



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

VIROLOGÍA

MECANISMO DE ADHESIÓN E INGESTIÓN DE BACTERIAS A MACRÓFAGOS
INFECTADOS CON VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

GERARDO ARREVILLAGA BONI

TUTOR: DRA. BEATRIZ GÓMEZ GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA

MIEMBROS COMITÉ TUTORAL

DR. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE
FACULTAD DE MEDICINA

DR. EDUARDO GARCÍA ZEPEDA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO D.F.

DICIEMBRE

2012



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.

Título:

“Mecanismo de adhesión e ingestión de bacterias
a macrófagos infectados con virus sincitial respiratorio”

Subtítulo:

**Interferencia en la Adhesión de *Haemophilus influenzae* no
tipificable (HiNT) a Macrófagos infectados persistentemente por
el virus sincitial respiratorio (VSR)**

RESUMEN

INTRODUCCIÒN

1. ASPECTOS GENERALES DEL VIRUS SINCIITAL RESPIRATORIO
2. INMUNIDAD E INMUNOPATOGÉNESIS
3. MACRÓFAGOS Y SU PAPEL MICROBICIDA
4. ICAM-1
5. PERSISTENCIA DE VSR
6. COINFECCIÒN ENTRE VIRUS RESPIRATORIOS Y BACTERIAS.
7. COINFECCIÒN ENTRE VSR-HAEMOPHILUS INFLUENZAE NO TIPIFICABLE
8. EPOC Y SU RELACIÒN CON VSR Y HINT
9. PUNTUALIZACIÒN DE ANTECEDENTES

10. ANTECEDENTES DIRECTOS

PROPUESTA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

POSTULADO

HIPÓTESIS GENERAL

OBJETIVO GENERAL

1. MATERIAL Y MÉTODOS

1.1 VIRUS Y LÍNEAS CELULARES

1.2 M ϕ N

1.3 M ϕ P.

1.4 BACTERIA

1.5 MARCAJE DE HINT

1.6 CITOMETRÍA DE FLUJO

1.7 CINÉTICA DE CAPTURA, ADHESION E INGESTIÒN DE HINT.

1.8 INHIBICIÒN DE RECEPTORES BETA GLUCANO DE M ϕ

1.9 MICROSCOPIA CONFOCAL

1.10 EFECTO DEL MEDIO CONDICIONADO DE M ϕ SOBRE LA CAPTURA DE HINT

- 1.11 EXTRACCIÓN DE RNA Y TRANSCRIPCIÓN REVERSA
- 1.12 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE RT-PCR
- 1.13 RT-PCR PUNTO FINAL
- 1.14 RT-PCR TIEMPO REAL
- 1.15 DETERMINACIÓN DE NIVELES DE EXPRESIÓN DE ICAM-1 POR INMUNODETECCIÓN TIPO WESTERN BLOT
- 1.16 EXTRACCIÓN PROTEÍNA TOTAL
- 1.17 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA
- 1.18 SDS-ELECTROFORESIS
- 1.19 EXPRESIÓN DE ICAM-1 EN SUPERFICIE CELULAR DE M ϕ
- 1.20 BLOQUEO DE ICAM-1 DE MEMBRANA EN M ϕ
- 1.21 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2 RESULTADOS

- 2.1 LA PERSISTENCIA DEL VSR REDUCE LA CAPTURA DE HINT
- 2.2 EL MEDIO CONDICIONADO DE LOS M ϕ NO ALTERA LA CAPTURA DE HINT
- 2.3 CINÉTICA DE CAPTURA, ADHESION E INGESTIÓN DE HINT.
- 2.4 LA LAMINARINA DISMINUYE LA CAPACIDAD PARA CAPTURAR HINT DE LOS M ϕ .
- 2.5 LA PERSISTENCIA DEL VSR REDUCE LA SÍNTESIS DE LA PROTEÍNA ICAM-1 Y SU EXPRESIÓN EN LA SUPERFICIE CELULAR
- 2.6 EL BLOQUEO DE ICAM-1 EN SUPERFICIE CON ANTI-ICAM-1 REDUCEN LA ADHESIÓN DE HINT AL M ϕ N

3 FIGURAS SUPLEMENTARIAS

- 3.1 CONFIRMACIÓN DE LA PERSISTENCIA DE LA LÍNEA CELULAR P388D1.
- 3.2 VISUALIZACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE LA CAPACIDAD DE CAPTURA DE HINT POR M ϕ
- 3.3 COMPARATIVO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL MENSAJERO DE PAF-R E ICAM-1

4 CONSIDERACIONES FINALES Y DISCUSIÓN

5 APÉNDICE

6 BIBLIOGRAFÍA

Resumen

La persistencia del virus sincitial respiratorio (VSR), se ha asociado con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y asma; infecciones de virus respiratorios y *Haemophilus influenzae* no tipificable (HiNT) se asocian a un incremento en el riesgo de exacerbaciones en pacientes con EPOC. El objetivo de esta investigación se centró en determinar en un modelo *in vitro* si la persistencia del VSR en macrófagos altera su capacidad para capturar (adherir e ingerir) a HiNT, utilizando la línea celular murina similar a macrófagos P388D1 (M ϕ) infectada de forma persistente por VSR (M ϕ P), como control se utilizaron M ϕ sin infectar (M ϕ N). La persistencia del VSR disminuyó la capacidad de captura, adhesión e ingestión de HiNT por los M ϕ P, determinada por ensayos de citometría de flujo con bacteria marcada con bromuro de etidio o con FITC. Se cuantificó la expresión a nivel de mensajero y proteína de ICAM-1 y PAFr, proteínas identificadas como ligandos de HiNT y se determinó el efecto del bloqueo de ICAM-1 en la capacidad de adhesión de HiNT por el macrófago. Los resultados indican que la persistencia del VSR en macrófagos murinos disminuye su capacidad para capturar HiNT por efecto de una regulación negativa en la expresión de ICAM-1 a nivel de mensajero.

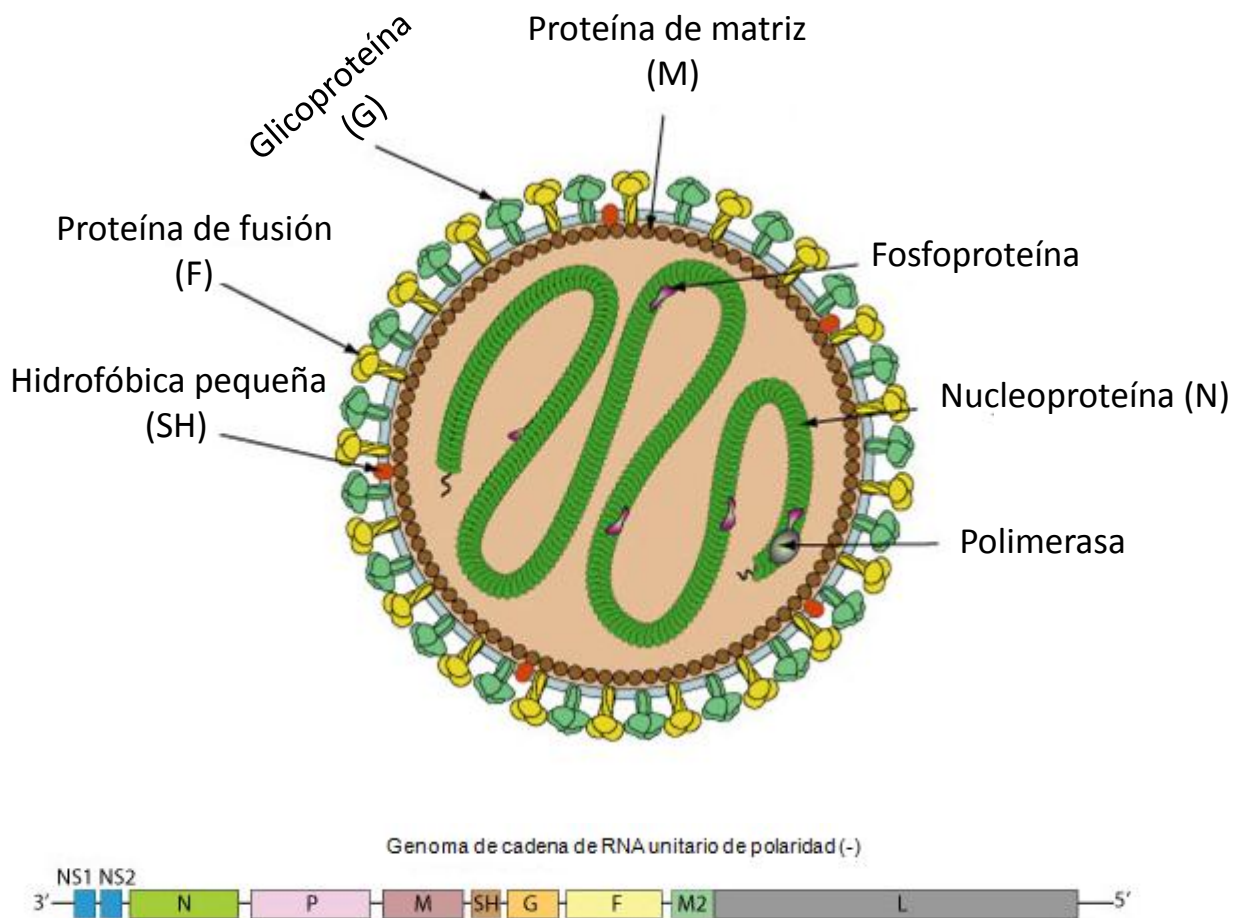
INTRODUCCIÒN

1. ASPECTOS GENERALES DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO

El virus sincital respiratorio (VSR) es el patógeno más importante a nivel mundial en infecciones virales del tracto respiratorio bajo en niños durante los primeros seis meses de vida (Tercier 1983; Kaneko, Watanabe et al. 2002), así como en personas inmunosuprimidas (Hall, Powell et al. 1986; Chanock, Parrott et al. 1992) y adultos mayores (Cesario ; Falsey 2005), el patrón epidemiológico se presenta anualmente, el pico de incidencia en países templados inicia durante los meses invernales y en los tropicales durante la época de lluvias (Nwankwo, Dym et al. 1988; Kaneko, Watanabe et al. 2002)

El VSR está clasificado en el orden de los *Mononegavirales* dentro del género *Pneumovirus* de la familia *Paramyxoviridae*. El genoma viral consta de una cadena de RNA de polaridad negativa con 15,385 nucleòtidos que da lugar a la transcripción de 10 RNAm subgenómicos, que codifican 11 proteínas 9 de las cuales son estructurales (N, P, L F, G, SH, M, M2-1 y M2-2) y 2 no estructurales (NS1 y NS2) (Collins and Graham 2008). El virión consiste de una nucleocápside contenida dentro de una bicapa lipídica, que proviene de la membrana plasmática de la célula hospedera, en la cual se integran las glicoproteinas F o de fusión 70 (Kda/574 a.a.), G (90 kDa/298 a.a.) proteína de unión y la SH o hidrofóbica (7.5-40 kDa/64 a.a.) que forma canales iónicos pentaméricos (Gan, Ng et al. 2008; Gan, Tan et al. 2012), la función de esta proteína se asocia a la prevención de apoptosis por inhibición de TNF alpha (Fuentes, Tran et al. 2007); la nucleocápside está formada por el material genómico, la polimerasa L (250 kDa), la nucleoproteína N (43.4

kDa/391a.a.), y la fosfoproteína P (27.1 kDa /241 a.a.). La matriz se constituye por la proteína M o de matriz (28.7 kDa/ 256 a.a.). El gene M2 contiene dos marcos abiertos de lectura (ORFs) da lugar a las proteínas M2-1 (22.1kDa/ 256 a.a.) y M2-2 (11 kDa/90 a.a.) las cuales se sugiere funcionan como factor anti terminador y factor regulador de la transcripción y traducción respectivamente. Al microscopio electrónico el virión aparece como una partícula pleomórfica con un tamaño que varía entre 150 y 300nm (Lambert, Pons et al. 1980; Collins and Graham 2008).



Modificación del original obtenido en "Viral Zone"
Zwiss Institute of Bioinformatics

Figura 1. Virus Sincitial Respiratorio (VSR)

La infección viral se inicia en el tracto respiratorio superior con la unión de la glicoproteína G a los glicosaminoglicanos (GAGs) sulfato de heparina y sulfato de condroitina b (Martinez and Melero 2000); sin embargo estas no son las únicas moléculas que funcionan como receptor, la proteína G se une a receptores de la quimiocina fractalcina CX₃CL1, es decir al receptor CX₃CR1 (Tripp, Jones et al. 2001). La proteína F o de fusión se une a moléculas de superficie celular como la heparina (Feldman, Audet et al. 2000), lo que permite la fusión de la membrana plasmática de la célula hospedera con el virus así como la formación de sincitios (Pastey, Crowe et al. 1999; Pastey, Gower et al. 2000). La nucleocápside es liberada al citoplasma donde se lleva a cabo el ciclo replicativo viral (Hacking and Hull 2002; Collins and Graham 2008).

1.1. Transcripción, Replicación y Liberación del VSR

Al término de las regiones 3' y 5' del genoma viral hay regiones extragénicas cortas de 44 y 155 nucleótidos respectivamente llamadas regiones líder (3'Le) y tráiler (5' Tr), la secuencia 3' Le contiene una región promotora única, el comienzo de la transcripción inicia con la asociación de la polimerasa viral con la región promotora 3' Le que sigue el orden 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2/1-2/-L-5', el proceso progresivo es guiado por las señales conservadas de inicio (SI) y paro (ST) dispuestas entre los genes. Cuando la polimerasa alcanza el sitio SI se agrega un casquete (cap) al final de la región 5', la polimerasa continúa hasta alcanzar la señal ST a la que se agrega una secuencia poliA, finalmente se libera el RNAm del gene viral y el proceso se repite para la siguiente secuencia genética. Durante la replicación la polimerasa ignora las señales de SI y ST para formar al antígenoma que sirve como plantilla para formar las progenies genómicas virales

las cuales se asocian con la proteína N formando una estructura helicoidal que se une a el complejo P-L y a M2-1 mientras las proteínas F, G y SH migran a la membrana citoplasmática, finalmente la proteína M coordina el ensamblaje de las proteínas de superficie con las de la nucleocápside y el virión es liberado por gemación (Hacking and Hull 2002; Collins and Graham 2008). Las proteínas no estructurales NS1 y NS2 se expresan en la célula hospedera, se les atribuyen funciones antagonistas del sistema de interferón y propiedades antiapoptóticas (Bitko, Shulyayeva et al. 2007; Collins and Graham 2008)

2. INMUNIDAD E INMUNOPATOGENESIS.

El VSR se multiplica y disemina en las mucosas del tracto respiratorio superior e infecta traquea, bronquios, bronquiólos y alvéolos. El periodo de incubación es 4-5 días.

(Kapikian, Bell et al. 1966). La respuesta inmune a la infección por VSR es permanente y participa en eliminación del virus así como en el proceso inflamatorio; sin embargo, aunque hay producción de anticuerpo neutralizante contra RSV y una respuesta específica de células T, la protección es ineficiente; las reinfecciones son comunes, aunque la severidad disminuye a medida que aumenta su frecuencia (Kimpen 1996; van Schaik, Obot et al. 2000). Los macrófagos son susceptibles a la infección por VSR (Panuska, Cirino et al. 1990; Merolla, Rebert et al. 1995; Raza, Blackwell et al. 2000) y representan la primera línea de defensa en el pulmón, se ha propuesto que las interferencia en las funciones del

macrófago alveolar por efecto de la infección del VSR, contribuye al aumento del riesgo de adquirir infecciones bacterianas secundarias (Franke-Ullmann, Pfortner et al. 1995).

