strong, dose-related association between the IL-8 mRNA produced locally in the airways and the severity of disease has been reported [35] and [36]. It is likely that epithelial cells are an important source of IL-8 because these cells are the primary target for RSV and are present in very high numbers as they form the lining of the entire respiratory tract [13], [31], [35] and [36].

Studies in vitro have demonstrated induction of IL-8 expression and protein release by RSV acute infection of A549, a human pulmonary epithelial cell line, [37], [38] and [39]. Furthermore, assays done with the same cell line have shown that the increase in IL-8 is regulated by interleukin IL-1 $\alpha$  and is independent of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  [40], and replicative RSV [38].

The purpose of this study was to investigate whether RSV persistence in a human epithelial lung cell line alters IL-8 mRNA synthesis and secretion of IL-8 protein. For these studies, we established a persistently RSV-infected culture of a human alveolar epithelial cell line (A549). The decision to use A549 cells for our study was based on reports that, in this cell line, basal IL-8 production is minimal but increases with acute RSV infection [37], [38] and [40]. Epithelial cells were chosen not only because they are the target during RSV infection, but also because they are among the cell lineages that have been selected for the virus to persist [41].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cells and virus

Human lung epithelial cell type II (A549), obtained from Dr. A. Brassier (Department of Medicine, The University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas), and Vero cells from our laboratory were free of mycoplasma determined by mycoplasma detection kit (Boehringer–Mannheim) and propagated as described elsewhere [25]. RSV

Long strain is the prototype virus used in our laboratory. The procedures for propagating cells and virus and for assaying viral infectivity have been described [25].

## 2.2. Anti-RSV antibodies

Polyclonal rabbit anti-RSV serum was produced in our laboratory [25]; commercial polyclonal goat anti-RSV (Biogenesis, Poole, UK) was used; and monoclonal murine antibodies against RSV F protein (48F) and against G protein (64G) were kindly provided by Dr. Jose Melero (Instituto de Salud Carlos Tercero, Madrid, España).

## 2.3. Persistent RSV infection

To obtain persistently infected cultures, monolayers of confluent A549 cells were infected with RSV at a multiplicity of infection (m.o.i.) of 0.001. In brief, RSV in Dulbecco's minimum essential medium containing 2% fetal bovine serum (FBS) was added to an A549 monolayer and allowed to incubate (2 h; 37 °C). Thereafter, non-absorbed virus was removed and fresh medium with 2% FBS was added. From sequential passages of surviving cells, persistently infected cultures of A549 were obtained, one of which (passage 48, designated A549per) was further subcultured. During the passages, viral persistence was verified and monitored by determining the presence of cells bearing viral antigen and the production of infectious virus and defective particles [21] and [25].

## 2.4. mRNA of IL-8 and of $\beta$ 2-microglobulin

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to determine the presence of mRNA of IL-8 and of  $\beta$ 2-microglobulin. As housekeeping gene  $\beta$ 2-microglobulin was selected because among the determinations no significant variations in the mRNA values were observed.

### 2.4.1. mRNA of IL-8

Total RNA was isolated as reported [21]. Synthesis of cDNA and PCR amplification were done in the same tube at 20  $\mu$ l total volume. Total RNA (3  $\mu$ g) was reverse transcribed with 200 U of Superscript II RT (Gibco, New York) and 1  $\mu$ g/ $\mu$ l of oligo(dT) (Gibco) in first-strand buffer (Gibco) by heating (42 °C; 60 min). To 2  $\mu$ l cDNA were added 2.5 U of Platinum Taq polymerase (Gibco) and 40 pM each of sense (5'CTGCTAGCCAGGATCCAACAA3') and antisense (3'CAACACAGCTGGCAATGACA5') IL-8 primers (Gibco). After being heated (99 °C; 2.5 min), the reaction mixture was cycled 35 times: 1 min at 94 °C; 1.5 min at 65 °C; and 1 min at 72 °C; and amplified at 72 °C for 7 min in a DNA thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). The 498 bp segment, between nucleotides 847 and 1345, of IL-8 mRNA was amplified.

### 2.4.2. mRNA $\beta$ 2-microglobulin

cDNA was synthesized as described above. cDNA (2  $\mu$ l) was amplified in 5 $\times$  buffer (Gibco) containing 2.5 U of Platinum Taq polymerase and 40 pM each of  $\beta$ 2-microglobulin sense (5'ACCCCACTGAAAAAGATGAGTAT3') and antisense (5'ATGATGCTGCTTACATGTCTCGAT3') primers (Gibco). After being heated

(96 °C; 5 min), the reaction mixture was cycled 35 times: 30 s at 96 °C; 1 min at 60 °C; 2 min at 72 °C; and a final amplification at 72 °C for 10 min in the DNA thermal cycler. The 90 bp segment, between nucleotides 340 and 430, of  $\beta$ 2-microglobulin was amplified.

All PCR products were analyzed on 1% agarose gels, with ethidium bromide used for staining. The DNA bands were visualized by examining each gel under UV light and were documented by photography with a Kodak DC 290 digital camera. The densities of the amplified bands were analyzed by Quantity One v 4.3.1 (Bio-Rad, Hercules, California) software package. To mock-infected A549 cells an arbitrary value of 100 was given.

## **2.5. Determination of IL-8 protein levels**

Levels of both cellular and secreted IL-8 protein were determined by the double sandwich technique with an ELISA kit (EH2-IL-8; Pierce Endogen, Woburn, MA, USA), as recommended by the manufacturer. The ranges of detection were 26.5–1000 pg/ml (sensitivity: <2 pg/ml).

