



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA MULTIPLICACIÓN DEL VIRUS SINCICIAL
RESPIRATORIO EN MACRÓFAGOS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

KENYA MASSIEL MALDONADO PÉREZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. BEATRÍZ GÓMEZ GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO
FES IZTACALA, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2014



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA MULTIPLICACIÓN DEL VIRUS SINCICIAL
RESPIRATORIO EN MACRÓFAGOS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

KENYA MASSIEL MALDONADO PÉREZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. BEATRÍZ GÓMEZ GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO
FES IZTACALA, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2014

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 01 de septiembre de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **MALDONADO PÉREZ KENYA MASSIEL** con número de cuenta **513014545**, con la tesis titulada **"EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA MULTIPLICACIÓN DEL VIRUS SINCITIAL RESPIRATORIO EN MACRÓFAGOS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. BEATRÍZ GÓMEZ GARCÍA**:

Presidente: DRA. VICTORIA EUGENIA CHAGOYA HAZAS
Vocal: DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ
Secretario: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
Suplente: DRA. BLANCA LILIA BARRÓN ROMERO
Suplente: DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 03 de octubre de 2014

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de crecer intelectualmente y por el apoyo que me fue otorgado durante mis estudios de maestría para asistir a congresos y realizar una estancia de investigación en Boston University, Massachusetts.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría con el numero de convenio 480278/280509.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA) por la beca otorgada para la finalización de los estudios de maestría con clave de proyecto IN215913.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo brindado al proyecto IN215913 al cual pertenece mi trabajo de investigación.

A la Dra. Beatriz Gómez García por ser mi mentora, mi guía y mi apoyo en todo este tiempo; por cuestionarme, retarme intelectualmente y después escuchar mis propuestas. Por alentarme a cumplir mis sueños y por ayudarme a mover cielo, mar y tierra para conseguir todo lo que necesitaba para llevar a cabo mi trabajo experimental. Sin duda, sin usted no habría logrado posicionarme en dónde me encuentro ahora. ¡Gracias!.

A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta y al Dr. Santiago Martínez Calvillo por su valiosa colaboración en mi desarrollo profesional, por hacerme ver mis errores; por cuestionarme y por su honestidad. Sin su apoyo constante no habría llegado hasta aquí. ¡Gracias!.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis papás Paty y Chava, por haberme impulsado desde pequeña a cumplir mis metas, por transformarme en una persona curiosa y con sed de aprendizaje, por apoyarme y por hacer hasta lo imposible por brindarme una mejor calidad de vida. Por su paciencia, sus abrazos y sonrisas, por ser fuente de inspiración en muchos aspectos de mi vida y por todo el amor que me dan. ¡Los amo, sin ustedes ni estaría en donde me encuentro ahora, ni sería ni la mitad de lo que soy!

A mi hermana Marce por abrirme los ojos a la investigación, por estar siempre para mí cuando la necesito; por su paciencia, sus enseñanzas, sus travesuras y por hacerme reír hasta en momentos inoportunos. Estoy segura de que mi vida siempre ha sido maravillosa por el simple hecho de tenerla a ella como hermana.

A Andrei por haberse convertido en mi hermano y en parte importante de mi vida, por escucharme cuando necesitaba consuelo; por los consejos que han mejorado mi vida en muchísimos aspectos y por esas carcajadas que le salen del alma.

A ambos porque sin ustedes, literalmente, no sabría en donde estaría ahora, y porque seguramente no sería ni la mitad de feliz de como soy con ustedes.

A mi Toño, por haber llegado a mi vida en el momento correcto, por llenar mis días de luz; por intentar entenderme y poner todo su empeño para ayudarme a crecer. ¡Te amo inmensamente!

A mi querido señor Demóstenes por esperarme pacientemente cada semana y por la forma en la que me recibe cuando llego a casa. Amiguito, sin tus ladridos no habría sido tan feliz como soy.

A mis abuelos, tíos, primos (familia en general) y amigos por apoyarme e interesarse en mi formación académica y por todas las veces que expresaron cuán orgullosos están de mí. ¡No los defraudaré!

A Clau, Mali, Andrés, Gil y Daniel por hacer más amena mi vida, por creer en mí y por entender cuando muchas veces cambié las salidas por tardes en el laboratorio ¡Ustedes le dan vida y luz a mi mundo!

Al M. en C. Carlos Santiago Olivares por enseñarme todo lo que sé sobre el trabajo en laboratorio, por ser mi mentor y amigo, por los consejos, los regaños y por tener la paciencia para trabajar conmigo y soportarme día con día.

A Los Drs. Evelyn Rivera, Jorge Gaona y Elizabeth Castillo, por los consejos y sugerencias, por tomarse el tiempo para discutir mi investigación y ayudarme a descubrir detalles importantes; por darme luz cuando no sabía como seguir. Por las risas, las tardes de platicas interminables y por el simple hecho de poder compartir una buena taza de café.

A Laura y Guillermo por permitirme ayudarles y transmitirles aunque sea un poquito de conocimiento y por romperme la rutina con sonrisas.

Al señor Margarito por que siempre me recibe con una sonrisa enorme y por su eficiencia. Gracias, sin usted no tendría tiempo para terminar todo mi trabajo experimental.

A la Dra. Rachel Fearnls de Boston University, por abrirme las puertas de su casa y de su laboratorio; por creer y confiar en mí y por ayudarme a vivir la experiencia de trabajar y vivir en otro país. A Chris y Asher Stebbins por recibirme con sonrisas al regresar del trabajo y por mostrarme una dinámica familiar completamente distinta a la que estoy acostumbrada.