3. MACRÓFAGOS Y SU PAPEL MICROBICIDA

Los macrófagos alveolares representan alrededor del 95% de las células recuperadas de lavados bronquio alveolares en humanos (Shapiro 1999; Gordon and Read 2002). La fagocitosis de patógenos llevada a cabo por esta estirpe celular da inicio a la respuesta inmune innata que a su vez orquesta la respuesta inmune adquirida (Aderem and Underhill 1999). Los macrófagos alveolares se originan a partir de células totipotenciales “stem cell”, son localizados en sitios estratégicos como el intersticio y los alvéolos donde maduran por influencia de factores locales tales como citocinas, proteínas surfactantes y epitelio bronquial para la defensa de pulmón ante microorganismos, materia particulada y toxinas (Labro 2000; Gordon and Read 2002; Ozato, Tsujimura et al. 2002; Becker, Soukup et al. 2003; Laskin 2009). La identificación de patógenos potenciales por parte del macrófago se logra a través de un sistema de receptores especializados en el reconocimiento de motivos conservados característicos de los agentes invasores (Aderem and Underhill 1999). Hay evidencia que indica diferencias en los mecanismos de internalización de las partículas según el receptor involucrado (Allen and Aderem 1996). Entre los principales receptores que participan en la fagocitosis de microorganismos se reconocen los de tipo Fc (FcR) que reconocen inmunoglobulinas y participan en la fagocitosis de antígenos opsonizados por efecto de una respuesta inmune adaptativa (reconocimiento específico), los receptores de complemento (CR) que también reconocen partículas opsonizadas, otros receptores no dependientes de opsonización tienen una

participación clave en la unión y reconocimiento de agentes extraños como los receptores para integrinas, receptores scavenger, receptores de manosa, la dectina-1, y el CD14, (Underhill and Ozinsky 2002; Areschoug and Gordon 2008). Algunos receptores participan directamente con señales de internalización, mientras que otros participan solo como moléculas de anclaje que permiten optimización del proceso de captura (Underhill and Ozinsky 2002) aún existen muchas proteínas cuya posible participación en el proceso de captura no se ha definido (Underhill and Ozinsky 2002; Underhill and Ozinsky 2002)

4. ICAM-1

La molécula de adhesión intercelular (ICAM-1;CD54) es una glicoproteína inducible que pertenece a la súper familia de las inmunoglobulinas, se expresa de manera constitutiva en la superficie celular de linfocitos, monocitos, macrófagos, células endoteliales y miocitos; se une a la integrina LFA-1(Dustin and Springer 1988; Hubbard and Rothlein 2000) y estabiliza las interacciones célula-célula como linfocito-T/ Macrófago e interviene el proceso de rodamiento, en el tráfico de células inflamatorias, en funciones efectoras de leucocitos y en la patogénesis microbiana (Hubbard and Rothlein 2000). Algunos patógenos como rinovirus, VSR, HiNT y plasmodium lo utilizan como receptor(Hubbard and Rothlein 2000; Behera, Matsuse et al. 2001; Avadhanula, Rodriguez et al. 2006). En células endoteliales y monocitos el LPS, Forbol 12-miristato 14-acetato (PMA), así como las citocinas proinflamatorias TNF- α , IFN γ e IL-1 β inducen un aumento significativo en su expresión, regulada por los factores de transcripción NF- κ B y CREB (Roebuck and Finnegan 1999), por otro lado TGF- β 1 disminuye la expresión de ICAM-1 en líneas

celulares de cáncer pancreático humano y en células gliales (Xiao, Zhang et al. 1996); se ha observado que fibroblastos tratados con TGF- β 1 aumentan la expresión del micro RNA de interferencia mir221 (Mendias, Gumucio et al. 2012) el cual suprime la traducción de ICAM-1(Hu, Gong et al. 2010). Además de su papel como molécula de adhesión a ICAM-1 se le han asignado funciones en procesos de señalización que derivan en la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-18 en experimentos de ligación cruzada que desencadenan la señalización mediada por la vía de las MAPKs (Hubbard and Rothlein 2000).

5. PERSISTENCIA DE VSR

El fenómeno de persistencia viral se refiere a la permanencia dentro del hospedero por periodos largos de tiempo del genoma viral, para que se establezca la persistencia es necesario que se cumplan dos condiciones, que la replicación del genoma viral no origine muerte celular y la evasión del sistema inmune del huésped. Las infecciones persistentes no originan efecto citopático o daño excesivo; sin embargo producen alteraciones en funciones celulares no vitales. Aunque la persistencia del VSR en humanos es controversial, se tienen evidencias que sugieren que la persistencia del virus es un factor etiológico de algunas patologías crónicas como EPOC y asma (Krivitskaia and Iakovleva 1992; Krivitskaia, Iakovleva et al. 1996; Wilkinson, Donaldson et al. 2006; Sikkel, Quint et al. 2008).

Algunas de las estrategias utilizadas por los virus durante el establecimiento de la persistencia consisten en la generación de virus incompletos o defectuosos, cambio en la expresión genética, infección de células propias de sitios inmunoprivilegiados o células del sistema inmune tales como macrófagos células dendríticas y linfocitos (Ng, Sullivan et al. ; Oldstone 1998; Oldstone 2009), ya que los macrófagos alveolares son susceptibles de infección por VSR resultan candidatos para la persistencia del VSR.

5.1 Evidencias de persistencia en humano

- a). La bronquitis crónica representa uno de los principales cuadros clínicos asociados a la infección previa con VSR y se asocia a persistencia (Krivitskaia, Iakovleva et al. 1996)

- b) Detección de VSR en pacientes con EPOC durante periodos estables de la enfermedad (Wilkinson, Donaldson et al. 2006)

- c). Presencia de antígenos de VSR en osteoclastos de pacientes con la enfermedad de Paget (enfermedad ósea crónica) (Mills, Singer et al. 1981; Mills, Singer et al. 1984; Mills and Singer 1987)

5.2 Evidencias de persistencia en bovino

Persistencia de linfocitos B con VSR bovino (VSRB) que comparte un alto grado de similitud con VSR (Valarcher, Bourhy et al. 2001)

5.3 Evidencias de persistencia en modelos experimentales animales

a). Persistencia del VSR en ratones infectados vía intranasal con VSR, a pesar de inmunidad mediada por células T citotóxicas (Schwarze, O'Donnell et al. 2004).

b). En el modelo de cobayo se encontró que tanto las proteínas como el RNA genómico del VSR persisten en células del pulmón hasta seis meses después de la infección (Hegele, Hayashi et al. 1994; Streckert, Philippou et al. 1996)

d). Persistencia local de células CD8⁺ en pulmón de ratones infectados con VSR que presentan hiperreactividad bronquial sugieren a la persistencia viral o del antígeno en tejido alveolar como probable responsable (Ostler, Hussell et al. 2001).

5.3 Evidencias de persistencia en líneas celulares

Se han establecido modelos de persistencia de VSR en distintas líneas celulares (Hep-2, HeLa, BS-C1, H358 y P388D1) (Baldrige and Senterfit 1976; Iankevich and Dreizin

1977; Fernie, Ford et al. 1981; Bangham and McMichael 1986; Sarmiento, Tirado et al. 2002; Valdovinos and Gomez 2003).

7. COINFECCIÓN ENTRE VIRUS RESPIRATORIOS Y BACTERIAS.

El efecto que tiene una infección viral sobre los mecanismos de las células infectadas puede predisponer a infecciones secundarias severas con bacterias comensales que frecuentemente no ocasionan mayor daño, como *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* (Hament, Kimpen et al. 1999).

La infección bacteriana es un fenómeno que se desarrolla en varias etapas: inicia con la adhesión a la célula hospedera seguida de la colonización de tejidos; en casos de bacterias intracelulares además de adherirse a la célula, la invaden, se multiplican, se diseminan intracelularmente y en algunos casos persisten (McCullers 2006). La interacción de la bacteria con la célula es un proceso en el que intervienen componentes de la superficie celular del hospedero que hacen posible la adhesión y colonización a distintos nichos del cuerpo humano. Para tal efecto las bacterias utilizan estructuras de adhesión caracterizadas como la fimbria, sistemas de secreción tipo III, glicoproteínas adhesivas como vitronectina, fibrinógeno y fibronectina, además de estructuras que mimetizan ligandos celulares (Pizarro-Cerda and Cossart 2006). Por su parte la célula cuenta con moléculas especializadas en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs): los más destacados son los receptores tipo Toll (TLR) de dominio de oligomerización nuclear (NOD) (Spann, Tran et al. 2004; Fritz and Girardin 2005). La respuesta de la célula a la infección depende de su estirpe, así como de los factores solubles del ambiente que la

rodea, entre los que se encuentran citocinas, defensinas y quimiocinas; así como reactivos intermediarios del oxígeno y el nitrógeno (ROIs, NOIs).(Fritz and Girardin 2005)

Distintos mecanismos favorecen las infecciones bacterianas secundarias; sin embargo, los conocimientos y estudios al respecto son limitados; la infección viral altera directa e indirectamente la actividad microbicida de la célula. Las resoluciones de la infección primaria viral y la secundaria bacteriana dependen de una respuesta adecuada contra el patógeno que puede resultar ineficiente durante la coinfección. La predisposición a la infección secundaria por bacterias es ocasionada en gran parte por el daño al epitelio, la disminución de la actividad ciliar, así como por alteraciones en la membrana y en el ambiente celular ocasionadas por la infección viral. Una vez sobrepasada la barrera epitelial, la infección bacteriana se ve favorecida (Hament, Kimpen et al. 1999; Beadling and Slifka 2004). El epitelio respiratorio normalmente retira de manera eficiente las bacterias con las que hace contacto a través del movimiento ciliar y la producción de mucinas (Hament, Kimpen et al. 1999) ; este mecanismo puede alterarse por infección viral, como es el caso del virus de influenza y del RSV (Walsh, Dietlein et al. 1961). La infección por estos virus en el modelo murino origina necrosis del epitelio bronquial y lesiones en alveolos (Walsh, Dietlein et al. 1961). En cambio la infección con adenovirus en el modelo de chinchilla reduce el ritmo ciliar del tubo de Eustaquio y favorece la superinfección con (HiNT); es interesante notar que la infección en orden inverso, es decir, infección de HiNT seguida de una superinfección por adenovirus tuvo un menor efecto en la disminución del ritmo ciliar (Suzuki and Bakaletz 1994). La alteración en el ritmo ciliar y en el epitelio no son los únicos cambios que puede originar la infección viral; tejidos que normalmente son restrictivos a la adhesión bacteriana se hacen permisivos, tal es el caso de la infección del virus de la influenza en el modelo de ratón que daña las células de tráquea y permite la

adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* (Ramphal, Small et al. 1980). La respuesta inmune contra patógenos incluye la producción de citocinas que dirigen la eliminación del agente infeccioso, así como el proceso de inflamación en el que intervienen defensinas que actúan directamente contra éste, actividad fagocítica, opsonización, activación de las vías del complemento y migración de distintas estirpes celulares al sitio de infección por efecto de las citosinas (Medzhitov and Janeway 1997; Janeway 2001). Los mecanismos efectores celulares contra la infección viral o bacteriana dependen tanto de la estirpe celular infectada como de la especie y variedad del virus y/o bacteria en cuestión. La respuesta celular durante coinfecciones puede resultar ineficiente debido al efecto de la infección viral sobre los mecanismos microbicidas, los cuales presentan respuestas diferenciadas dependientes del patrón molecular reconocido por los PAMPs, así como de los mecanismos de evasión propios del agente infeccioso (Netea, van der Graaf et al. 2004; Uematsu and Akira 2006). En este contexto una infección bacteriana secundaria puede ser favorecida por la infección viral. El establecimiento de la infección bacteriana depende de su capacidad de adhesión sobre la célula hospedera; en caso de bacterias intracelulares está en función de su internalización y multiplicación (Pizarro-Cerda and Cossart 2006).

En el caso específico del VSR hay reportes que indican que la infección por RSV incrementa la unión bacteriana a células epiteliales y a monocitos de *Haemophilus influenzae* (Hi) tipo b, HiNT (Patel, Faden et al. 1992; Takala, Meurman et al. 1993) *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bordetella* (El Ahmer, Raza et al. 1999) *pertussis* y *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxela catarrhalis*, (Patel, Faden et al. 1992; Raza, Blackwell et al. 2000) (Tabla1).

8. COINFECCIÓN VSR-*HiNT*

HiNT es una bacteria Gram-negativa considerada como causa mayor de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, es un comensal común del tracto respiratorio superior humano, sin embargo es uno de los agentes causales comunes de otitis media, sinusitis, neumonía, conjuntivitis y en EPOC, afectando tanto el sistema respiratorio alto como el bajo (Foxwell, Kyd et al. 1998; Rao, Krasan et al. 1999). EL VSR es un agente que predispone a coinfecciones con *Haemophilus influenzae* (Korppi, Leinonen et al. 1989). Tanto HiNT como VSR son frecuentemente aislados durante exacerbaciones agudas de EPOC (Seemungal and Wedzicha 2003; Wedzicha 2004). Se ha demostrado en modelos animales que la infección por VSR incrementa la colonización nasofaríngea de HiNT (Patel, Faden et al. 1992; Jiang, Nagata et al. 1999). En un estudio postmortem realizado en México de muestras de tejido pulmonar de niños que murieron por neumonía se reporta que infecciones mixtas entre VSR y neumonía bacteriana son comunes (Bustamante-Calvillo, Velazquez et al. 2001).

Asociaciones clínicas	Asociación <i>in vitro</i>	Tipo celular o localización	Asociación <i>ex vivo</i>	Modelo	Virus	Bacteria
		Epitelio respiratorio	Patel J et al. 1992 (Patel, Faden et al. 1992)	Murino	VSR	<i>Haemophilus influenza</i>
	Raza W. M. 2000 (Raza, Blackwell et al. 2000)	Monocitos (THP-1)			VSR	<i>Haemophilus influenza</i>
Korppi M et al. 1989 (Korppi, Leinonen et al. 1989)		Tracto respiratorio alto y bajo			VSR	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenza</i>
	Jiang Z. et al. 1998	A549			VSR	<i>Haemophilus influenza</i>
Bustamante-Calvillo ME et al. 2001 (Bustamante-Calvillo, Velazquez et al. 2001)		Tejido pulmonar humano			VSR	<i>Haemophilus influenza S. pneumoniae</i>
Kansenshogaku Zasshi 1989		Tracto respiratorio alto y bajo humano			VSR	<i>S. pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenza</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Branhamella catarrhalis</i>
Monobe H et al. 2003 (Monobe, Ishibashi et al. 2003)		Oído medio			VSR	<i>Haemophilus influenza</i> and <i>S. pneumoniae</i>
Hishiki H et al. 2010 (Hishiki, Ishiwada et al. 2011)		Tracto respiratorio alto y bajo Humano			VSR	<i>Haemophilus influenza</i> , <i>S. pneumoniae</i> y <i>M. catarrhalis</i>

Tabla 1. Asociaciones entre VSR y *Haemophilus influenzae*

9. EPOC, VSR y HiNT

El acrónimo EPOC engloba distintas patologías (la bronquitis crónica, enfisema pulmonar y asma) caracterizadas por un bloqueo persistente del flujo de aire cuyos síntomas incluyen disnea (falta de aire), expectoración anormal y tos crónica. A nivel mundial se estima que en el 2012 alrededor de 64 millones de personas sufren algún tipo de EPOC, Según la organización mundial de la salud (OMS) por esta causa fallecen anualmente 3 millones de personas y se estima que para el año 2030 será la cuarta causa mundial de mortalidad (Moghaddam, Ochoa et al.). Los factores de riesgo incluyen exposición activa o pasiva al humo del cigarro, contaminación e infecciones repetidas de las vías respiratorias inferiores en la infancia (Soler-Cataluna, Martinez-Garcia et al. 2005). Durante la historia natural de la enfermedad se distinguen periodos estables y periodos de exacerbación en los que el proceso inflamatorio de las vías respiratorias y los síntomas se agudizan y son causa de una elevada morbilidad y mortalidad (Mannino and Buist 2007).

La inflamación de las vías respiratorias se asocia a la presencia de células pro-inflamatorias, principalmente monocitos y macrófagos alveolares que además de obstruir las vías respiratorias producen mediadores inflamatorios (citocinas) que a su vez activan y atraen leucocitos al aparato respiratorio, lo que agudiza la enfermedad (Reid and Sallenave 2003; Iyer Parameswaran and Murphy 2009). Las exacerbaciones son frecuentes y se asocian con diversos factores principalmente genéticos, ambientales, alergias e infecciones virales y/o bacterianas (Raza, Blackwell et al. 2000; Murphy and Sethi 2002; Reid and Sallenave 2003; Seemungal and Wedzicha 2003; Wedzicha 2004). Las infecciones por VSR que ocasionan bronquiolitis o neumonía viral severas en los primeros años de vida, se

asocian con cuadros posteriores y recurrentes del EPOC, y se sugiere que la persistencia del VSR está involucrada con la patogenia crónica (Takala, Meurman et al. 1993; Reid and Sallenave 2003). Los mecanismos involucrados en la exacerbación de EPOC por la infección de VSR y HiNT se desconocen. Los estudios al respecto se enfocan en determinar las alteraciones inducidas por el VSR en la célula hospedera, que pudieran comprometer su actividad microbiciada (Raza, Blackwell et al. 2000). Se ha encontrado que VSR y HiNT aumentan la expresión de ICAM-1, la molécula de adhesión celular 1 relacionada a antígeno carcinoembrionario (CEACAM-1), y el receptor del factor activador de plaquetas (PAF-r) (Behera, Matsuse et al. 2001; Avadhanula, Rodriguez et al. 2006; Avadhanula, Rodriguez et al. 2006). La interacción inicial entre el patógeno y la membrana del macrófago dan inicio al proceso de la actividad microbiciada (adhesión, ingestión y sobrevivencia del patógeno invasor). Los macrófagos alveolares, son permisivos y blanco de la infección natural del VSR en el tracto respiratorio inferior (Panuska, Cirino et al. 1990). En el diagrama 1 se resumen los antecedentes (diagrama 1).