## **2.6. Conditioned medium from A549per culture**

Supernatants from A549per (cA549per) were collected; cA549per was obtained from passages 65 to 73 of A549per. Supernatants from A549 cells, passages 65–73, that had been mock-infected (designated as cA549m) were used as negative control. All supernatants were clarified by centrifugation for 10 min at 1500 rpm (Sorvall RT 6000D) before incubation with A549 cells.

## **2.7. Thermal and UV stability of IL-8 gene expression activity induced by cA549per**

To evaluate whether the ability of cA549per to induce IL-8 gene expression was labile to heat or to UV irradiation, cA549per was either boiled for 5 min or irradiated with UV at a dose required to inactivate  $>6 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml (5 min; 10 cm distance; General Universal lamp UVGL-25, UVP, Upland, CA, USA). Inactivation of RSV infectivity was verified by flow cytometric analysis through monitoring the expression of viral antigen [25] on A549 cells 24 h post-infection at m.o.i. of 1.

## **2.8. Precipitation of soluble particles in cA549per**

Immune precipitation, performed according to Millan et al. [42], followed by precipitation with polyethylene glycol (PEG), was used to obtain subfractions of cA549per. In brief, 125  $\mu$ l cA549per was incubated with an equal volume of polyclonal goat anti-RSV (1 h; 37 °C); 5  $\mu$ l protein A–agarose (Gibco) was then added; and the mixture was incubated overnight at 4 °C with continuous shaking.

Thereafter, the beads were removed by low-speed centrifugation. To the decanted supernatant (250  $\mu$ l), 6%(w/v) polyethylene glycol 8000 (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added and incubated overnight at 4 °C with continuous shaking. The resulting suspension was centrifuged (9500 rpm; 1 h; 4 °C) in a fixed angle rotor (TLA-100.2,

Beckman, Palo Alto, CA, USA) and the supernatant (sPEG) and pellet (pPEG) were collected. The PEG precipitation was iterated on four sequential sPEG.

## **2.9. Detection of viral proteins in precipitated pellet and supernatant of cA549**

Each supernatant obtained from cA549per after the precipitation procedure was mixed with sample buffer (8.5 M urea; 0.5 M  $\beta$ -mercaptoethanol) and the mixture was boiled for 12 min. Thereafter, proteins (1  $\mu$ g/lane) in the supernatants and in the pellets were separated by SDS–PAGE gradient (8–20%). After electrophoresis, the separated protein subunits were transferred to a nitrocellulose membrane sheet (Hybond C-extra, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, England) that had been blocked with 5% (w/v) non-fat dried milk in phosphate-buffered saline (PBS). Then, as primary antibody, either the polyclonal goat anti-RSV (1:400 in PBS–0.3% Tween 20) or monoclonal anti-protein F or anti-protein G (1:5 in PBS–0.3% Tween 20) was added. After overnight incubation at 4 °C and exhaustive rinsing with PBS–0.3% Tween 20, second antibody (either rabbit anti-goat or goat anti-mouse) conjugated with peroxidase (1:500 in PBS–0.3% Tween 20; Zymed Laboratories, San Francisco, CA) was added and incubated (1 h; room temperature). After having been exhaustively rinsed with PBS–0.3% Tween 20, the antigen–antibody complexes were developed with a chemiluminescent assay system, as described by the manufacturer (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, UK).

## **2.10. Effect of cA549per on IL-8 mRNA synthesis and protein secretion**

The supernatant and pellet obtained after precipitation were used to regulate IL-8 mRNA expression and protein synthesis. Confluent monolayers of A549 cells grown in 48-well plates ( $3 \times 10^5$  cells/well) were incubated 1 min at room temperature with 20  $\mu$ l test material/well. Thereafter, the fluid in each well was removed and discarded; the cells were washed twice with PBS; and fresh PBS (200  $\mu$ l) was added to each well. The cultures then were incubated at 37 °C either for 2 h for the determination of IL-8 mRNA or for 6 h for the determination of extra-cellular protein.

## **2.11. Statistical analysis**

Data are expressed as means of three independent determinations  $\pm$  one standard error deviation. Analysis of the differences between IL-8 mRNA fold increase or IL-8 protein fold induction between assays with A549per and A549m cells was performed with a non-parametric Kruskal–Wallis rank test [43], using the JMP statistical package version 3.1 [44]. *P* values  $\leq 0.05$  were considered statistically significant.

# **3. Results**

## **3.1. RSV persists in A549 cells**

Highly reproducible persistently RSV-infected A549 cultures were achieved after sequential passages of those cells surviving infection. These cultures did not exhibit cell destruction phases, had a high percentage of cells that expressed viral antigen, and had



low levels of extra-cellular infecting viral particles. One of these cultures (A549per) was subcultured and further characterized.

Indirect immunofluorescence (data not shown) and cytometric analysis of A549per passages demonstrated that RSV surface antigen was expressed on A549per cells. The percentage of cells expressing viral antigen increased during the passages: At passage 43, 50% of the cells expressed antigen (Fig. 1A) and, in subsequent passages (60–78), values of 93–97% were obtained (Figs. 1B and C). In contrast, in acutely infected A549 cultures, the highest percentage of antigen-positive cells was 42% (Fig. 1D). A549per has been maintained in our laboratory for over 4 years; cells from passages 65 to 78 were used in this work.

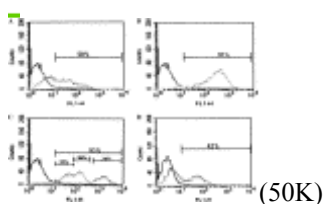


Fig. 1. Cells from A549per culture express RSV antigen. A549per cells were incubated with polyclonal anti-RSV serum, stained with anti-rabbit–fluorescein isothiocyanate conjugate, and then analyzed by flow cytometry as described elsewhere [41]. In each experiment, an isotype control (pre-immune serum) was included and the resulting value for fluorescence was subtracted in all assays. The log of fluorescence intensity is shown on the abscissa and the cell number on the ordinate. The percentage of cells presenting viral antigen is given. (A) Passage 43; (B) passage 65; (C) passage 73; and (D) RSV acutely infected cells, (m.o.i. of 1, at 48 h post-infection).

Extra-cellular infectious virus was not detectable by TCID<sub>50</sub> or by plaque assay, but infective virus particles were evidenced by viral antigen expressed on A549 cells infected with cA549per from various passages (Figs. 2B and E), thus implying that low levels of infectious virus and defective particles had been continuously produced. The presence of defective particles was confirmed by interference assays and sucrose gradient centrifugation [25] (results not shown).

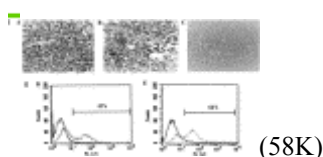


Fig. 2. Extra-cellular infectious viruses are present in A549per culture. (I) RSV antigen in infected A549 cells. A549 cell monolayers were infected with (A) A549 supernatant obtained from acute-infected cells (cA549a); (B) cA549per (passage 58); or (C) cA549m. Viral antigen was visualized by indirect immunoperoxidase assay with in-house polyclonal rabbit anti-RSV serum (1:100) as first antibody and anti-rabbit–peroxidase conjugate (1:500, Amersham) as second antibody. (II) Cell-surface viral antigen on A549 cells determinations incubated with (D) cA549a or (E) cA549per (passage 58). The percentage of cells expressing viral antigen was determined by flow cytometry analysis as described in legend of Fig. 1.

### 3.2. RSV persistence up-regulates IL-8 mRNA synthesis

Determination of the induction levels of IL-8 mRNA, expressed as fold increase (ratio of levels of IL-8 mRNA/housekeeping gene  $\beta$ 2-microglobulin mRNA), showed that whereas the constitutive increase of IL-8 mRNA for A549m was 0.5-fold, for passages of A549per, the values ranged from 1.8- to 2.7-fold (Fig. 3). Difference in mRNA fold increase values between A549per passages and A549m was statistically significant ( $P = 0.0009$ ). The relatively constant value of the fold increase in IL-8 mRNA during subsequent passages implies that RSV persistence in A549 cells constantly up-regulated the synthesis of IL-8 mRNA. That the amplified IL-8 mRNA segment corresponded to the segment between nucleotides 847 and 1345 was shown by restriction analysis with *RsaI* (results not shown; Boehringer–Mannheim, Germany).

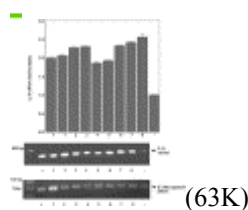


Fig. 3. Intracellular IL-8 mRNA is enhanced in A549per cells compared to that in A549 cells. Ethidium-bromide-stained agarose gel of RT-PCR of cDNA amplified products and the fold increase in the ratio of mRNA (IL-8/ $\beta$ 2). The mRNA of IL-8 and of  $\beta$ 2 microglobulin were determined at various A549per passages, with that from acute-infected A549 (+) and A549m (-) as positive and negative controls, respectively. Lane 1, passage 65; lane 2, passage 66; lane 3, passage 67; lane 4, passage 68; lane 5, passage 69; lane 6, passage 70; lane 7, passage 72; and lane 8, passage 73. Rank sums of IL-8 mRNA fold increase assessed in A549per passages differed significantly from mock-infected cells ( $\chi^2 = 28.114$ ,  $P = 0.0009$ ).

### 3.3. cA549per up-regulates IL-8 mRNA synthesis

In determining whether the increased production of IL-8 mRNA was due to soluble mediators secreted by persistently infected A549 cells, it was found that when fresh A549 cells were incubated with cA549per, the fold increase of mRNA synthesis was higher than the base line (constitutive) value ( $P = 0.0052$ ) with the highest value at 24 h incubation and with concomitant decreases at 48 and 96 h (Fig. 4A). The data suggest that the persistently infected A549 cells produced extra-cellular mediators that up-regulated IL-8 mRNA synthesis.

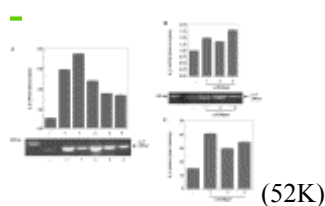


Fig. 4. cA549per up-regulates IL-8 mRNA in A549cells. (A) Ethidium-bromide stained-agarose gel of RT-PCR of cDNA amplified products and the fold increase in mRNA. IL-8 mRNA was determined at various times of interaction between cA549per and A549 cells and expressed as described in Fig. 3. Lane 1, 4 h; lane 2, 24 h; lane 3, 48 h; and lane 4, 96 h. Rank sums of IL-8 mRNA fold increase assessed in

A549per passages differed significantly from mock-infected cells ( $\chi^2 = 16.6477$ ,  $P = 0.0052$ ). (B,C) Infectious virus particles and/or extra-cellular biological active factors in cA549per do not contribute to IL-8 induction. Ethidium-bromide-stained agarose gel of RT-PCR of cDNA amplified products and the fold increase in mRNA and secreted protein. Chemokine induction was evaluated through IL-8 mRNA synthesis and protein secretion of A549 cells after 24 h of incubation with untreated; UV irradiated, or heated cA549. (B) IL-8 mRNA fold increase with cA549per either without treatment (lane 1), or inactivated by UV irradiation (lane 2) or by heat (lane 3). (C) Secreted IL-8 protein, determined by ELISA as described in Section 2. Secreted IL-8 protein induced by cA549per either without treatment (bar 1), or inactivated by UV irradiation (bar 2) or by heat (bar 3); cA549m (-) negative control.