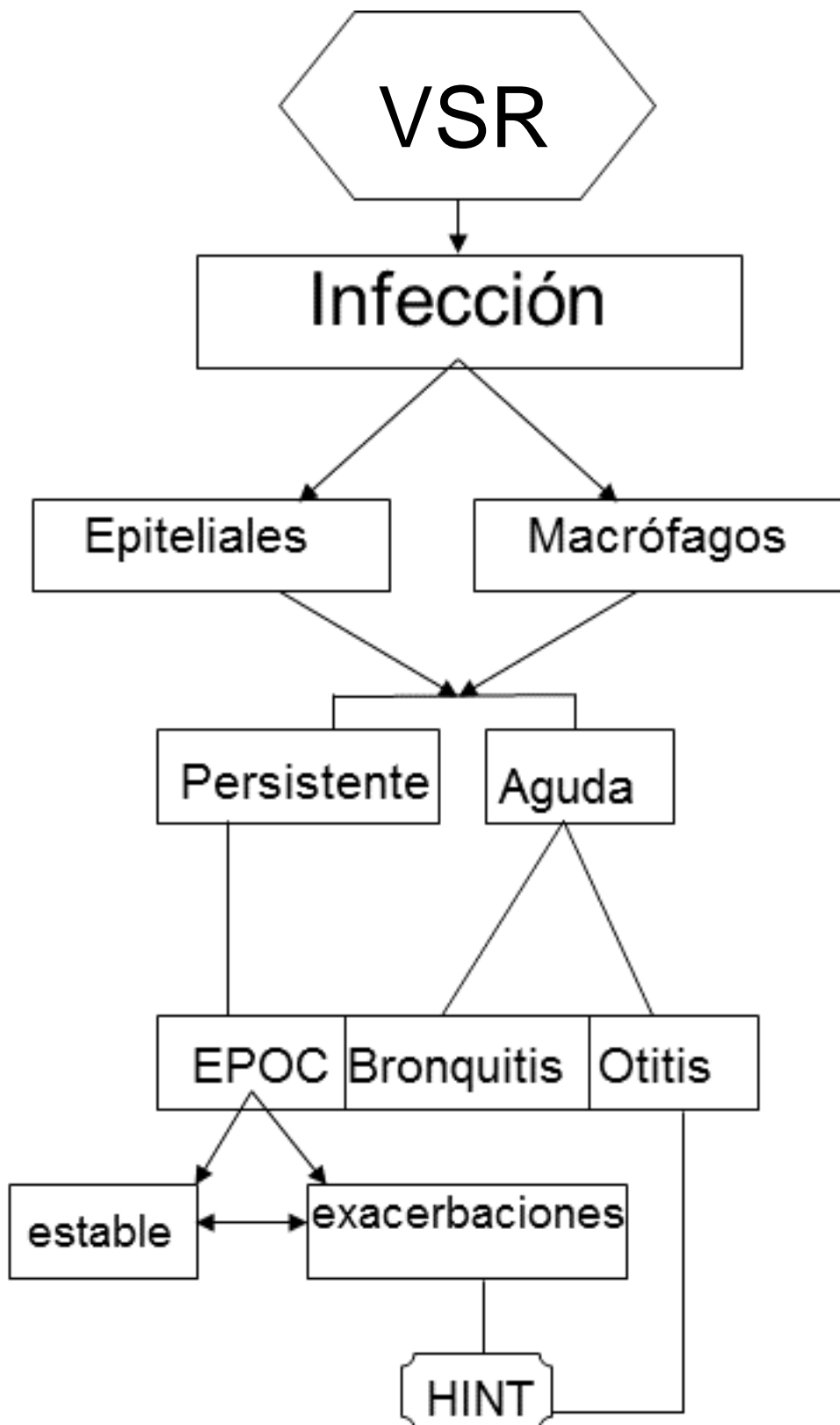


Diagrama 1. El VSR puede infectar células epiteliales y macrófagos de manera aguda y persistente, la infección aguda se asocia a bronquitis y otitis, mientras que la infección persistente se asocia a EPOC la cual comprende periodos estables y de exacerbación, los periodos de exacerbaciones asocian a infección por HiNT

PUNTUALIZACIÓN DE ANTECEDENTES

- Los macrófagos ($M\phi$) son permisivos y blanco de la infección natural del VSR en el tracto respiratorio inferior (Panuska, Cirino et al. 1990)
- La actividad bactericida contra HiNT en monocitos THP-1 infectados en forma aguda con VSR está alterada (Raza, Blackwell et al. 2000)
- Infecciones bacterianas (HiNT) secundarias se asocian con infecciones previas de VSR (Takala, Meurman et al. 1993)
- Hay evidencias de infección persistente de VSR en pacientes con EPOC (Wilkinson, Donaldson et al. 2006)

ANTECEDENTES DEL LABORATORIO

El efecto de la persistencia del VSR en macrófagos sobre la fagocitosis de HiNT no opsonizada se abordó de manera general en el laboratorio (Arrevillaga 2004). Los datos mostraron un efecto de disminución en de las capacidades fagocíticas del macrófago que incluyeron adhesión, ingestión ,sobrevida bacteriana, producción de Óxido Nítrico (NO) además se evaluó la viabilidad celular (Tabla 2); con base en estos resultados y considerando que el proceso de adhesión es el primer de la fagocitosis se decidió evaluar la

capacidad de adhesión con modificaciones al abordaje experimental inicial que permitieran dar un seguimiento continuo del proceso de captura de HiNT.

Actividad Biológica	Parámetro	Macrófagos Normales	Macrófagos Persistentes		
		(MφN)	(MφP)		
Adhesión 30 segundos MφN coinfectados con bacteria (HiNT)	Porcentaje de macrófagos Mφ positivas a bacterias (%A)	63.43	25.64		
	Media fluorescencia (MFI)	12.99	9.75		
	Índice de adhesión (%A x MFI)	824	250		
Ingestión 90 minutos MφP coinfectados con bacteria (HiNT)	Porcentaje de Mφ positivas a bacterias (%A)	31.86	12.07		
	Media fluorescencia (MFI)	4.63	2.75		
	Índice de ingestión (%A x MFI)	154	33.2		
Capacidad Bactericida Mφ coinfectados con bacteria (HiNT)	U.F.C/1X10 ⁵ Mφ	4.75	16.6		
Producción de Nitritos	μM NO ₂ /Mφ	1.319 x10⁻⁴ MφN	1.407 x10⁻⁴ MφP	1.609x10⁻⁴ MφN coinfectados con bacteria (HiNT)	5.33 x10⁻⁴ MφP coinfectados con bacteria (HiNT)
Viabilidad del Mφ	Número de Mφ viables	2.5x10⁵ MφN	2.5x10⁵ MφP	1.5x10⁵ MφN coinfectados con bacteria (HiNT)	4.0x10⁵ MφP coinfectados con bacteria (HiNT)

Tabla 2: Resumen de antecedentes directos y resultados preliminares (Arrevillaga G. 2004)

Propuesta

A partir de los antecedentes mencionados se planteó la posibilidad de que los macrófagos infectados persistentemente ($M\phi P$) por VSR modifican su capacidad de captura sobre HiNT.

Planteamiento del problema

Las coinfecciones entre HiNT y VSR son frecuentes y representan un riesgo de exacerbación de cuadros respiratorios adicionales a la infección primaria; el efecto de la coinfección entre HiNT y VSR se ha estudiado en modelos experimentales *in vitro* en *in vivo* con infección aguda de VSR; sin embargo la evidencia de la persistencia viral en enfermedades respiratorias crónicas como EPOC, hacen necesario el estudio del fenómeno de coinfección en condiciones de persistencia del VSR.

Postulado

“Algún ligando de HiNT en $M\phi P$, se encuentra interferido”

Hipótesis

La infección persistente de VSR en macrófagos, interfiere con receptores de adhesión de
HiNT

Objetivos

1. Determinar el o los mecanismos que afectan la captura de HiNT por macrófagos infectados persistentemente por VSR.
2. Determinar si el factor (es) que interviene en la alteración del proceso de captura se encuentra (n) en el sobrenadante de los M ϕ P y actúa sobre HiNT.
3. Determinar si la persistencia viral modifica la expresión de receptores de HiNT.
4. Determinar si ICAM-1 y PAF-r participan en el proceso de captura de HiNT a M ϕ .

Material y Métodos

Virus y líneas celulares

M ϕ N

P388D1 (ATCC TIB 63). Obtenida por Dwe y Potter, derivada de un neoplasma linfoide (P388) inducido en ratón DBA/2 (H-2^d) con metilcolantreno (Bauer, Holmes et al. 1986). Presenta características morfológicas y funcionales similares a las del macrófago. Esta línea se obtuvo de la ATCC donada a nuestro laboratorio por el Dr. A. Tingle (*Universidad de Columbia Británica Vancouver Canadá*) y utilizada para establecer el cultivo persistente M ϕ P.

M ϕ P.

Línea de macrófagos persistentemente infectados con VSR cepa Long. El cultivo se estableció y caracterizó en el laboratorio de Virología (Sarmiento R. et al. 2002). El cultivo se obtuvo por infección de M ϕ N a m.o.i.= 0.1 con VSR, las células que sobrevivieron se propagaron en medio RPMI/10% SFB y las células de este cultivo se mantuvieron a través de su propagación dos veces por semana. La presencia del virus se ha monitoreado en forma rutinaria por medio de la detección de proteínas virales en la célula con inmunofluorescencia indirecta, amplificación del gen que codifica para la proteína N del virus a través de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y por determinación de antígeno viral a través de citometría de flujo.

Cuantificación y viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó por exclusión de azul tripano. La exclusión del colorante es característico de las células cuya membrana se conserva intacta, ya que el colorante penetra en las células con daño en membrana tornándose azules a estas células

se les considera no viables (Payment P. & Trudel M., **1993**). Para efectuar el conteo se adquirieron 20 μ l de la suspensión celular y se le agregaron 20 μ l del colorante azul tripano la mezcla se montó en la cámara de Neubauer y se contaron los cuadrantes centrales de la cámara.

$$\text{Células/ml} = (\text{número de células viables} / 2 \text{ cuadrantes}) * (20,000)$$

Bacteria

La cepa 2019 de HiNT provista por el Dr. Michael Apicella (University of Iowa, College of Medicine, Department of Microbiology), es un aislado clínico obtenido de un paciente con EPOC [25]. Se propagó en agar chocolate con polienriquecimiento (AHP) a 37° C en atmósfera de CO₂ 5% [25]. Los ensayos se realizaron con HiNT fijada con 1% de paraformaldehído en PBS.

Bacteria Fijada

Se obtuvo un cultivo con 24 hrs. de crecimiento de bacteria HiNT la bacteria se recuperó con lavados de PBS, suspensión se centrifugó y lavó con PBS y se fijó con 200 ml de PBS/paraformaldehído1% por 30 minutos en baño de agua a 37° C y se lavó 3X con PBS

Marcaje de HiNT

Las bacterias fijadas se resuspendieron en PBS y se marcaron con bromuro de etidio (BrEt) o isocianato de fluoresceína (FITC; por sus siglas en inglés) (ambas de sigma): $\sim 1 \times 10^9$ se incubaron en una solución (50 μ g BrEt ml⁻¹ PBS) en baño maría (37 °C;

20 min); el reactivo FITC se utilizó a una concentración final de $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ PBS e incubados (a temperatura ambiente; 20 min) (Ahren, Williams et al. 2001) HiNT marcada (HiNT-BrEt or HiNT-FITC) se lavó tres veces con PBS por centrifugación ($2,100 \times g$; 3 min) el número de bacterias total se cuantificó por microscopía de forma directa. La densidad bacteriana se ajustó a $\sim 4 \times 10^8$ células ml^{-1} PBS y se distribuyó en alícuotas (8×10^7 HiNT en $200 \mu\text{l}$) que fueron almacenadas a -20°C (Ahren, Eriksson et al. 2003).

Citometría de flujo

Se adquirieron datos de 10,000 células a partir de las muestras resuspendidas en un tubo para citometría con $150 \mu\text{l}$ de PBS con 5×10^5 M ϕ . La citometría de flujo se realizó a través del citómetro FACS; Vantage SE (Becton Dickinson) y los datos se analizaron con el software WinMDI versión 2.8 (Scripps Research Institute, La Jolla, CA).

Cinética de captura, adhesión e ingestión de HiNT.

Se dispuso de M ϕ N y M ϕ P (3×10^6 M ϕ ml^{-1} PBS) en tubos de plástico separados, las muestras se incubaron (4°C ; 20 min) y se les adicionó HiNT-EtBr (~ 15 bacterias por M ϕ)(Rampini, Selchow et al. 2008). La mezcla resultante M ϕ - HiNT-BrEt se distribuyó a una concentración de 3×10^5 M ϕ ml^{-1} PBS en tubos individuales. Para los estudios de

captura (incluye las bacterias adheridas e ingeridas por el M ϕ) y los estudios de ingestión, con excepción de la muestra control (t = 0) que se mantuvo a 4°C, todas las muestras se incubaron a 37°C, de cada muestra se tomaron alícuotas que se removieron a distintos tiempos (10, 15, 20, 30, 60, and 90 min) y se mantuvieron a 4 °. Cada mezcla de M ϕ -HiNT-BrEt se lavó con PBS, centrifugó y fijó con paraformaldheido al 4% en PBS (a temperatura ambiente; 15 min). Las muestras fijadas se lavaron 2x en PBS por centrifugación cada pellet resultante se suspendió en 500 μ l de PBS, almacenado en oscuridad a 4°C y analizados dentro de las siguientes 24 hrs por citometría de flujo. El índice de captura se calculó multiplicando el porcentaje de M ϕ positivos para BrEt por la media de intensidad de fluorescencia (MIF) (Raza, Blackwell et al. 2000).

La bacteria ingerida por los M ϕ se determinó por el “apagado” de la emisión extracelular de la fluorescencia emitida por HiNT-BrEt, añadiendo 10 μ l de solución crystal violeta (0.05 (w/v) % in PBS) por cada muestra de 500 μ l.

La citometría de flujo se realizó conforme a lo reportado por Raza (Raza, Blackwell et al. 2000) utilizando una longitud de onda de emisión de 595 nm, en este rango la fluorescencia de las bacterias marcadas con BrEt adheridas a la superficie celular del M ϕ se elimina, a este fenómeno se le denomina “apagado” de fluorescencia (Raza, Blackwell et al. 2000). Se obtuvo un índice de ingestión en el que se valoró tanto el porcentaje de células con bacteria como la cantidad de bacterias de ingestión se calculó multiplicando el

porcentaje de M ϕ positivos para BrEt por la media de intensidad de fluorescencia (MIF) después de añadir la solución de cristal violeta.

Los ensayos de la cinética de adhesión se llevaron a cabo a 15°C, con el fin de evitar la fagocitosis obteniendo muestras a los tiempos 0, 30, y 90 minutos de incubación, a esta temperatura, el proceso de ingestión se inhibe (Chow, Downey et al. 2004).

Inhibición de receptores beta glucano de M ϕ

Se dispuso de M ϕ N y M ϕ P (5×10^5 M ϕ ml⁻¹ RPMI) en cajas de seis pozos y se trataron con con 1.6 μ g/ml de laminarina durante 30 minutos (37°C en atmosfera CO₂ al 5%), posteriormente las muestras se mantuvieron a 4 °C durante 20 min y se les adicionó HiNT-FITC (15 bacterias por célula), las cajas se centrifugaron a 1200 g a 4°C durante cinco minutos para optimizar la interacción HiNT-M ϕ , las células se mantuvieron a 4 grados 10 minutos adicionales y posteriormente se llevaron a temperatura ambiente 5 minutos, las células se incubaron por 90 minutos a 37°C en atmosfera CO₂ al 5%, las células se lavaron tres veces con PBS y se analizaron por citometría de flujo.