### 3.4. cA549per up-regulation of IL-8 is not altered after thermal and UV inactivation

The contribution of infectious particles and/or biological active factors present in cA549per to the expression of chemokine was evaluated in parallel assays in which either untreated cA549per or cA549per previously inactivated (UV irradiated or heated) was used. Prior to the assay, the amounts of infectious virus particles and IL-1 $\alpha$  in cA549 were measured by ELISA (R&D Systems), detection range <1 pg/ml. When extra-cellular levels of IL-1 $\alpha$  were determined in cA549m and cA549per both before and after inactivation (UV or heat), no extra-cellular IL-1 $\alpha$  was found (results not shown). Furthermore, the participation of IL-1 $\alpha$  in concentrations under 1 pg/ml as inductor of the chemokine was eliminated by blocking IL-1 $\alpha$  with a cell-receptor antagonist (rIL-1ra; from R&D systems) as described by Patel et al. [40]. Briefly, cA549m and cA549per were pre-incubated for 3 h at 37 °C with excess of rIL-1ra (more than 10-fold (2  $\mu$ g/ml) of the concentration) required to neutralize IL-1 $\alpha$  detected in cA549a (supernatant from acute-infected cells, m.o.i. of 1 and 48 h post-infection), 150  $\mu$ l of the mixture was used to induce IL-8 in A549 cells as described in Section 2. No essential differences in the values for IL-8 mRNA and protein secretion were observed between assays that were done with and without the IL-1 $\alpha$  cell-receptor antagonist (data not shown).

When cA549per was incubated with A549 cells, a high percentage of the cells (65%) presented RSV antigen. However, those values dropped to 0.9–5% when either the UV-irradiated or heat-treated supernatants were used (results not shown), thereby implying that infectivity did not survive UV or heat treatment. No significant difference on IL-8 mRNA synthesized was observed when A549 cells were incubated with cA549per inactivated or untreated (Fig. 4B). The IL-8 protein released by A549 cells incubated with cA549per, whether untreated or inactivated, showed a 2- to 2.5-fold increase over constitutive levels (Fig. 4C), with basal protein secretion (cA549m) at 15 pg/ml and that induced by cA549per in a range of 30–40 pg/ml.

Therefore, the data suggest that enhancement of IL-8 mRNA synthesis and release of protein in response to incubation with cA549per was not mediated by infectious virus particles or extra-cellular biological active factors. Because a likely candidate for the induction effect was soluble viral protein(s), we attempted to remove them from cA549per fluids.

### 3.5. Viral proteins were present in cA549per supernatant after immune and polyethylene glycol precipitation

Analysis of cA549per first by SDS–PAGE gradient electrophoresis (Fig. 5A, lane 5) and second by immunoblot (Fig. 5B, lane 5) showed that polyclonal anti-RSV recognized proteins with a wide range of apparent molecular weights (30–120 kDa), which might reflect the presence of complete, degraded proteins and/or protein subunits.

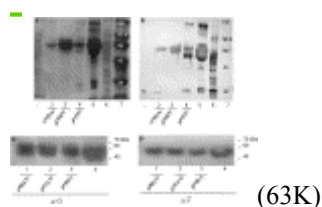


Fig. 5. RSV proteins are present in cA549per fluids, pellets, and supernatants. (A) Proteins detected with Coomassie blue in gradient SDS–PAGE. (B) Western blot analysis of proteins in cA549 electrophoretically separated in SDS–PAGE gradient (8–20%), visualized with goat polyclonal anti-RSV, anti-goat peroxidase conjugate (1:400, Amersham), and ECL detection system. Lane 1, cA549m (–); lane 2, cA549per, sPEGIV; lane 3, cA549per, pPEGIV; lane 4, pA549per, pPEGII; lane 5, cA549per; lane 6, cA549a; and lane 7, molecular weights. (C,D) RSV proteins are recognized by monoclonal antibodies. Western blot analysis of proteins in precipitated cA549 separated in SDS–PAGE gradient (8–20%), visualized with monoclonal anti-F or anti-G RSV proteins, anti-mouse peroxidase conjugate (1:400, Santa Cruz, Biotechnology), and ECL detection system. (C) (anti-G protein) and (D) (anti-F protein). Lane 1, cA549per, sPEGIV; lane 2, cA549per, pPEGIV; lane 3, cA549per, pPEGII; and lane 4, cA549per.