Microscopía confocal

Se dispuso de M ϕ N y M ϕ P (5×10^4 M ϕ ml⁻¹ RPMI) en porta objetos de 8 pozos para microscopia (NUNC) las muestras se mantuvieron a 4 °C durante 20 min y se les adicionó HiNT-FITC (15 bacterias por célula), las cajas se centrifugaron a 1200 g a 4°C durante cinco minutos para optimizar la interacción HiNT-M ϕ , las células se mantuvieron a 4 °C 10 minutos adicionales y posteriormente se llevaron a temperatura ambiente 5 minutos, las células se incubaron por 90 minutos a 37°C en atmosfera CO₂ al 5%, se lavaron tres veces con PBS, se fijaron con paraformaldehido al 2% y se lavaron con PBS, finalmente las muestras se cubrieron con medio de montaje para fluorescencia vectashield/DAPI (Vector Labs) y las muestras se analizaron por microscopía confocal (Olympus FV1000).

Efecto del medio condicionado de M ϕ sobre la captura de HiNT

Se incubaron 3×10^7 HiNT-FITC con 1 ml del sobrenadante de 1×10^6 M ϕ N o M ϕ P a 37 durante 24 h (medio condicionado) por 3 hrs a 37; las bacterias se lavaron tres veces con PBS por centrifugación. Cada preparación de bacterias se agregó a muestras individuales de M ϕ N a un multiplicidad de ~15 bacterias por M ϕ ; las mezclas se mantuvieron a 4° C durante 20 min posteriormente se trasladaron a temperatura ambiente durante 5 minutos posteriormente se incubaron a 37°C durante 90 min en atmósfera de

CO₂ 5%. Se determinó el índice de captura de HiNT-FITC por los macrófagos con el método descrito previamente.

Extracción de RNA y transcripción reversa

Se extrajo el RNA total (1µg) de MφN o MφP utilizando el kit de extracción RNeasy mini kit (Qiagen Science) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Brevemente: 1 x 10⁷ células se trataron con 2 ml de buffer de lisis RLT y se homogenizo en vortex 30 segundos, posteriormente se agregaron 4 ml de etanol al 70%, la mezcla se dispuso en la columna mini spin RNeasy la cual se centrifugo durante un minuto a 8000 g, a la columna se le agregaron 5 ml de solución de lavado y se centrifugó (1min; 8000g) repitiéndose la operación 3X finalmente la columna se transfirió a un tubo colector se eluyó con 150 µl de agua libre de RNasas. La transcripción reversa se realizó utilizando el kit Omniscript RT Kit (Qiagen Science), se utilizó buffer RT 1X, mezcla de 5 mM dNTP, inhibidor de RNasa (10 unidades/ µl⁻¹) y transcriptasa reversa (4 unidades); el volumen total de la reacción fue de 20 µl; para la síntesis de RNA se utilizaron reactivos Clontech (Clontech USA) y se siguieron las especificaciones técnicas del fabricante.

Establecimiento de las condiciones óptimas de RT-PCR

En una primera amplificación se obtuvo el fragmento de RNAm de ICAM-1 esperado de 421pb con los primers 5'-CCTCGACCCATGTGATCTTT-3' sentido y 5'-CTGGCTGTACAGAACAGGA-3' antisentido, con una temperatura de alineamiento de 60°C durante 35 ciclos. Sin embargo, se decidió evaluar diferentes números de ciclos para evitar un error de interpretación debido a una posible saturación. Para las reacciones de PCR se utilizó el kit de Platinum® Taq (Invitrogen, 1X buffer de PCR, 0.2 mM mezcla de dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 0.2µM de cada oligo y 1 unidad de Taq). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C durante 3 minutos; seguidos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos durante n número de ciclos; y 72°C durante 5 minutos. Los ciclos evaluados fueron 24, 27, 30, 33 y 36. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio (supl. 5).

En los Mφ normales se observa amplificación al utilizar 27 ciclos, sin embargo, en los persistentes la señal es muy baja. A 36 ciclos no se observan diferencias entre los macrófagos, posiblemente debido a una saturación por exceso de ciclos. Partiendo de estos resultados se decidió utilizar 30 ciclos durante las amplificaciones siguientes.

RT-PCR punto final

De acuerdo a las condiciones establecidas previamente se realizaron las amplificaciones a partir de las muestras de los macrófagos, cada muestra se evaluó en tres replicas independientes. Además, como control de carga se amplificó un fragmento de ≈ 150 pb del gen de GAPDH utilizando los primers 5'-CATTGTGGAAGGGCTCATGA-3'; sentido y 3'-GGAAGGCCATGCCAGTGAGC-5' antisentido cuyas condiciones de amplificación (55°C, 28 ciclos) fueron establecidas previamente en el laboratorio. La densitometría de los productos de PCR visualizados en un gel de agarosa al 1.2%, se realizó utilizando el software Quantity One (BioRad).

RT-PCR tiempo real

Se utilizaron oligos para la RT-PCR tiempo real reportados previamente (33). Se obtuvo un segmento mRNA de ICAM-1 (326- pb); utilizando oligos sentido, 5'-TGCGTTTTGGAGCTAGCGGACCA-3' y antisentido 3'-CGAGGACCATACAGCACGTGCCA-5'. Como control de normalización se determinó el mRNA de β -actina utilizando los oligos sentido 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3' y anti-sentido, 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3' con los que se obtuvo un segmento de 189 pb las muestras se corrieron durante 40 ciclos (30 s a 95 °C; 30 s a 62 °C; and 30 s a 72 °C) en el sistema Step one Real Time PCR (Applied Biosystems). El RT-PCR tiempo real para la

expresión de los transcritos se realizó utilizando Fast SYBR Green Master Mix (Invitrogen). La mezcla maestra de PCR se preparó combinando oligos para ICAM-1 o β -actin (0.5 or 1 μ l, respectivamente), cDNA (0.5 μ l), y SYBR Green Master Mix (3 μ l) en un volumen final de 10 μ l. La mezcla de PCR se dispuso en placas de PCR de 48 pozos: 40 ciclos (20 s a 95 °C, 30 s a 95 °C, 30 s a 62 °C). Se realizaron triplicados por cada muestra. Los valores de la expresión genética se normalizaron con los transcritos de β -actina.

Determinación de niveles de ICAM-1 y PAF-r por inmunodetección tipo western blot

Extracción proteína total

La extracción se realizó utilizando 7×10^6 células obtenidas de cajas de 10 cm. Una vez retirado el medio, las células fueron lavadas con PBS, despegadas, transferidas a tubos de 15 ml (5 ml) y centrifugadas 10 min a 1500 rpm. . Para favorecer la extracción, se sonicó dando 5 pulsos a baja intensidad (1.5) y luego se incubó durante 30 minutos en hielo, agitando por vortex (30 segundos) cada 5 minutos. Posteriormente, las pastillas se resuspendieron en 320 μ l de buffer de extracción, previamente adicionado con 0.5 μ g/ml de inhibidores de proteasas (Roche), el volumen final fue transferido a tubos de microcentrífuga. El buffer de extracción forma parte del kit de aislamiento y purificación de proteínas de superficie (Pinpoint Cell Surface Isolation kit) de Pierce. Finalmente se

centrifugó a 12 000 rpm durante 5 minutos y se colectó la fracción proteica del sobrenadante.

Cuantificación de proteína

La determinación de proteína total se realizó de acuerdo al método de Bradford (Bradford 1976), utilizando el reactivo comercial de BioRad, el método consiste en medir la absorbancia a 595 nm que se presenta por la unión del azul de Coomassie a las proteínas, en un espectrofotómetro (Beckman Coulter). Se realizaron curvas de calibración con estándares de albúmina de suero bovino. Tanto las muestras como los estándares se prepararon por triplicado.

SDS-electroforesis

La separación de las proteínas se realizó en condiciones desnaturizantes empleando geles de acrilamida al 10%, de acuerdo al método reportado por Laemmli (Laemmli 1970). Para la separación se utilizó el sistema Mini Protean III (BioRad). Después de la desnaturización por calor (5 minutos a 95°C) se cargaron 30µg de proteína total de muestra por pozo. El estándar preteñido utilizado fue de Invitrogen con un rango de peso molecular de 10 a 220 kDa. Una vez separadas las proteínas fueron electrotransferidas a

membranas de PVDF Hybond (Amersham) utilizando un módulo de transferencia semihúmeda Trans blot SD (BioRad) y un voltaje de 10V durante 35 minutos. La membrana se bloqueó por 2h a temperatura ambiente con TBS/Tween-20 0.05%/leche descremada 8%. Para la detección de ICAM-1 se incubó la membrana con un anticuerpo policlonal específico (Santa Cruz) a una dilución 1:200 en TBS /Tween-20 0.05%/leche descremada 2.5% con agitación suave durante toda la noche para la detección de PAF-r se utilizó anti PAF-R polyclonal M-16 y el procedimiento anterior. La detección del antígeno-anticuerpo unido se realizó incubando con un segundo anticuerpo conjugado de anti IgG de cabra-HRP (Zymed) a una dilución de 1:200 durante 2 hr temperatura ambiente. Para revelar se utilizó como sustrato diaminobencidina (DAB) (sigma) preparado al 10% en PBS. La figura corresponde a los carriles cargados con 30 µg de proteína. Las proteínas también se detectaron por el método de quimioluminiscencia a partir del sustrato SuperSignal West Dura Extended Duration substrate (Pierce Thermo scientific); se utilizó una dilución 1:2500 % del anticuerpo secundario en TBS /Tween-20 0.05%/leche descremada 2.5y se normalizó con GAPDH. El análisis densitométrico se realizó con el paquete informático Quantity one v. 4.3.1.

Expresión de ICAM-1 en superficie celular de Mφ

La presencia de ICAM-1 en la superficie de MφN y MφP se detectó utilizando anti ICAM-1. MφN o MφP (5×10^5 in 1 ml PBS) se lavaron y bloquearon incubando (37 °C; 2h) con 1 ml de RPMI con 50% de suero fetal bovino (SFB) se lavó y sincronizó (ver sección de cinética). Se trataron MφN o MφP con 100 µl de (mAb) anti-CD54 (ICAM-1) 3E2

conjugado con PE o mAb isotipo IgG1 de hamster conjugado con PE como control (BD Biosciences Pharmingen) diluidos 1:200 in PBS. Cada mezcla se incubó en medio (4 °C; 2 h). Después de lavar en PBS, los M ϕ se fijaron con 4% de paraformaldheido en PBS (temperatura ambiente; 15 min) y lavados dos veces con PBS; cada pellet se resuspendió en 500 ml de PBS y almacenó (4 °C) en oscuridad; las muestras se analizaron dentro de las siguientes 24 hrs por citometría de flujo.

Bloqueo de ICAM-1 de membrana en M ϕ

Después de lavar dos veces M ϕ N o M ϕ P (5×10^5) con PBS, se suspendieron en 1 ml de RPMI conteniendo 50% de SFB; los M ϕ se sincronizaron (ver sección de cinética). Para bloquear la adherencia de HiNT a la membrana del M ϕ por efecto de ICAM-1 las células se trataron con 100 μ l de mAb 3E2 anti-CD54 (ICAM-1), diluido 1:10 en medio y se incubó a 4 °C por 12 hrs, después de lavar dos veces se agregó HiNT-FITC a los M ϕ N o M ϕ P (50 bacterias/M ϕ). Con el fin de evitar la fagocitosis de complejos antígeno anticuerpo, la incubación se mantuvo a 4 °C toda la noche, los M ϕ se lavaron 2 veces, se fijaron y analizaron por citometría de flujo.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los ensayos entre M ϕ P and M ϕ N se realizó con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (Conover 1999). Los valores obtenidos en los ensayos se agruparon y los grupos se compararon. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron con significancia estadística

Resultados

La persistencia del VSR reduce la captura de HiNT

Los datos de los experimentos de captura e ingestión de HiNT por los macrófagos, obtenidos por citometría de flujo utilizando muestras tratadas con cristal violeta “apagadas” (el cristal violeta apaga la fluorescencia emitida por la bacteria extracelular) y sin tratar con cristal violeta “no apagadas”, evidenciaron que los M ϕ N capturan e ingieren un porcentaje mayor de HiNT con respecto a los M ϕ P: ~52%, ~85%, respectivamente (Fig. 1a y b). Nuestros resultados son consistentes con los reportados para la línea celular monocítica humana THP-1, en la que se determinó que la infección aguda por RSV produce una reducción tanto en la adhesión como en la ingestión de HiNT en comparación con las células no infectadas (30). En el mismo experimento se observó una disminución en el porcentaje de células infectadas por el virus en el cultivo M ϕ P con respecto al mismo tratado cultivo con cristal violeta.

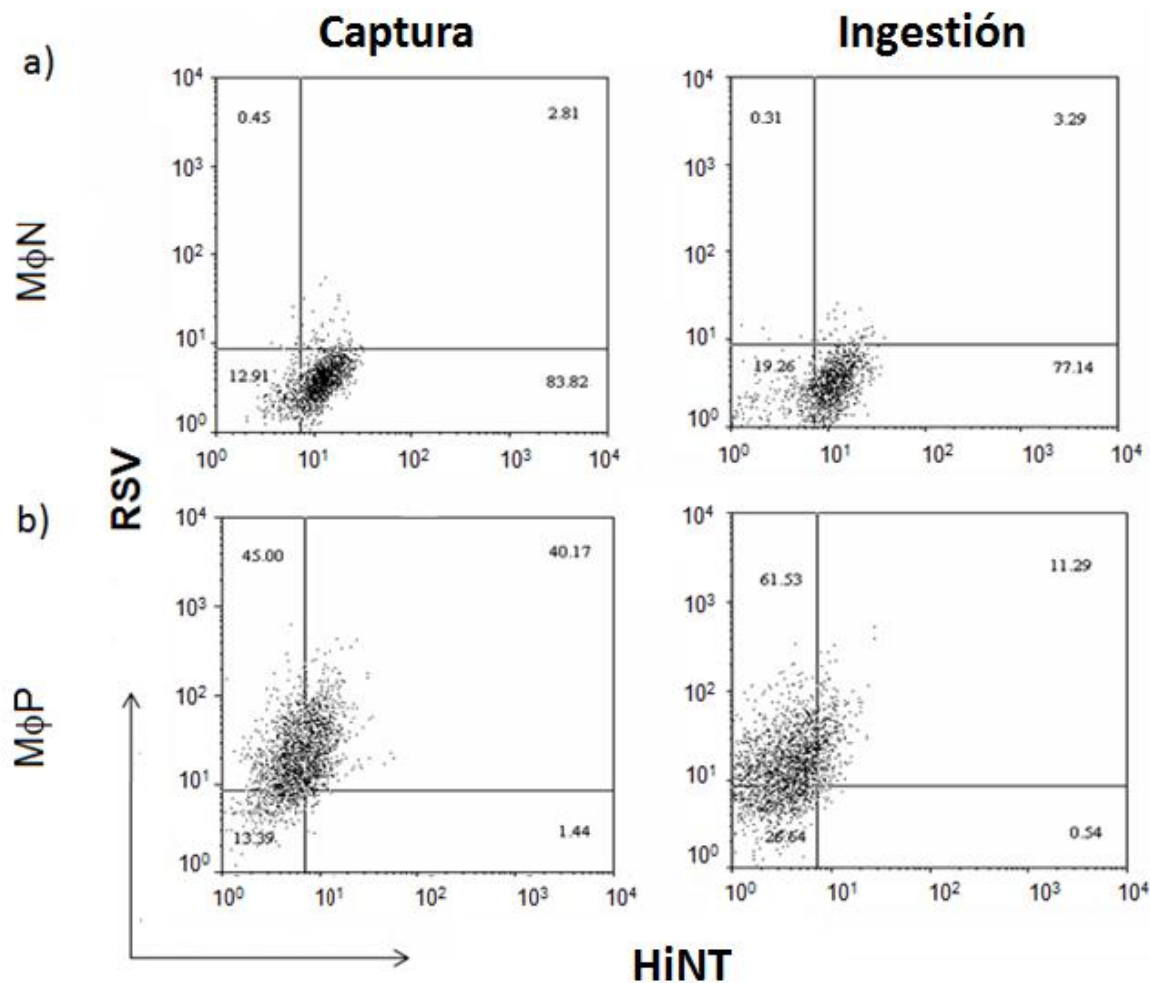


Fig.1 Citometría de captura e ingestión de HiNT, marcada con BrEt, por macrófagos sin infectar (MφN) o macrófagos infectados en forma persistente (MφP).

Después de incubar (37 °C; 90 min), los Mφ-HiNT se analizaron por citometría de flujo. La bacteria ingerida (paneles a la derecha) se diferenciaron de las bacterias capturadas (que incluyen tanto las adheridas como las ingeridas; paneles de la izquierda) por el uso de cristal violeta para apagar la fluorescencia de la bacteria marcada adherida a los a) MφN o b) MφP. Los datos son representativos de un mínimo de tres experimentos independientes.

El medio condicionado de los M ϕ P no altera la captura de HiNT

Con el fin de determinar si factores solubles presentes en el sobrenadante de los M ϕ (medio condicionado) eran capaces de interferir directamente en la adhesión de HiNT a los M ϕ N, HiNT se incubó con el medio condicionado de M ϕ N o M ϕ P durante tres horas, las bacterias se recuperaron por centrifugación, se les agregó medio fresco se incubaron con M ϕ N y se realizaron ensayos de captura; no se encontraron diferencias en la captura de HiNT por los macrófagos M ϕ N previo tratamiento de HiNT con medio condicionado de M ϕ N o M ϕ P como lo muestra la figura 2.

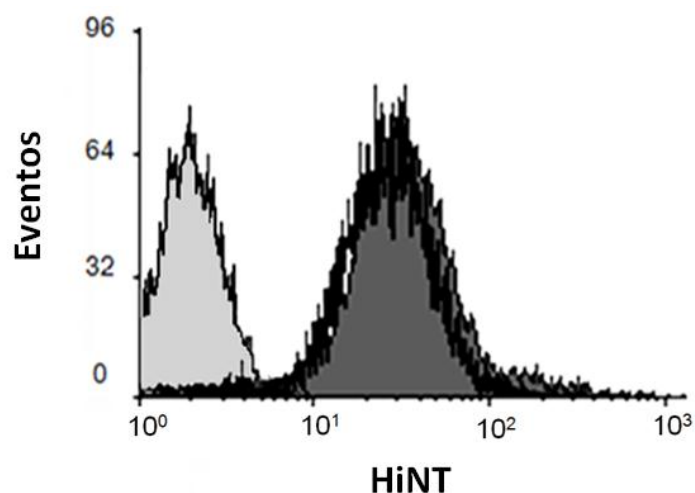


Fig.2. Efecto de factores solubles del medio condicionado de M ϕ N o M ϕ P en la captura de HiNT. Ensayos de captura de HiNT marcados con FITC por citometría de flujo en M ϕ N incubados previamente con medio condicionado (37 °C; 24 h) de M ϕ N (histograma vacío), M ϕ P (histograma relleno), o M ϕ control (histograma gris) durante (37 °C; 3 h). Los datos son representativos de por lo menos tres experimentos independientes.

Cinética de captura, adhesión e ingestión de HiNT.

Se dio seguimiento a los procesos de captura, adhesión e ingestión de la bacteria por los Mφ considerando los siguientes tiempos: 10, 20, 30, 60 y 90 minutos, se observó un incremento continuo y progresivo en las cinéticas correspondientes a los tres procesos, tanto en MφN como en MφP (Fig. 3). La relación de los índices de adhesión e ingestión en los puntos finales de la cinética (MφN/MφP) disminuyeron 3.2-veces (captura); 1.7- veces (adhesión) y 11.2- veces (ingestión) (Fig. 3a, b, and c, respectivamente).

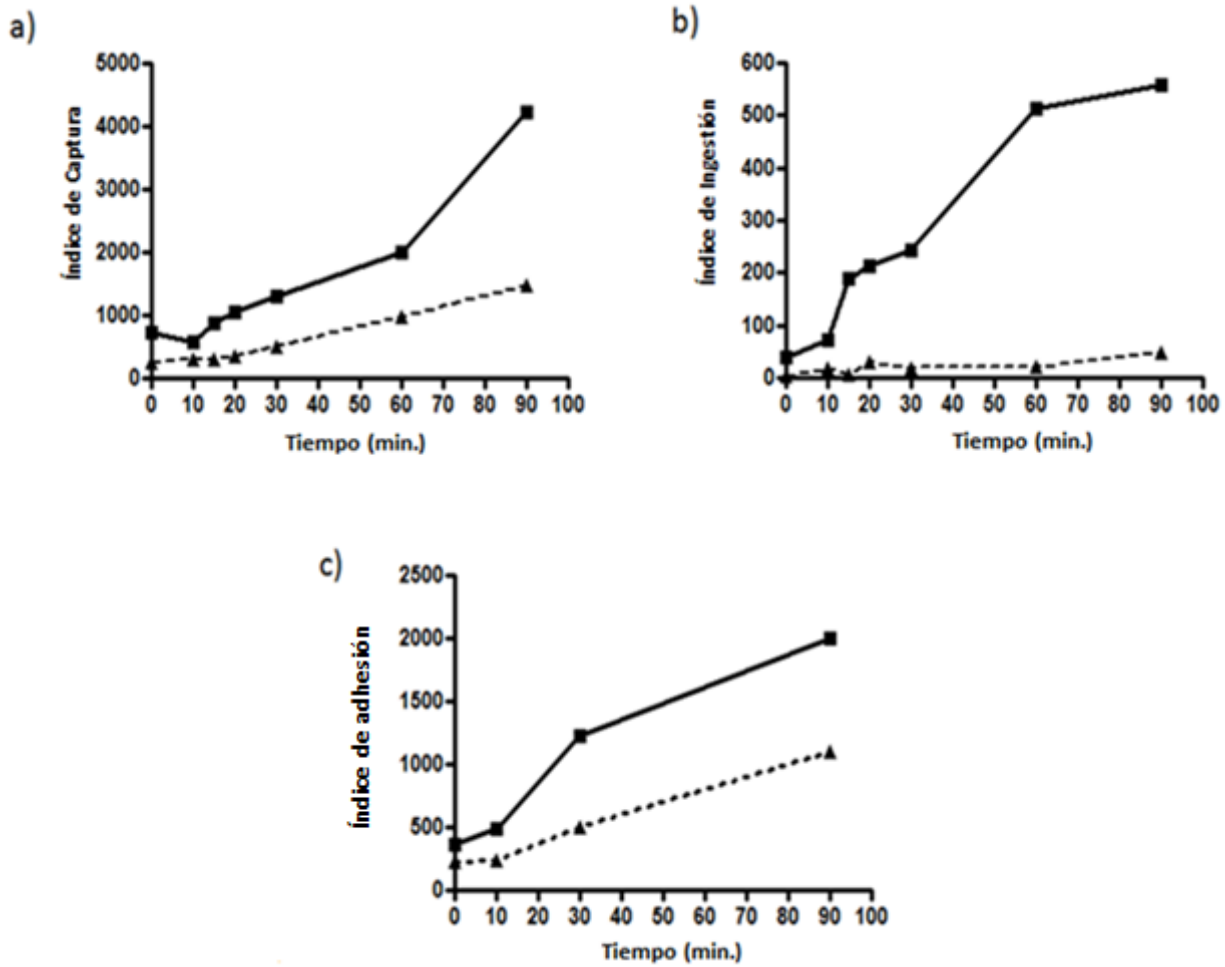


Fig.3 cinética de captura, adhesión e ingestión de HiNT por MφN o MφP

Captura e ingestión de HiNT por MφN y MφP se determinaron a 37 °C; adhesión de HiNT por MφN y MφP a 15 °C. Las determinaciones se hicieron con HiNT-EtBr como en la figura 1. Los índices (valores arbitrarios) como de describe en la metodología. a) captura a 37 °C; b) ingestión a 37 °C; c). adhesión at 15 °C. MφN (■—■) y MφP (▲--▲). Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

La laminarina disminuye la capacidad para capturar HiNT de los Mφ

con el fin de confirmar la disminución de la capacidad de adhesión de los MφP se bloqueó la internalización de HiNT a macrófagos mediada por dectina-1. Se ha documentado que el receptor de beta glucano dectina-1 participa en la internalización de HiNT a monocitos humanos (Ahren, Williams et al. 2001), por lo que se evaluó el efecto del bloqueo de estos receptores utilizando al polisacárido (1→3)-β-D-glucano (laminarina), los datos obtenidos son consistentes con los reportados para monocitos y células epiteliales de origen humano ya que la laminarina tuvo un efecto de disminución de la capacidad de captura de los MφN (MFI; 108) y MφP (MFI; 75) (figura 4a, b); adicionalmente se encontró que al comparar la capacidad de captura entre MφN y MφP previamente tratados con laminarina, los MφN (MFI;43) mantuvieron una capacidad de captura comparativamente mayor (48.4%) a la de los MφP (MFI; 22) (figura 4a, b).

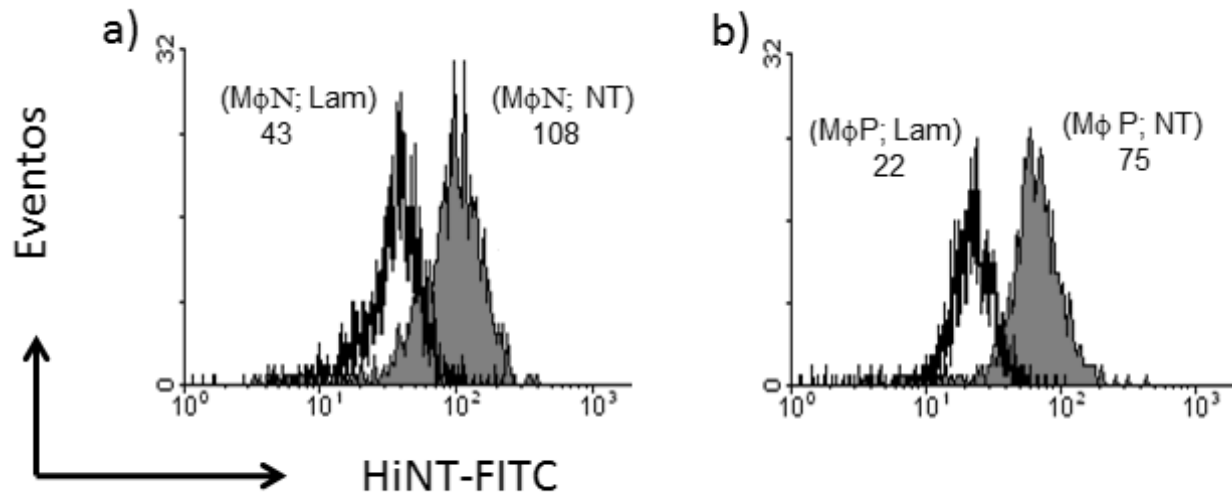


Figura 4. Capacidad de captura en condiciones de inhibición de la fagocitosis de HiNT por bloqueo de dectina-1. MφN y MφP se incubaron con HiNT-FITC (UFC 15/cell) a 37°C por 90 min, se utilizó laminarina (16mg/ml) para evitar la fagocitosis de HiNT. Las muestras se analizaron por citometría de flujo. a) Histograma de MφN tratados con laminarina (MφN Lam) y su control MφN no tratados (MφN NT). b) (MφP NT) y (MφP Lam) y su control no tratados (MφP NT).

La persistencia del VSR regula negativamente la síntesis del ARNm de ICAM-1

La reducción en la adhesión de HiNT a MφP podría estar asociada a una baja expresión de los ligandos que unen a la bacteria en los MφP. La molécula de adhesión intercelular ICAM-1 es un buen candidato como un ligando debido a que se reconoce su

participación en la adhesión de HiNT a células epiteliales del tracto respiratorio; en dichas células, el virus regula la expresión ICAM-1 (22). Por lo que para sustentar la hipótesis de que la persistencia del VSR puede regular negativamente la expresión de ICAM-1 en MφP se determinó la expresión del ARNm de ICAM-1 a través de RT-PCR punto final y tiempo real, resultando un decremento del RNA mensajero de ICAM-1 de los MφP con respecto a los MφN. (Fig. 4a and b).

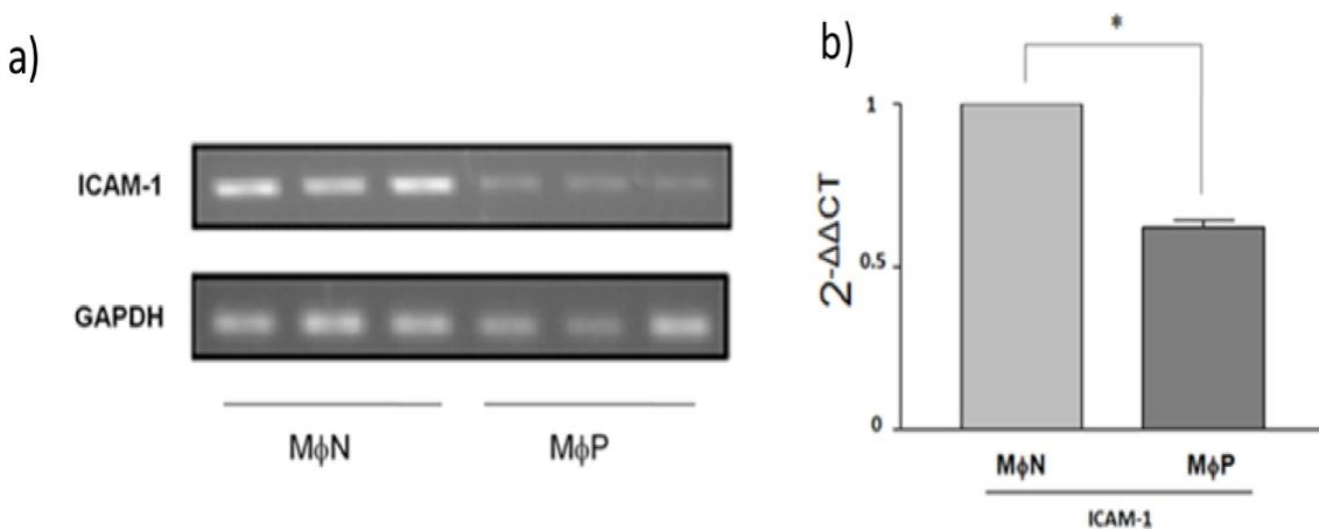


Fig. 4. Niveles de expresión de ARNm de ICAM-1 en MφN o MφP. a) Electroforesis de productos de RT-PCR en gel de agarosa/BrEt (1.2%). Se utilizaron oligos para el gene ICAM-1 en MφP o MφN para sintetizar y amplificar un segmento por PCR. Se amplificó un segmento de GAPDH como control interno. Se utilizaron tres pases de Mφ y MφP (68, 72 and 81). b) PCR-RT tiempo real; se observa disminución en la expresión de MφP con respecto a los MφN. la fluorescencia relativa de cada ARNm cuantificado como $2^{-\Delta\Delta CT}$ se normalizó con β -actin. Los datos son representativos de por lo menos tres experimentos independientes.

La persistencia del VSR reduce la síntesis de la proteína ICAM-1 y su expresión en la superficie celular

La persistencia del VSR redujo la síntesis de ARNm, lo que sugería que la síntesis proteica y su expresión en la superficie del M ϕ P deberían estar reducidas. En los ensayos de western blot se observó una disminución en la síntesis total de ICAM-1 in M ϕ P con respecto a los M ϕ N (Fig. 5a and 5b). Se realizaron experimentos de citometría de flujo para determinar si la disminución en la síntesis proteica se relacionaba con una menor expresión de esta proteína a nivel de la membrana del M ϕ , se encontró una media de intensidad de fluorescencia (concentración de proteína) menor para los M ϕ P en comparación con los M ϕ N; MIF:20 y MIF:100, respectivamente (Fig. 5c).