After immune precipitation, cA549per supernatants were not free of viral proteins: RSV proteins with apparent molecular weights ranging from 45 to 90 kDa were detected (results not shown). When these supernatants were further precipitated with polyethylene glycol, although viral proteins with molecular weights lower than 40 and higher than 70 kDa were removed, proteins in the range of 40–70 kDa remained. These proteins were recognized by polyclonal anti-RSV (Fig. 5B, lanes 2–4) and by both monoclonal antibodies against RSV G and against RSV F proteins (Figs. 5C and D, lanes 1–3).

cA549per supernatant post-PEG precipitation (sPEGIV) showed a single protein band (Fig. 5A, lane 2) that was recognized by polyclonal anti-RSV (Fig. 5B, lane 2) and by monoclonal anti-RSV protein G and anti-RSV protein F (Figs. 5C and D, lane 1). Moreover, the molecular weight of the band agrees with the reported values for G and F proteins [15] and [16], with the width of the band possibly explained by variations in electrophoretic mobility due to different patterns of protein glycosylation.

### 3.6. Soluble F and G RSV proteins induce IL-8 in A549 cells

Not only cA549per but also the supernatants and pellets obtained after immune and polyethylene glycol precipitation enhanced IL-8 mRNA synthesis and protein secretion in A549 cells, thus suggesting that RSV persistent infection in A549 cells induced the synthesis of soluble mediators, which in turn, up-regulated the synthesis and secretion of IL-8 (Figs. 6A and B). The enhancement effect was observed after 1 min of interaction between cA549per and A549 cells, thereby implying that ligand–receptor interaction may trigger the observed enhancement effect.

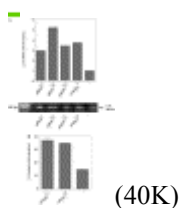


Fig. 6. (A,B) Pellet and supernatant of cA549per up-regulate IL-8 gene expression. Ethidium-bromide-stained agarose gel of RT-PCR of cDNA amplified products and the fold increase in mRNA and secreted protein. Pellet or supernatant obtained from polyethylene-glycol-precipitated cA549 was incubated for 1 min with A549 cells. IL-8 mRNA synthesis and protein secretion were determined as described. (A) IL-8 mRNA synthesis and fold increase: lane 1, cA549per, pPEGI; lane 2, cA549per, pPEGII; lane 3, cA549per, pPEGIV; and lane 4, cA549per, sPEGIV; cA549m (-). Rank sums of IL-8 mRNA fold increase assessed in pellet and supernatant A549per differed significantly from mock-infected cells ( $\chi^2 = 13.6216$ ,  $P = 0.0086$ ). (B) IL-8 secreted protein: bar 1, cA549per, pPEGIV; bar 2, cA549per, sPEGIV; cA549m (-). Rank sums of IL-8 protein fold induction assessed in pellet and A549per cultures pellet marginally differed from mock-infected cells ( $\chi^2 5.6471$ ,  $P = 0.0594$ ).

When cA549per or supernatants and pellets obtained after immune and polyethylene glycol precipitation were degraded with trypsin (at 1.5%, incubation 5 h at 37 °C) the viral protein bands were not detectable by immunoblot and no IL-8 mRNA and protein secretion were observed (results not shown). This observation supports the interpretation that the chemokine up-regulation is induced by viral proteins F and/or G.

## 4. Discussion

IL-8 induction in airway human epithelial cells is induced by RSV infection in a biphasic manner, the early induction appears independent of viral replication; 2 h post-infection [38]. To determine whether RSV persistence in lower airway epithelial cells regulates IL-8 gene expression and protein release, we established a persistent RSV infection in A549, a human lung epithelial cell line, and used mock-infected A549 cells as control.

To obtain persistently RSV-infected A549 culture, with nearly all cells expressing viral antigen and low levels of virus replication, infection had to be done at low multiplicity. Immediate establishment of RSV persistence in human airway epithelial cell lines, HEp-2 and H358, can be obtained by infecting with virus stocks enriched with defective particles [25]. In the present experiments, the input virus used was not enriched with defective particles, although the presence of defective viral particles was evidenced during the passages (results not shown). Moreover, it is likely that RSV present in A549per genetically differs from the input virus; perhaps virus that persists in the culture might be the result of various cycles of RSV propagation in A549.

Throughout RSV persistence in A549 cells, IL-8 mRNA synthesis was stimulated; higher fold increases were observed in A549per cells than in A549m cells (Fig. 3). Moreover, the values were similar among the passages, thus suggesting continuous stimulation of IL-8 mRNA transcription during persistent infection.

We were particularly interested in determining whether extra-cellular mediators present in cA549per were also able to up-regulate IL-8 induction. IL-8 mRNA synthesis was greater when A549 cells were incubated with cA549per than when incubated with cA549m (Fig. 4A). Therefore, it is quite possible that infected A549 secreted mediators that stimulated IL-8 expression. Both live virus [37] and extra-cellular IL-1 $\alpha$ , independent of RSV replication [40], have been reported to induce IL-8 in RSV-infected A549 cells.

However, in the present system, the likelihood that infectious virus and/or IL-1 $\alpha$  were involved in IL-8 enhancement was ruled out because there were no differences in the results obtained with either inactivated (irradiated or heated) or untreated cA549 supernatants. These findings suggest that IL-8 induction, with concomitant protein release (Figs. 4B and C), was not linked to infectious viral particles or to labile biological factors present in cA549per. No infectious virus was present in inactivated (UV irradiated or heated) cA549per and IL-1 $\alpha$  was not detected in cA549per before or after heat treatment (results not shown). Moreover, no essential differences in the values for IL-8 mRNA and protein secretion were observed between assays that were done with and without the IL-1 $\alpha$  cell-receptor antagonist (data not shown). Double-stranded RNA did not participate in IL-8 induction [45] because the removal of double-stranded RNA from cA549 from either acutely or persistently infected cells had no effect on IL-8 mRNA synthesis or protein secretion (results not shown). dsRNA was removed according to Majde et al. [46]. Briefly, cA549 and cA549per were incubated with RNase A (Pharmacia, Uppsala, Sweden) at a concentration to degrade ssRNA but not dsRNA (2  $\mu$ g/ml at 22 °C for 60 min) or to degrade all RNA (20  $\mu$ g/ml at 80 °C for 60 min). RNA was then extracted, analyzed in agarose gel, and used to induce IL-8 as described. Furthermore, the chemokine was not up-regulated when cA549per fluids that had been digested with trypsin were used (data not shown), implying that proteins were involved in IL-8 mRNA synthesis and protein secretion.

Our results (Figs. 5C and D) favor the idea that extra-cellular F and G viral proteins could well be secreted by infected A549 cells, remained after the precipitation procedures, and enhance IL-8 mRNA synthesis and protein secretion in A549 cells (Figs. 6A and B). That sPEGIV from A549per gave a distinct band in SDS-PAGE gradient (Figs. 5A and B, lane 2), which was recognized by monoclonal antibodies against F and G proteins (Figs. 5C and D, lane 1), and that sPEGIV stimulated IL-8 mRNA synthesis and protein secretion support the idea (but not prove it) that these viral proteins are indeed involved in the induction of chemokine.

The monoclonal antibodies we used recognized F and G proteins equally, and did not react with other viral proteins (results not shown). Further studies are in progress to determine whether either F or G by itself can up-regulate IL-8 induction in A549 cells. However, because we cannot discard the possibility that other viral proteins present in cA549per may have an enhancing effect (Figs. 5A and B), studies that address the identification of these other putative proteins and their effect(s) in the production of chemokine are in progress.

Enhancement of the induction of chemokine in A549 cells after 1 min interaction with cA549per may be caused by stimulation of IL-8 gene transcription in response to viral proteins interacting with receptor(s) on A549 cells. The brisk induction effect may be explained by interaction between viral proteins and cell receptors constitutive and/or

induced by RSV infection, which then turns on the expression of chemokine gene [47] and [48]. Studies addressing this hypothesis are in progress.

The present study is not only the first to explore the regulation, by cultured human respiratory epithelial cells persistently infected with RSV, of IL-8 gene expression and protein secretion, but also the first to provide evidence that IL-8 synthesis and protein secretion are continuously up-regulated by persistently RSV-infected A549 cells. As IL-8 is a potent chemotactic and activating agent for neutrophils, the production of IL-8 in persistently infected lower airway epithelial cells and by secreted soluble RSV protein(s) targeted to these cells might prove to represent a major step in virus-induced inflammation of the respiratory tract.

---

## Acknowledgments

We are grateful to Dr. Rafael Bojalil and Dr. Felipe Vadillo for help with IL-1 $\alpha$  determinations. We also thank Dr. Gustavo Pedraza-Alva for help with FACS analysis and Dr. Yvonne Rosenstein for her constructive discussions. This investigation was partially supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (42867/A-1) and from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN203303, IX241804-1). R.T.M. was supported by Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado (Scholarship 102373) and Sistema Nacional de Investigadores del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Scholarship 21393). The authors thank Dr. Juan Nuñez for help with statistical analysis and Veronica Yakoleff for editing the manuscript.

---

## References

- [1] P.J. Openshaw, G.S. Dean and F.J. Culley, Links between respiratory syncytial virus bronchiolitis and childhood asthma: clinical and research approaches, *Pediatr. Infect. Dis. J.* **22** (2003), pp. S58–S64.
- [2] G. Piedimonte, The association between respiratory syncytial virus infection and reactive airway disease, *Respir. Med.* **96** (2002), pp. S25–S29. [SummaryPlus](#) | [Full Text + Links](#) | [PDF \(1078 K\)](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)
- [3] N. Sigurs, R. Bjarnason, F. Sigurbergsson and B. Kjellman, Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161** (2000), pp. 150–157.
- [4] N. Sigurs, P.M. Gustafsson, R. Bjarnason, F. Lundberg, S. Schmidt, F. Sigurbergsson and B. Kjellman, Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **171** (2005), pp. 37–141.