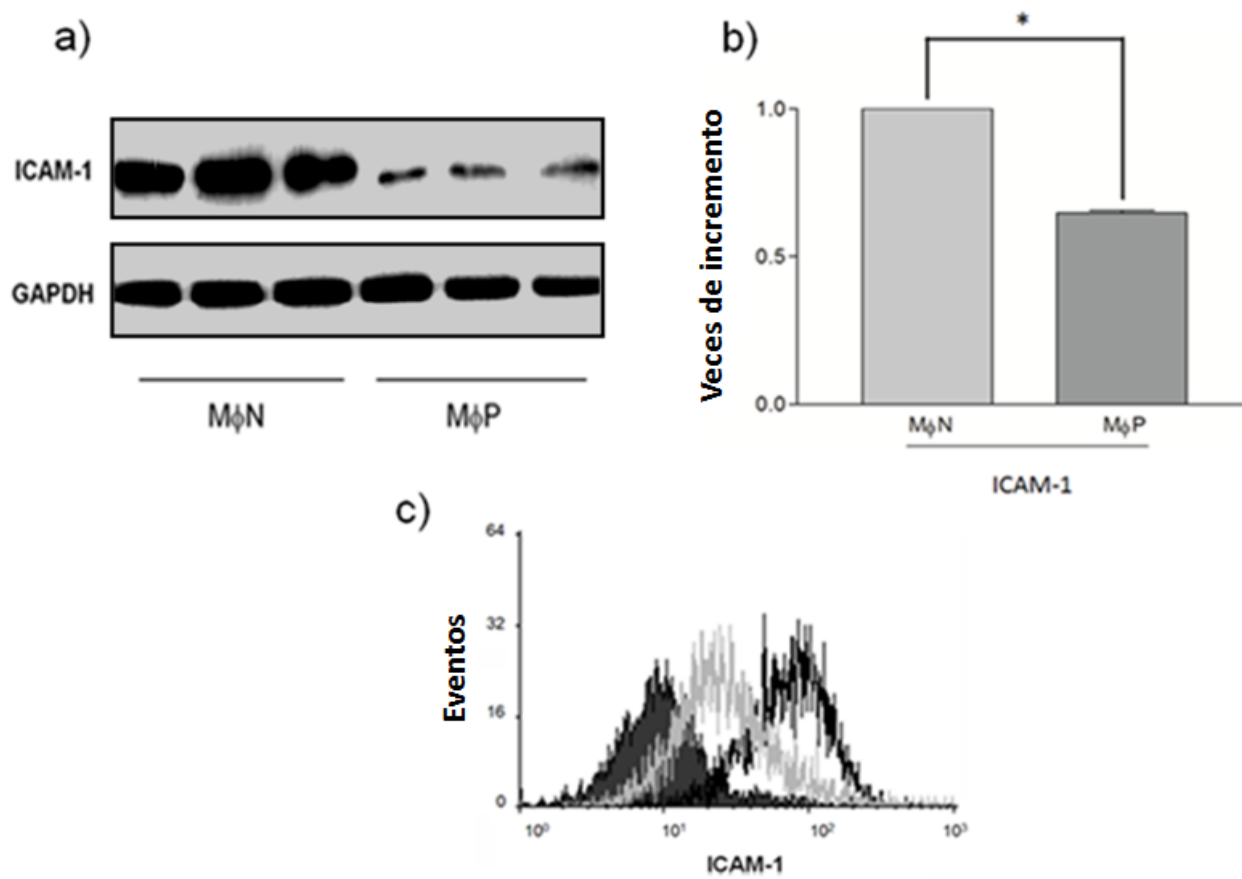


Fig.5. Expresión de ICAM-1 en MφN y MφP. Ensayo de western blot de los extractos de proteína total de ICAM-1 MφP o MφN; el control de carga fue GAPDH y se utilizaron 3 pases distintos de MφP y MφN ; b) abundancia relativa de proteína ICAM-1. Las densidades de las bandas amplificadas se expresan como veces de incremento con respecto a GAPDH; c) determinación de ICAM-1 por citometría de flujo en la superficie celular de MφP (línea gris) o MφN (línea negra) utilizando anti-ICAM-1 o IgG1, el control de isotipo (histograma relleno). Los datos son representativos de un mínimo tres experimentos independientes (*: P <0.05).

El bloqueo de ICAM-1 en superficie con Anti-ICAM-1 reduce la adhesión de HiNT al Mφ

La intensidad de fluorescencia de HiNT disminuyó 10 veces por el bloqueo con anti-ICAM-1 con respecto al control de isotipo; sin embargo la fluorescencia no se eliminó, sugiriendo que los MφN poseen otros receptores que unen a la bacteria (Fig. 6a). Las diferencias en la unión de HiNT a MφP por bloqueo con anti-ICAM-1 y el control de isotipo fueron mínimas (Fig. 6b), por lo que la disminución en la adhesión de HiNT fue menor que para los MφN, esta observación es consistente con la reducción en la expresión de ICAM-1 en los Mφ infectados en forma persistente.

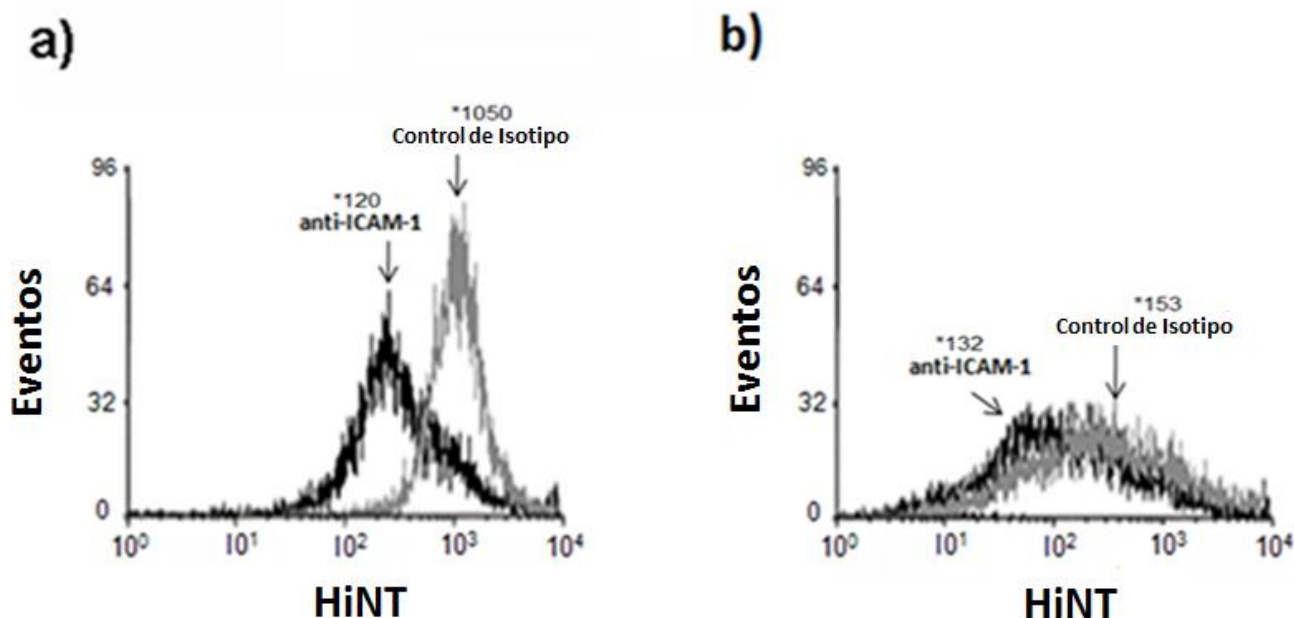


Fig. 6 Efecto en la adhesión de HiNT por el bloqueo específico de ICAM-1 en la superficie del Mφ.

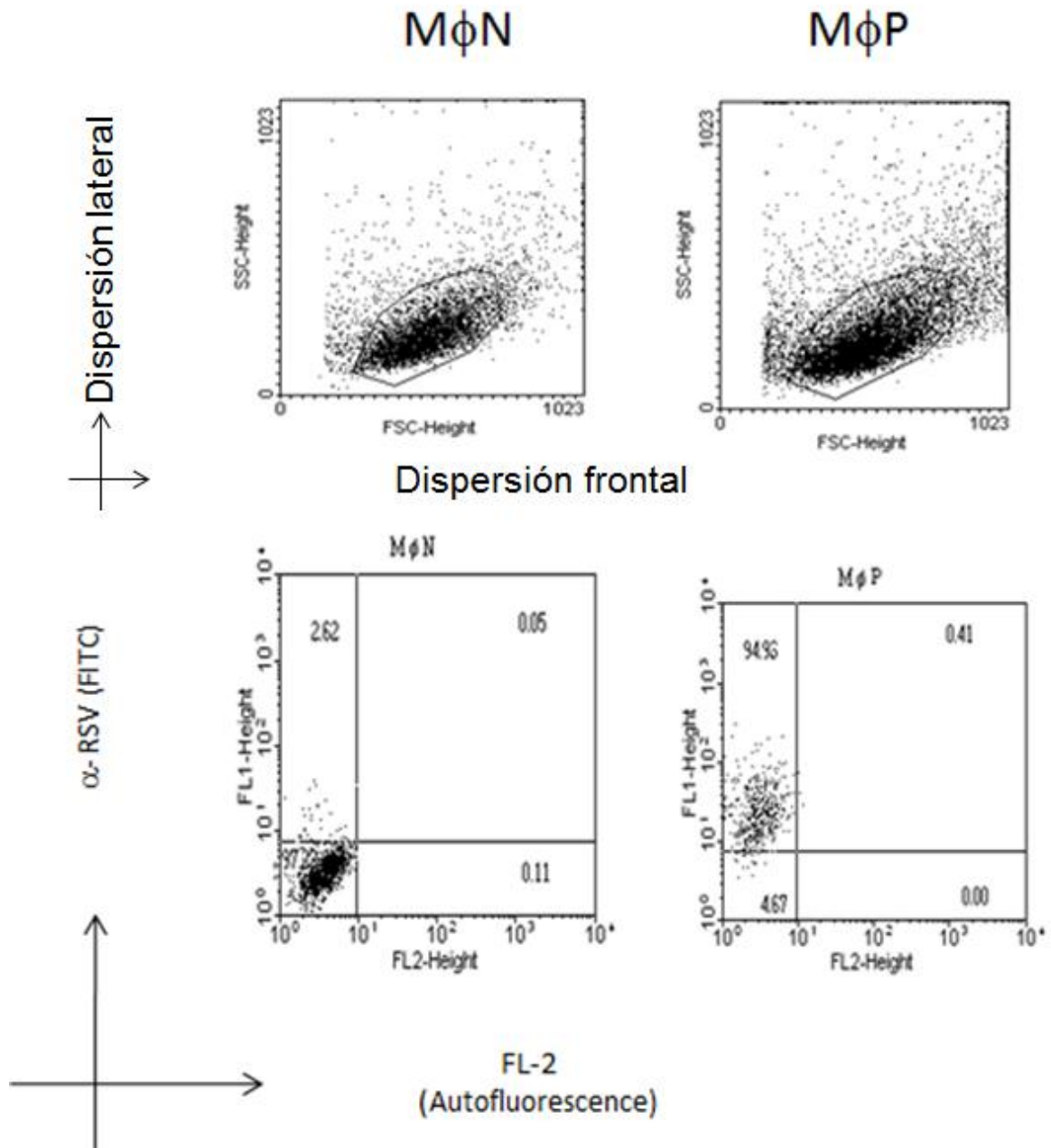
Determinación de la adhesión de HiNT-FITC por citometría de flujo por los (a) MφN y (b) MφP previo bloqueo de ICAM-1 expresado en la superficie del Mφ con Acn anti-ICAM-1 o IgG1 como control de isotipo

(*: media de intensidad de fluorescencia). Los datos son representativos de un mínimo de tres experimentos independientes.

Figuras suplementarias

Confirmación de la persistencia del VSR en la línea celular p388d1.

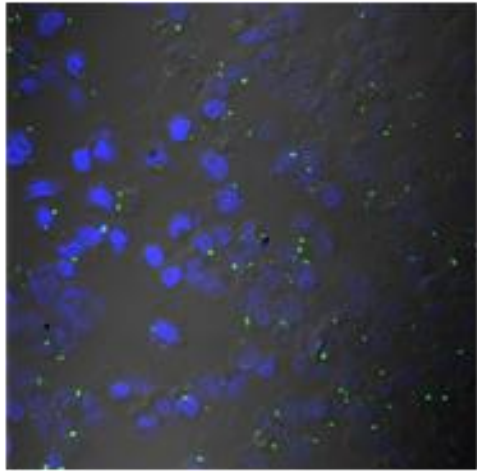
La presencia del RSV en los M ϕ P fue monitoreada tanto por citometría de flujo, como por inmunofluorescencia directa, se utilizó una mezcla de anticuerpos monoclonales murinos anti-RSV fluoresceinados (DAKO #K6102) a una dilución 7:100, los resultados reflejan la presencia del antígeno viral en alrededor del 85% de los M ϕ P (Supl. 1).



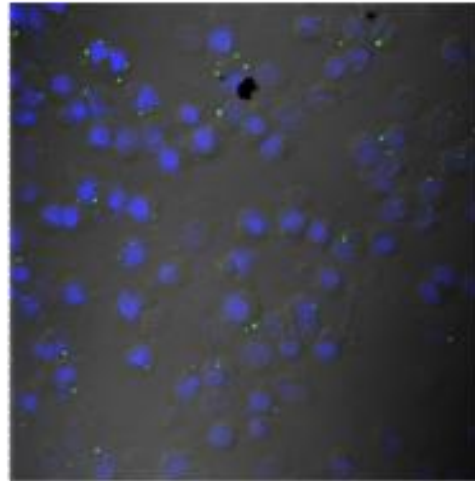
Suplementaria 1: Población utilizada en el estudio. Arriba se muestra la población elegida por tamaño y granularidad para MφN (izquierda) y MφP (derecha). Abajo se muestra el porcentaje de células positivas para RSV contra un canal autofluorescencia del canal FL-2.

Visualización de la disminución de la capacidad de captura de HiNT por Mφ

Con el fin de obtener una imagen representativa de la disminución de la capacidad de captura de los MφP con respecto a los MφN, se obtuvieron fotografías por microscopía confocal de MφN y MφP cultivados monocapa con HiNT-FITC durante 90 minutos resultando evidente la mayor capacidad de captura por los MφN (supl. izquierda) con respecto a los MφP (supl. derecha).



MφN

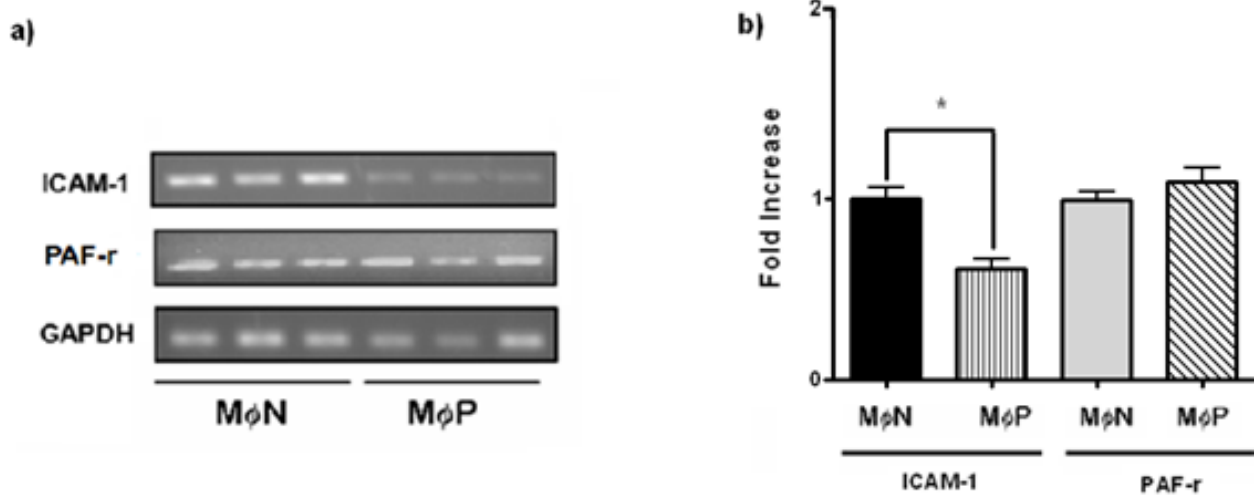


MφP

Suplementaria 2. Microscopía confocal de MφN (izquierda) y MφP (derecha) infectados con HiNT marcados con FITC (verde), los núcleos se marcaron con DAPI (azul).