- [5] N. Sigurs, Clinical perspectives on the association between respiratory syncytial virus and reactive airway disease, *Respir. Res.* **3** (2002), pp. S8–S14. [Full Text via CrossRef](#)
- [6] J.T. McBride, Pulmonary function changes in children after respiratory syncytial virus infection in infancy, *J. Pediatr.* **135** (1999), pp. 28–32. [Abstract-MEDLINE](#) | [Order Document](#)
- [7] R.T. Stein, D. Sherrill, W.J. Morgan, C.J. Holberg, M. Halonen, L.M. Taussig, A.L. Wright and F.D. Martinez, Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years, *Lancet* **354** (1999), pp. 541–545. [SummaryPlus](#) | [Full Text + Links](#) | [PDF \(51 K\)](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)
- [8] F.D. Martinez, Respiratory syncytial virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma, *Pediatr. Infect. Dis. J.* **22** (2003), pp. S76–S82. [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract-MEDLINE](#) | [Order Document](#) | [Full Text via CrossRef](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)
- [9] C.B. Hall, W.J. Hall, C.L. Gala, F.B. MaGill and J.P. Leddy, Long-term prospective study in children after respiratory syncytial virus infection, *J. Pediatr.* **105** (1984), pp. 358–364. [Abstract](#) | [PDF \(624 K\)](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)
- [10] P.J. Openshaw, Potential mechanisms causing delayed effects of respiratory syncytial virus infection, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163** (2001), pp. S10–S13. [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract-Elsevier BIOBASE](#) | [Abstract-MEDLINE](#) | [Order Document](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)
- [11] R.B. Couch and J.A. Englund, Respiratory viral infections in immunocompetent and immunocompromised persons, *Am. J. Med.* **102** (1997), pp. 2–9. [SummaryPlus](#) | [Full Text + Links](#) | [PDF \(210 K\)](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)
- [12] T. Seemungal, R. Harper-Owen, A. Bhowmik, I. Moric, G. Sanderson, S. Message, P. Maccallum, T.W. Meade, D.J. Jeffries, S.L. Johnston and J.A. Wedzicha, Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164** (2001), pp. 1618–1623. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract-Elsevier BIOBASE](#) | [Order Document](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)
- [13] P.L. Collins, R.M. Chanock and B.R. Murphy In: D.M. Knipe and P.M. Howley, Editors, *Fields virology*, Lippincott Williams & Williams, Philadelphia (2001), pp. 1443–1485. [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)
- [14] R.A. Lamb and D. Kolakofsky In: D.M. Knipe and P.M. Howley, Editors, *Fields virology*, Lippincott Williams & Williams, Philadelphia (2001), pp. 1305–1340. [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)
- [15] G.W. Wertz, M. Krieger and L.A. Ball, Structure and cell surface maturation of the attachment glycoprotein of human respiratory syncytial virus in a cell line deficient in O



glycosylation, *J. Virol.* **63** (1989), pp. 4767–4776. [Abstract-MEDLINE](#) | [Order Document](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[16] J. Zhou, R.E. Dutch and R.A. Lamb, Proper spacing between heptad repeat B and the transmembrane domain boundary of the paramyxovirus SV5 F protein is critical for biological activity, *Virology* **239** (1997), pp. 327–339. [Abstract](#) | [Abstract + References](#) | [PDF \(1475 K\)](#)

[17] G. Isaia, O. Teodosiu, G. Popescu, P. Athanasiu, I. Sternberg and Z. Dumitriu, Persistence of viruses in the nasopharynx of apparently healthy children aged 0–5 years. Results of investigations performed in 1982–1983, *Virologie* **36** (1985), pp. 175–179. [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract-MEDLINE](#) | [Order Document](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[18] B.G. Mills, F.R. Singer, L.P. Weiner and P.A. Holst, Immunohistological demonstration of respiratory syncytial virus antigens in Paget disease of bone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78** (1981), pp. 1209–1213. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Order Document](#) | [Full Text via CrossRef](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[19] H.A. Cubie, L.A. Duncan, L.A. Marshall and N.M. Smith, Detection of respiratory syncytial virus nucleic acid in archival postmortem tissue from infants, *Pediatr. Pathol. Lab. Med.* **17** (1997), pp. 927–938. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Order Document](#) | [Full Text via CrossRef](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[20] B.F. Fernie, E.C. Ford and J.L. Gerin, The development of Balb/c cells persistently infected with respiratory syncytial virus: presence of ribonucleoprotein on the cell surface, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **167** (1981), pp. 83–86. [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract-MEDLINE](#) | [Order Document](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[21] R.E. Sarmiento, R. Tirado and B. Gomez, Characteristics of a respiratory syncytial virus persistently infected macrophage-like culture, *Virus Res.* **84** (2002), pp. 45–58. [SummaryPlus](#) | [Full Text + Links](#) | [PDF \(480 K\)](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[22] R.W. Simpson and M. Linuma, Recovery of infectious proviral DNA from mammalian cells infected with respiratory syncytial virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72** (1975), pp. 3230–3234. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Order Document](#) | [Full Text via CrossRef](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[23] P. Baldrige and L.B. Senterfit, Persistent infection of cells in culture by respiratory syncytial virus, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **15** (1976), pp. 684–688. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Order Document](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[24] C.R. Bangham and A.J. McMichael, Specific human cytotoxic T cells recognize B-cell lines persistently infected with respiratory syncytial virus, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

*USA* **83** (1986), pp. 9183–9187. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Order Document](#) | [Full Text via CrossRef](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[25] V.M. Romero and B. Gomez, Establishment of respiratory syncytial virus persistence in cell lines: association with defective interfering particles, *Intervirology* **46** (2003), pp. 190–198.