Comparativo de los niveles de expresión del mensajero de PAF-r e ICAM-1

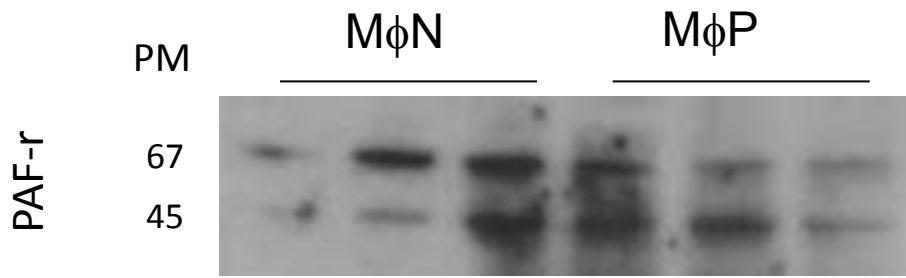
PAF-r e ICAM-1 son ligandos de HiNT y ambos se expresan en M ϕ ; sin embargo no se observaron diferencias entre los cultivos M ϕ N y M ϕ P en la expresión del mensajero de PAF-r, en contraste la expresión del mensajero de ICAM-1 en los mismos pases disminuyó de manera significativa (supl. 4).



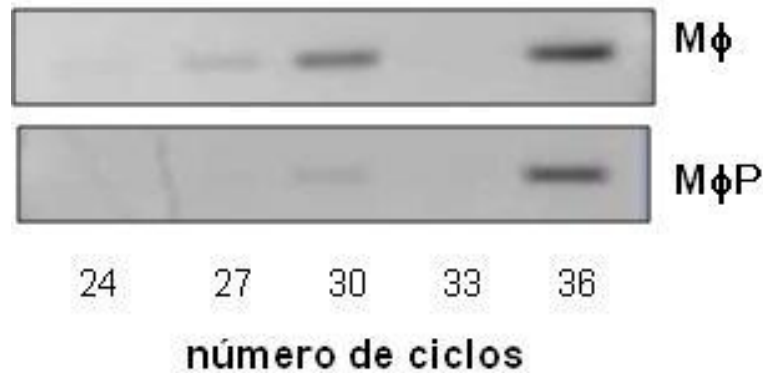
Suplementaria 4. Niveles de expresión de ARNm de ICAM-1 y PAFr en M ϕ N o M ϕ P. a)

Electroforesis de productos de RT-PCR en gel de agarosa/BrEt (1.2%). Se utilizaron oligos para el gene ICAM-1 y PAFr en M ϕ P o M ϕ N para sintetizar y amplificar los segmento correspondientes por PCR. Se amplificó un segmento de GAPDH como control interno. Se utilizaron tres pases de M ϕ y M ϕ P (68, 72 and 81). b) Densitometría comparativa utilizando GAPDH como control interno.

La persistencia del VSR no influyó en la síntesis de ARNm de PAF-r, lo que sugería que la síntesis proteica para este receptor debería mantenerse sin cambio; sin embargo el western blot mostró una desregulación dispar a nivel proteico, así como dos bandas claramente definidas sin patrón de expresión definido aparente (Suplementaria 3)



Suplementaria 5. Expresión de PAF-r en MφN y MφP. Ensayo de western blot de los extractos de proteína total de PAF-r de MφP o MφN. PM peso molecular



Suplementaria. **Cinética de estandarización de las condiciones de PCR.** Niveles de expresión de ARNm de ICAM-1 se indica el número de ciclos para determinar el punto óptimo de medición y el punto de saturación saturación.

.Consideraciones finales y discusión

La línea de investigación del laboratorio se enfoca en el estudio del efecto de la persistencia del VSR en las funciones del M ϕ , utilizando un modelo de macrófagos murinos. El laboratorio cuenta con antecedentes sólidos con respecto a la fagocitosis mediada por receptores Fc- γ cuya expresión en los M ϕ P aumenta con respecto a los M ϕ N, junto con la capacidad del macrófago para internalizar eritrocitos opsonizados (Guerrero-Plata, Ortega et al. 2001); pero no se tenían antecedentes sobre el efecto de la persistencia viral en la fagocitosis mediada por las vías no opsónicas. En el proceso de la fagocitosis, la adhesión o interacción inicial ligando-receptor celular es determinante de la vía de entrada, tránsito y destino de la partícula (Underhill, and Ozinsky. 2002). El proceso de adhesión también tiene efecto en la producción de citosinas, en la viabilidad celular, en el repertorio de moléculas que se expresan en la superficie así como su localización en la membrana (Frankenberg, Kirschnek et al. 2008), Entre los receptores celulares involucrados en la fagocitosis, se pueden reconocer los que inducen la polimerización de actina y la internalización de la partícula y los que solo funcionan como ligando o molécula de anclaje que optimizan la capacidad de captura del macrófago sin la participación de señales de internalización (Underhill, and Ozinsky. 2002). El efecto de la persistencia viral en los macrófagos sobre la expresión de estos receptores podría interferir directamente en el proceso de la fagocitosis y consecuentemente comprometer la capacidad del macrófago para eliminar agentes patógenos secundarios como bacterias. La infección por VSR se ha asociado a infecciones secundarias de HiNT, los pacientes con EPOC sufren de exacerbaciones asociadas a HiNT y la persistencia del virus se ha sugerido en pacientes con

EPOC ya que se puede detectar genoma viral continuamente durante los periodos estables de la enfermedad (Seemungal, and Wedzicha 2003). En el modelo de persistencia de VSR en macrófagos observamos una disminución generalizada de las capacidades fagocíticas del macrófago sobre HiNT, que incluyeron la captura (adhesión e ingestión), producción de óxido nítrico y capacidad bactericida (Tabla2). Estos datos sugieren una posible correlación con antecedentes de datos obtenidos de macrófagos en pacientes con EPOC (Taylor, Finney-Hayward et al. 2010). Nuestros resultados indican que la infección del M ϕ por VSR disminuye la capacidad de los M ϕ P para capturar HiNT (Figs. 1 y 3). La capacidad de captura incluye tanto a las bacterias que están adheridas como a las ingeridas, la reproducibilidad de los experimentos de captura que incluye la adhesión e ingestión de bacterias por los M ϕ se logró con la sincronización por temperatura del momento inicial de la fagocitosis (ver material y métodos), esto permitió dar seguimiento al proceso de captura durante 90 min a través de una cinética (fig 3). La disminución de la capacidad de captura en los M ϕ P (fig. 1 y 3) se podría explicar por una menor capacidad de adhesión, que a su vez afectara al proceso de ingestión, por lo que se decidió evaluar la capacidad de adhesión de HiNT de manera independiente del proceso de ingestión, inhibiendo la internalización de la bacteria por temperatura a 15°C (figura 3c) o por bloqueo de dectina-1, que se reporta como un receptor cuya señalización es necesaria para la internalización de HiNT (figura 4). En ambos casos la capacidad de adhesión de HiNT en M ϕ P disminuyó significativamente. Estos datos implican que la adhesión de la bacteria a su ligando se interfiere por efecto de la persistencia de VSR en el macrófago. Se evaluó la posibilidad de que la interferencia del ligando podría estar mediada por factores solubles que impidieran la asociación de la bacteria con sus posibles receptores en el macrófago; sin embargo esto

se descartó debido a que no se encontraron diferencias en la captura de bacteria tratada con medio condicionado por los M ϕ N (fig 2), por lo que se decidió evaluar si había algún ligando de HiNT desregulado en los M ϕ P. Entre los receptores reportados como ligandos de HiNT se encontró que ICAM-1 y PAF-r se expresan también en macrófagos. La infección aguda por VSR sobre regula la expresión de ICAM-1 y PAF-r en células epiteliales humanas, (Jiang, Nagata et al. 1999; Avadhanula, Rodriguez et al. 2006) y células del endotelio pulmonar (Arnold and Konig 2005). HiNT aumenta su adhesión a las células infectadas de manera aguda por VSR por efecto del aumento de ICAM-1 y PAF-r. En el mismo trabajo Avadhanula et al mencionan que la desregulación de estas moléculas es dependiente del tipo celular como del agente viral involucrado (Avadhanula, Rodriguez et al. 2006). En contraste, Raza et al. observaron que la infección aguda por VSR reduce la adhesión en una línea celular monocítica (El Ahmer, Raza et al. 1999). Nosotros encontramos que la expresión de ICAM-1 en M ϕ P disminuye con respecto a los M ϕ N a nivel de proteína y mensajero y que la expresión de PAF-r a nivel de proteína se encuentra desregulada. Nuestros datos obtenidos de una línea celular de origen monocítico indican que los M ϕ P tienen menor capacidad para adherir HiNT en condiciones de infección en concordancia con lo reportado por Raza et al.

La regulación negativa a nivel de proteína de ICAM-1 ocurre a nivel transcripcional, ya que la síntesis de ARNm de ICAM-1 se redujo en magnitudes similares (Fig. 4 y 5). Estos resultados sugieren que la diferencia entre las capacidades de adhesión entre los M ϕ P y M ϕ N fueron resultado directo de la disminución de ICAM-1 en los M ϕ P; esto se comprobó con el bloqueo de esta molécula con anticuerpos en M ϕ P y M ϕ N, en los M ϕ N se observó una disminución significativa en su capacidad de captura; sin embargo esta no se

redujo completamente (fig. 6a); para el caso de los M ϕ P el bloqueo de ICAM-1 no tuvo efectos en su capacidad para capturar HiNT (fig. 6b); por lo que se infiere que ICAM-1 no es la única proteína de superficie que funciona como receptor de HiNT; pero su disminución en los M ϕ P explica la menor capacidad de adhesión de los M ϕ P con respecto a los M ϕ N.

La deficiencia en actividades principales del macrófago como la fagocitosis en el contexto de enfermedades respiratorias crónicas como EPOC por efecto de la persistencia viral, podría estimular las infecciones recurrentes por HiNT agudizando y/o prolongando los síntomas de estas patologías. Estos resultados pueden también ayudar a entender observaciones realizadas con macrófagos de pacientes con padecimiento de EPOC, los macrófagos de estos pacientes tienen una menor capacidad bactericida que los macrófagos obtenidos de pacientes normales (Taylor, Finney-Hayward et al. 2010); por otro lado ICAM-1 es una molécula que participa en la sinapsis inmunológica, por lo que la disminución de su efectividad en la presentación de antígeno podría comprometer la actividad de la células T. La disminución de ICAM-1 como mecanismo de evasión del sistema inmune podría permitir la permanencia del virus en su hospedero como es el caso del virus linfotrópico de células T-1 (HTLV-1) que a través de su proteína p21 regula negativamente ICAM-1 impidiendo la adhesión eficiente de NK con lo que evitan su actividad citotóxica (Banerjee, Feuer et al. 2007), en modelos murinos de persistencia de RSV la presencia viral puede ser detectada más de 100 días posteriores a la infección; no obstante la actividad de células T CD8 citotóxicas se mantiene intacta (Schwarze, O'Donnell et al. 2004). Sería relevante determinar si la desregulación de ICAM-1 tiene alguna participación en la capacidad del VSR para evadir al sistema inmune en infecciones persistentes.

APÉNDICE

MATERIAL Y REACTIVOS.

Medios y suplementos para cultivo

D-MEM (GIBCO 12100-046)

RPMI 1640 (GIBCO 23400-021)

- Medio de Cultivo para las Células P388D1 (RPMI 1640-ME).

RPMI 1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 2.2 g/L de Hepes, 2.2 g/L de bicarbonato de sodio y 0.1% de 2-mercaptoetanol.

- Medio de cultivo para las células VERO.

D-MEM suplementado con 5% de SFB, 2.2 g/lit de Hepes, 2.2. g/lit de bicarbonato de sodio, 1% de L-glutamina.

Medio de cultivo para *Haemophilus influenzae*

Base agar sangre

Infusión cerebro corazón (BIXON 4029069)

- Agregados.

Suero fetal bovino (GIBCO-BRL 10437-028)

Hepes (SIGMA H-0763)

Bicarbonato de sodio (PRODUCTOS QUÍMICOS MONTERREY 1290)

2- Mercaptoetanol (BIO-RAD 161-0710)

L-Glutamina (SIGMA G-1517)

Polienriquecimiento liofilizado (BIXON 211665)

Agar Indubiosa A-37 (Biosepra, UK)

Sangre de carnero desfibrinada

Reactivos y Soluciones

- NaCl (MERCK 6404)
- NaSO₄·7H₂O (MERCK 6649)
- NaH₂PO₄ (J.T. BAKER 790)
- MgSO₄ (J.T. BAKER 2500)
- NaOH (MERCK 6498)
- NaNO₂ (Productos químicos de Monterrey 44901)
- NED (SIGMA N-9125)
- Cristal violeta (SIGMA C0775)
- SDS
- Bromuro de etidio (SIGMA E7637)
- FITC (SIGMA 3326)
- Sulfato de Gentamicina (SON´S 87882)
- Azul Tripano (SIGMA T5526)
- Albúmina Sérica Bovina (SIGMA A-3350)
- Tripsina (SIGMA 1989)
- Paraformaldehído (SIGMA P6148)
- Dimetilsulfóxido (J.T. BAKER 9224)
- PBS
 - NaCl 8.0 gr
 - KCl 0.2 gr
 - Na₂HPO₄ 0.96 gr
 - KH₂PO₄ 0.2 grSe afora a 1 litro, se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza por autoclave.
- Solución de Albúmina al 1% en PBS
 - 1 gr de Albúmina Sérica Bovina en 100ml de PBS

Anticuerpos y conjugados.

- Kit Anti-VSR conjugado con FITC (DAKO K6102)
- Anti ICAM-1 policlonal de cabra (Santa Cruz SC1511)
- Anti ICAM-1 monoclonal-PE de hámster (BD Biosciences 553253)
- Anti igG Isotype monoclonal-PE de hámster (BD Biosciences 553972)
- Anti GAPDH policlonal de cabra (Santa Cruz SC20357)
- Anti PAF-R polyclonal M-16 (Santa Cruz sc-8744)

Material Desechable

- Botella para cultivo celular de 25 cm² (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 163371)
- Botellas para cultivo celular de 80 cm² (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 144881)
- Botella para cultivo celular de 150 cm² (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 147589)
- Cajas petri para cultivo celular 60 cm² (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 172931)
- Cajas petri para cultivo celular 100 cm² (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 172934)
- Placas de 96 pozos para cultivo celular (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 167008)
- Placas de 6 pozos para cultivo celular (COSTAR, Broadway, Cambridge Cat no. 3590)
- Portaobjetos de 8 pozos para cultivo celular (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 177402)
- Tubos de poliestireno 12X75 mm para lectura FACS (FALCON, Cat no. 2054)
- Puntas para micropipeta
- 100-1000 µl (COSTAR, Broadway, Cambridge Cat no. 4867)
- 20-250 µl (RAININ Instruments, Cat no. RT-250)

Bibliografía:

- Aderem, A. and D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." *Annu Rev Immunol* **17**: 593-623.
- Ahren, I. L., E. Eriksson, et al. (2003). "Nontypeable Haemophilus influenzae activates human eosinophils through beta-glucan receptors." *Am J Respir Cell Mol Biol* **29**(5): 598-605.
- Ahren, I. L., D. L. Williams, et al. (2001). "The importance of a beta-glucan receptor in the nonopsonic entry of nontypeable Haemophilus influenzae into human monocytic and epithelial cells." *J Infect Dis* **184**(2): 150-158.
- Allen, L. A. and A. Aderem (1996). "Mechanisms of phagocytosis." *Curr Opin Immunol* **8**(1): 36-40.
- Areschoug, T. and S. Gordon (2008). "Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands." *Contrib Microbiol* **15**: 45-60.
- Arnold, R. and W. Konig (2005). "Respiratory syncytial virus infection of human lung endothelial cells enhances selectively intercellular adhesion molecule-1 expression." *J Immunol* **174**(11): 7359-7367.
- Avadhanula, V., C. A. Rodriguez, et al. (2006). "Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner." *J Virol* **80**(4): 1629-1636.
- Avadhanula, V., C. A. Rodriguez, et al. (2006). "Nontypeable Haemophilus influenzae adheres to intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on respiratory epithelial cells and upregulates ICAM-1 expression." *Infect Immun* **74**(2): 830-838.
- Baldridge, P. and L. B. Senterfit (1976). "Persistent infection of cells in culture by respiratory syncytial virus." *Proc Soc Exp Biol Med* **151**(4): 684-688.
- Banerjee, P., G. Feuer, et al. (2007). "Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) p12I down-modulates ICAM-1 and -2 and reduces adherence of natural killer cells, thereby protecting HTLV-1-infected primary CD4+ T cells from autologous natural killer cell-mediated cytotoxicity despite the reduction of major histocompatibility complex class I molecules on infected cells." *J Virol* **81**(18): 9707-9717.
- Bangham, C. R. and A. J. McMichael (1986). "Specific human cytotoxic T cells recognize B-cell lines persistently infected with respiratory syncytial virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(23): 9183-9187.
- Bauer, S. R., K. L. Holmes, et al. (1986). "Clonal relationship of the lymphoblastic cell line P388 to the macrophage cell line P388D1 as evidenced by immunoglobulin gene rearrangements and expression of cell surface antigens." *J Immunol* **136**(12): 4695-4699.
- Beadling, C. and M. K. Slifka (2004). "How do viral infections predispose patients to bacterial infections?" *Curr Opin Infect Dis* **17**(3): 185-191.