[26] T.L. Noah and S. Becker, Chemokines in nasal secretions of normal adults experimentally infected with respiratory syncytial virus, *Clin. Immunol.* **97** (2000), pp. 43–49. [Abstract](#) | [Abstract + References](#) | [PDF \(103 K\)](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[27] A. Jones, J.M. Qui, E. Bataki, H. Elphick, S. Ritson, G.S. Evans and M.L. Everard, Neutrophil survival is prolonged in the airways of healthy infants and infants with RSV bronchiolitis, *Eur. Respir. J.* **20** (2002), pp. 651–657. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract-Elsevier BIOBASE](#) | [Order Document](#) | [Full Text via CrossRef](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[28] P. Sheeran, H. Jafri, C. Carubelli, J. Saavedra, C. Johnson, K. Krisher, P.J. Sanchez and O. Ramilo, Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease, *Pediatr. Infect. Dis. J.* **18** (1999), pp. 115–122. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Order Document](#) | [Full Text via CrossRef](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[29] K.A. Neilson and E.J. Yunis, Demonstration of respiratory syncytial virus in an autopsy series, *Pediatr. Pathol.* **10** (1990), pp. 491–502. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Order Document](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[30] W. Aherne, T. Bird, S.D. Court, P.S. Gardner and J. McQuillin, Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children, *J. Clin. Pathol.* **23** (1970), pp. 7–18. [Abstract-MEDLINE](#) | [Order Document](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[31] A. Tuffaha, J.E. Gern and R.F. Lemanske Jr., The role of respiratory viruses in acute and chronic asthma, *Clin. Chest Med.* **21** (2000), pp. 289–300. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Order Document](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[32] T.A. Seemungal and J.A. Wedzicha, Viral infections in obstructive airway diseases, *Curr. Opin. Pulm. Med.* **9** (2003), pp. 111–116. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Order Document](#) | [Full Text via CrossRef](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[33] S. Becker, H.S. Koren and D.C. Henke, Interleukin-8 expression in normal nasal epithelium and its modulation by infection with respiratory syncytial virus and cytokines tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **8** (1993), pp. 20–27. [Abstract-MEDLINE](#) | [Order Document](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[34] T.L. Noah, F.W. Henderson, I.A. Wortman, R.B. Devlin, J. Handy, H.S. Koren and S. Becker, Nasal cytokine production in viral acute upper respiratory infection of childhood, *J. Infect. Dis.* **171** (1995), pp. 584–592. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-Elsevier BIOBASE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Order Document](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[35] R.L. Smyth, K.J. Mobbs, U. O’Hea, D. Ashby and C.A. Hart, Respiratory syncytial virus bronchiolitis: disease severity, interleukin-8, and virus genotype, *Pediatr. Pulmonol.* **33** (2002), pp. 339–346. [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract-MEDLINE](#) | [Order Document](#) | [Full Text via CrossRef](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[36] M. Marini, E. Vittori, J. Hollemborg and S. Mattoli, Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8 in bronchial epithelial cells of patients with asthma, *J. Allergy. Clin. Immunol.* **89** (1992), pp. 1001–1009. [Abstract](#) | [Full Text + Links](#) | [PDF \(2122 K\)](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[37] M.A. Fiedler, K. Wernke-Dollries and J.M. Stark, Respiratory syncytial virus increases IL-8 gene expression and protein release in A549 cells, *Am. J. Physiol.* **269** (1995), pp. 865–872.

[38] M.A. Fiedler, K. Wernke-Dollries and J.M. Stark, Mechanism of RSV-induced IL-8 gene expression in A549 cells before viral replication, *Am. J. Physiol.* **271** (1996), pp. 963–971.

[39] A. Casola, R.P. Garofalo, M. Jamaluddin, S. Vlahopoulos and A.R. Brasier, Requirement of a novel upstream response element in respiratory syncytial virus-induced IL-8 gene expression, *J. Immunol.* **164** (2000), pp. 5944–5951. [Abstract-Elsevier BIOBASE](#) | [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Order Document](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[40] J.A. Patel, Z. Jiang, N. Nakajima and M. Kunimoto, Autocrine regulation of interleukin-8 by interleukin-1alpha in respiratory syncytial virus-infected pulmonary epithelial cells in vitro, *Immunology* **95** (1998), pp. 501–506. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Order Document](#) | [Full Text via CrossRef](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[41] L. Zhang, M.E. Peeples, R.C. Boucher, P.L. Collins and R.J. Pickles, Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology, *J. Virol.* **76** (2002), pp. 5654–5666. [Abstract-Elsevier BIOBASE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract-MEDLINE](#) | [Order Document](#) | [Full Text via CrossRef](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[42] A. Millan, P. Aguilar, J.A. Mendez, J.A. Arias-Montano and A. Ortega, Glutamate activates PP125 (FAK) through AMPA/kainate receptors in Bergmann glia, *J. Neurosci. Res.* **66** (2001), pp. 723–729. [Abstract-MEDLINE](#) | [Order Document](#) | [Full Text via CrossRef](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[43] J.H. Zar, Biostatistical analysis, Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ (1999).

[44] SAS Institute, JMP Statistics and graphics guide v. 3.1., Cary North Carolina, 1995.

[45] J.E. Gern, D.A. French, K.A. Grindle, R.A. Brockman-Schneider, S. Konno and W.W. Busse, Double-stranded RNA induces the synthesis of specific chemokines by bronchial epithelial cells, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **28** (2003), pp. 731–737. [Abstract-Elsevier BIOBASE](#) | [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Order Document](#) | [Full Text via CrossRef](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[46] J.A. Majde, N. Guha-Thakurta, Z. Chen, S. Bredow and J.M. Krueger, Spontaneous release of stable viral double-stranded RNA into the extracellular medium by influenza virus-infected MDCK epithelial cells: implications for the viral acute phase response, *Arch. Virol.* **143** (1998), pp. 2371–2380. [Abstract-MEDLINE](#) | [Order Document](#) | [Full Text via CrossRef](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[47] M.M. Monick, T.O. Yarovinsky, L.S. Powers, N.S. Butler, A.B. Carter, G. Gudmundsson and G.W. Hunninghake, Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin, *J. Biol. Chem.* **278** (2003), pp. 53035–53044. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-Compendex](#) | [Abstract-Elsevier BIOBASE](#) | [Order Document](#) | [Full Text via CrossRef](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)

[48] R. Malhotra, M. Ward, H. Bright, R. Priest, M.R. Foster, M. Hurlle, E. Blair and M. Bird, Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells, *Microbes Infect.* **5** (2003), pp. 123–133. [SummaryPlus](#) | [Full Text + Links](#) | [PDF \(449 K\)](#) | [Abstract + References in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#)