- Becker, S., J. M. Soukup, et al. (2003). "Response of human alveolar macrophages to ultrafine, fine, and coarse urban air pollution particles." Exp Lung Res **29**(1): 29-44.
- Behera, A. K., H. Matsuse, et al. (2001). "Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection." Biochem Biophys Res Commun **280**(1): 188-195.
- Bitko, V., O. Shulyayeva, et al. (2007). "Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF-kappaB-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth." J Virol **81**(4): 1786-1795.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Bustamante-Calvillo, M. E., F. R. Velazquez, et al. (2001). "Molecular detection of respiratory syncytial virus in postmortem lung tissue samples from Mexican children deceased with pneumonia." Pediatr Infect Dis J **20**(5): 495-501.
- Cesario, T. C. "Viral Pneumonia in Adults." Clin Infect Dis.
- Collins, P. L. and B. S. Graham (2008). "Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis." J Virol **82**(5): 2040-2055.
- Conover, W. J. (1999). Practical nonparametric statistics. New York, Wiley.
- Chanock, R. M., R. H. Parrott, et al. (1992). "Serious respiratory tract disease caused by respiratory syncytial virus: prospects for improved therapy and effective immunization." Pediatrics **90**(1 Pt 2): 137-143.
- Chow, C., G. Downey, et al. (2004). "Measurements of phagocytosis and phagosomal maturation." Curr Protoc Cell Biol **Chapter 15**: Unit 15.17.
- Dustin, M. L. and T. A. Springer (1988). "Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells." J Cell Biol **107**(1): 321-331.
- El Ahmer, O. R., M. W. Raza, et al. (1999). "Binding of bacteria to HEp-2 cells infected with influenza A virus." FEMS Immunol Med Microbiol **23**(4): 331-341.
- Falsey, A. R. (2005). "Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults." Exp Lung Res **31 Suppl 1**: 77.
- Feldman, S. A., S. Audet, et al. (2000). "The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate." J Virol **74**(14): 6442-6447.
- Fernie, B. F., E. C. Ford, et al. (1981). "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**(1): 83-86.
- Foxwell, A. R., J. M. Kyd, et al. (1998). "Nontypeable Haemophilus influenzae: pathogenesis and prevention." Microbiol Mol Biol Rev **62**(2): 294-308.
- Franke-Ullmann, G., C. Pfortner, et al. (1995). "Alteration of pulmonary macrophage function by respiratory syncytial virus infection in vitro." J Immunol **154**(1): 268-280.
- Frankenberg, T., S. Kirschnek, et al. (2008). "Phagocytosis-induced apoptosis of macrophages is linked to uptake, killing and degradation of bacteria." Eur J Immunol **38**(1): 204-215.
- Fritz, J. H. and S. E. Girardin (2005). "How Toll-like receptors and Nod-like receptors contribute to innate immunity in mammals." J Endotoxin Res **11**(6): 390-394.

- Fuentes, S., K. C. Tran, et al. (2007). "Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein." J Virol **81**(15): 8361-8366.
- Gan, S. W., L. Ng, et al. (2008). "Structure and ion channel activity of the human respiratory syncytial virus (hRSV) small hydrophobic protein transmembrane domain." Protein Sci **17**(5): 813-820.
- Gan, S. W., E. Tan, et al. (2012). "The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels." J Biol Chem **287**(29): 24671-24689.
- Gordon, S. B. and R. C. Read (2002). "Macrophage defences against respiratory tract infections." Br Med Bull **61**: 45-61.
- Guerrero-Plata, A., E. Ortega, et al. (2001). "Persistence of respiratory syncytial virus in macrophages alters phagocytosis and pro-inflammatory cytokine production." Viral Immunol **14**(1): 19-30.
- Hacking, D. and J. Hull (2002). "Respiratory syncytial virus--viral biology and the host response." J Infect **45**(1): 18-24.
- Hall, C. B., K. R. Powell, et al. (1986). "Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function." N Engl J Med **315**(2): 77-81.
- Hament, J. M., J. L. Kimpen, et al. (1999). "Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review." FEMS Immunol Med Microbiol **26**(3-4): 189-195.
- Hegele, R. G., S. Hayashi, et al. (1994). "Persistence of respiratory syncytial virus genome and protein after acute bronchiolitis in guinea pigs." Chest **105**(6): 1848-1854.
- Hishiki, H., N. Ishiwada, et al. (2011). "Incidence of bacterial coinfection with respiratory syncytial virus bronchopulmonary infection in pediatric inpatients." J Infect Chemother **17**(1): 87-90.
- Hu, G., A. Y. Gong, et al. (2010). "miR-221 suppresses ICAM-1 translation and regulates interferon-gamma-induced ICAM-1 expression in human cholangiocytes." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **298**(4): G542-550.
- Hubbard, A. K. and R. Rothlein (2000). "Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades." Free Radic Biol Med **28**(9): 1379-1386.
- Iankevich, O. D. and R. S. Dreizin (1977). "[Chronic infection of HeLa cells with respiratory syncytial virus]." Vopr Virusol(2): 142-147.
- Iyer Parameswaran, G. and T. F. Murphy (2009). "Chronic obstructive pulmonary disease: role of bacteria and updated guide to antibacterial selection in the older patient." Drugs Aging **26**(12): 985-995.
- Janeway, C. A., Jr. (2001). "How the immune system protects the host from infection." Microbes Infect **3**(13): 1167-1171.
- Jiang, Z., N. Nagata, et al. (1999). "Fimbria-mediated enhanced attachment of nontypeable Haemophilus influenzae to respiratory syncytial virus-infected respiratory epithelial cells." Infect Immun **67**(1): 187-192.
- Kaneko, M., J. Watanabe, et al. (2002). "Impact of respiratory syncytial virus infection as a cause of lower respiratory tract infection in children younger than 3 years of age in Japan." J Infect **44**(4): 240-243.
- Kapikian, A. Z., J. A. Bell, et al. (1966). "Clinical, antigenic and prophylactic effects of an inactivated measles virus vaccine." Am J Epidemiol **84**(1): 138-149.
- Kimpen, J. L. (1996). "Respiratory syncytial virus immunology." Pediatr Allergy Immunol **7**(9 Suppl): 86-90.

- Korppi, M., M. Leinonen, et al. (1989). "Bacterial coinfection in children hospitalized with respiratory syncytial virus infections." Pediatr Infect Dis J **8**(10): 687-692.
- Krivitskaia, V. Z. and N. V. Iakovleva (1992). "[The characteristics of the humoral response to respiratory syncytial viral infection in adult patients with different forms of bronchitis]." Vopr Virusol **37**(3): 146-149.
- Krivitskaia, V. Z., N. V. Iakovleva, et al. (1996). "[Characteristics of anti-respiratory syncytial humoral immunity during persistence of respiratory syncytial virus antigens in adult patients with chronic obstructive bronchitis]." Vopr Virusol **41**(5): 234-237.
- Labro, M. T. (2000). "Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immuno-fairy tales"?" Clin Microbiol Rev **13**(4): 615-650.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lambert, D. M., M. W. Pons, et al. (1980). "Nucleic acids of respiratory syncytial virus." J Virol **36**(3): 837-846.
- Laskin, D. L. (2009). "Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces." Chem Res Toxicol **22**(8): 1376-1385.
- Mannino, D. M. and A. S. Buist (2007). "Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends." Lancet **370**(9589): 765-773.
- Martinez, I. and J. A. Melero (2000). "Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans." J Gen Virol **81**(Pt 11): 2715-2722.
- McCullers, J. A. (2006). "Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus." Clin Microbiol Rev **19**(3): 571-582.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "Innate immunity: impact on the adaptive immune response." Curr Opin Immunol **9**(1): 4-9.
- Mendias, C. L., J. P. Gumucio, et al. (2012). "Mechanical loading and TGF-beta change the expression of multiple miRNAs in tendon fibroblasts." J Appl Physiol **113**(1): 56-62.
- Merolla, R., N. A. Rebert, et al. (1995). "Respiratory syncytial virus replication in human lung epithelial cells: inhibition by tumor necrosis factor alpha and interferon beta." Am J Respir Crit Care Med **152**(4 Pt 1): 1358-1366.
- Mills, B. G. and F. R. Singer (1987). "Critical evaluation of viral antigen data in Paget's disease of bone." Clin Orthop Relat Res(217): 16-25.
- Mills, B. G., F. R. Singer, et al. (1981). "Immunohistological demonstration of respiratory syncytial virus antigens in Paget disease of bone." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(2): 1209-1213.
- Mills, B. G., F. R. Singer, et al. (1984). "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(183): 303-311.
- Moghaddam, S. J., C. E. Ochoa, et al. "Nontypeable Haemophilus influenzae in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer." Int J Chron Obstruct Pulmon Dis **6**: 113-123.
- Monobe, H., T. Ishibashi, et al. (2003). "Role of respiratory viruses in children with acute otitis media." Int J Pediatr Otorhinolaryngol **67**(7): 801-806.

- Murphy, T. F. and S. Sethi (2002). "Chronic obstructive pulmonary disease: role of bacteria and guide to antibacterial selection in the older patient." Drugs Aging **19**(10): 761-775.
- Netea, M. G., C. van der Graaf, et al. (2004). "Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system." J Leukoc Biol **75**(5): 749-755.
- Ng, C. T., B. M. Sullivan, et al. "The role of dendritic cells in viral persistence." Curr Opin Virol **1**(3): 160-166.
- Nwankwo, M. U., A. M. Dym, et al. (1988). "Seasonal variation in respiratory syncytial virus infections in children in Benin-City, Nigeria." Trop Geogr Med **40**(4): 309-313.
- Oldstone, M. B. (1998). "Viral persistence: mechanisms and consequences." Curr Opin Microbiol **1**(4): 436-441.
- Oldstone, M. B. (2009). "Anatomy of viral persistence." PLoS Pathog **5**(7): e1000523.
- Ostler, T., T. Hussell, et al. (2001). "Long-term persistence and reactivation of T cell memory in the lung of mice infected with respiratory syncytial virus." Eur J Immunol **31**(9): 2574-2582.
- Ozato, K., H. Tsujimura, et al. (2002). "Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the immune system." Biotechniques Suppl: 66-68, 70, 72 passim.
- Panuska, J. R., N. M. Cirino, et al. (1990). "Productive infection of isolated human alveolar macrophages by respiratory syncytial virus." J Clin Invest **86**(1): 113-119.
- Pastey, M. K., J. E. Crowe, Jr., et al. (1999). "RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus-induced syncytium formation." J Virol **73**(9): 7262-7270.
- Pastey, M. K., T. L. Gower, et al. (2000). "A RhoA-derived peptide inhibits syncytium formation induced by respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3." Nat Med **6**(1): 35-40.
- Patel, J., H. Faden, et al. (1992). "Effect of respiratory syncytial virus on adherence, colonization and immunity of non-typable Haemophilus influenzae: implications for otitis media." Int J Pediatr Otorhinolaryngol **23**(1): 15-23.
- Pizarro-Cerda, J. and P. Cossart (2006). "Bacterial adhesion and entry into host cells." Cell **124**(4): 715-727.
- Ramphal, R., P. M. Small, et al. (1980). "Adherence of Pseudomonas aeruginosa to tracheal cells injured by influenza infection or by endotracheal intubation." Infect Immun **27**(2): 614-619.
- Rampini, S. K., P. Selchow, et al. (2008). "LspA inactivation in Mycobacterium tuberculosis results in attenuation without affecting phagosome maturation arrest." Microbiology **154**(Pt 10): 2991-3001.
- Rao, V. K., G. P. Krasan, et al. (1999). "Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typable Haemophilus influenzae." FEMS Microbiol Rev **23**(2): 99-129.
- Raza, M. W., C. C. Blackwell, et al. (2000). "Bactericidal activity of a monocytic cell line (THP-1) against common respiratory tract bacterial pathogens is depressed after infection with respiratory syncytial virus." J Med Microbiol **49**(3): 227-233.
- Reid, P. T. and J. M. Sallenave (2003). "Cytokines in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease." Curr Pharm Des **9**(1): 25-38.

- Roebuck, K. A. and A. Finnegan (1999). "Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression." J Leukoc Biol **66**(6): 876-888.
- Sarmiento, R. E., R. Tirado, et al. (2002). "Characteristics of a respiratory syncytial virus persistently infected macrophage-like culture." Virus Res **84**(1-2): 45-58.
- Schwarze, J., D. R. O'Donnell, et al. (2004). "Latency and persistence of respiratory syncytial virus despite T cell immunity." Am J Respir Crit Care Med **169**(7): 801-805.
- Seemungal, T. A. and J. A. Wedzicha (2003). "Viral infections in obstructive airway diseases." Curr Opin Pulm Med **9**(2): 111-116.
- Shapiro, S. D. (1999). "The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **160**(5 Pt 2): S29-32.
- Sikkel, M. B., J. K. Quint, et al. (2008). "Respiratory syncytial virus persistence in chronic obstructive pulmonary disease." Pediatr Infect Dis J **27**(10 Suppl): S63-70.
- Soler-Cataluna, J. J., M. A. Martinez-Garcia, et al. (2005). "Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease." Thorax **60**(11): 925-931.
- Spann, K. M., K. C. Tran, et al. (2004). "Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]." J Virol **78**(8): 4363-4369.
- Strecker, H. J., S. Philippou, et al. (1996). "Detection of respiratory syncytial virus (RSV) antigen in the lungs of guinea pigs 6 weeks after experimental infection and despite of the production of neutralizing antibodies." Arch Virol **141**(3-4): 401-410.
- Suzuki, K. and L. O. Bakaletz (1994). "Synergistic effect of adenovirus type 1 and nontypeable Haemophilus influenzae in a chinchilla model of experimental otitis media." Infect Immun **62**(5): 1710-1718.
- Takala, A. K., O. Meurman, et al. (1993). "Preceding respiratory infection predisposing for primary and secondary invasive Haemophilus influenzae type b disease." Pediatr Infect Dis J **12**(3): 189-195.
- Taylor, A. E., T. K. Finney-Hayward, et al. (2010). "Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD." Eur Respir J **35**(5): 1039-1047.
- Tercier, J. A. (1983). "Bronchiolitis: a clinical review." J Emerg Med **1**(2): 119-123.
- Tripp, R. A., L. P. Jones, et al. (2001). "CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein." Nat Immunol **2**(8): 732-738.
- Uematsu, S. and S. Akira (2006). "Toll-like receptors and innate immunity." J Mol Med (Berl) **84**(9): 712-725.
- Underhill, D. M. and A. Ozinsky (2002). "Phagocytosis of microbes: complexity in action." Annu Rev Immunol **20**: 825-852.
- Underhill, D. M. and A. Ozinsky (2002). "Toll-like receptors: key mediators of microbe detection." Curr Opin Immunol **14**(1): 103-110.
- Valarcher, J. F., H. Bourhy, et al. (2001). "Persistent infection of B lymphocytes by bovine respiratory syncytial virus." Virology **291**(1): 55-67.
- Valdovinos, M. R. and B. Gomez (2003). "Establishment of respiratory syncytial virus persistence in cell lines: association with defective interfering particles." Intervirology **46**(3): 190-198.

- van Schaik, S. M., N. Obot, et al. (2000). "Role of interferon gamma in the pathogenesis of primary respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice." J Med Virol **62**(2): 257-266.
- Walsh, J. J., L. F. Dietlein, et al. (1961). "Bronchotracheal response in human influenza. Type A, Asian strain, as studied by light and electron microscopic examination of bronchoscopic biopsies." Arch Intern Med **108**: 376-388.
- Wedzicha, J. A. (2004). "Role of viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease." Proc Am Thorac Soc **1**(2): 115-120.
- Wilkinson, T. M., G. C. Donaldson, et al. (2006). "Respiratory syncytial virus, airway inflammation, and FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **173**(8): 871-876.
- Xiao, B. G., G. X. Zhang, et al. (1996). "Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1)-mediated inhibition of glial cell proliferation and down-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) are interrupted by interferon-gamma (IFN-gamma)." Clin Exp Immunol **103**(3): 475-481.