A Sarah Shearer y Jie Yang por ayudarme a adaptarme a un ambiente de trabajo completamente distinto, por los consejos, las risas y por hacer el papel de guía turística.

DEDICATORIAS

Para todo aquel que ame la ciencia, el conocimiento y la vida tanto como yo; para los que luchan y se superan día con día; para los que siguen sus sueños y cumplen sus metas.

Para Toño, Paty, Chava, Marce y Andrei, porque vieron en mi el coraje que yo pensé que no tenía, porque con amor y paciencia me alentaron todos los días y porque nunca dejaron de creer en mi.

Para Estela, por el alma que ella dejó en guardia permanente, como una lucecita encendida en mi casa, en mi corazón y porque sé que desde donde esté, estará orgullosa de mí.

Para mis amigos y colegas en el laboratorio, en especial a la Dra. Bety Gómez, porque ellos constituyeron la base de mi crecimiento; por hacer todo más ameno y por todas las risas.

Para ti, que te tomaste el tiempo de leer esto.

Y para mí...

ÍNDICE

1	Abreviaturas.....	1
2	Lista de figuras y tablas.....	3
3	Resumen.....	5
4	Abstract.....	7
5	Introducción.....	9
5.1	Virus sincitial respiratorio.....	9
5.1.1	Aspectos epidemiológicos y clínicos de la infección.....	9
5.1.2	Aspectos moleculares del virus.....	10
5.1.3	Replicación del VSR.....	14
5.1.4	Infección de macrófagos con VSR.....	16
5.1.5	Respuesta inmune a la infección por VSR.....	17
5.1.6	Infecciones persistentes.....	18
5.2	Óxido nítrico.....	20
5.2.1	Aspectos generales.....	20
5.2.2	Generación de especies reactivas de nitrógeno.....	21
5.2.3	Donadores de óxido nítrico.....	26
6	Antecedentes.....	28
7	Justificación.....	31
8	Hipótesis.....	32
9	Objetivos.....	32
9.1	Objetivo general.....	32
9.2	Objetivo particular.....	32
10	Materiales y métodos.....	33
10.1	Lineas celulares.....	33
10.2	Virus.....	33
10.3	Caracterización del sistema.....	34
10.4	Propagación viral.....	34
10.4.1	Titulación viral.....	35
10.5	Sobreproducción e inhibición de nitritos.....	35

10.5.1	Determinación de nitritos.....	36
10.6	Viabilidad celular.....	37
10.7	Cuantificación del genoma viral.....	37
10.7.1	Extracción de RNA.....	37
10.7.2	Determinación de la integridad de RNA.....	38
10.7.3	Cuantificación del genoma viral.....	38
10.7.4	Diseño de oligonucleótidos.....	39
10.7.5	Retrotranscripción.....	39
10.7.6	Amplificación de cDNA.....	40
10.8	Confirmación del efecto de SNAP en la replicación del HRSV por Northern blot.....	40
10.9	Análisis de Proteínas.....	43
10.9.1	Extracción de proteínas.....	43
10.9.2	Cuantificación de proteínas ASSAY DC modificado de Lowry.....	43
10.9.3	Western Blot.....	43
10.10	Análisis de antígeno viral en macrófagos persistentes.....	44
10.11	Ensayo de infectividad del virus.....	45
10.12	Determinación de partículas defectivas por interferencia con la replicación del virus silvestre.....	45
10.13	Efecto del SNAP en infecciones agudas.....	45
10.14	Análisis estadístico.....	46
11	Resultados.....	47
11.1	Caracterización del sistema.....	47
11.2	Determinación del efecto del NO endógeno en la multiplicación del HRSV en macrófagos infectados persistentemente.....	47
11.3	Viabilidad celular.....	50
11.4	Determinación del efecto del NO exógeno en la multiplicación del HRSV en macrófagos infectados persistentemente.....	51
11.5	Determinación de la expresión de la proteína NOS II.....	54
11.6	Análisis de la expresión del antígeno viral.....	55

11.7	Titulación del virus infeccioso presente en sobrenadantes.....	57
11.8	Determinación de la presencia de partículas defectivas en el sobrenadante.....	59
11.9	Determinación del efecto del NO exógeno en infecciones agudas.....	62
12	Discusión.....	64
13	Conclusiones.....	75
14	Perspectivas.....	75
15	Referencias.....	76

ABREVIATURAS

aRNA	Ácido ribonucleico antigenómico
BH₄	Tetrahidrobiopterina
CX3C	Fractalina
DC-SIGN	Molecula de adhesión intercelular diferente a integrina específica de células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eIF-2α	Factor de iniciación de la fosforilación de serina 51
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
F	Proteína de fusión del virus sincitial respiratorio
FAD	Flavin adenin dinucleótido
Fas	Proteína de iniciación de apoptosis
FMN	Flavin mono nucleótido
G	Proteína de unión del virus sincitial respiratorio
GE	Señal de terminación del gen
gRNA	Ácido ribonucleico genómico
GS	Señal de inicio del gen
GSNO	S-nitroso glutatión
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HiNT	<i>Haemophilus influenzae</i> no tipificable
HOCl	Hipoclorito
HRSV	Virus sincitial respiratorio humano
ICAM-1	Molecula de adhesión intercelular
IL-	Interleucina (1, 6, 8, 1 β , etc)
INF	Interferón (α , β , γ , etc)
IRA	Infecciones respiratorias agudas
IRF	Factor regulador de interferón
L	Polimerasa del virus sincitial respiratorio
Le	Región extragenética líder del genoma
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
LTA	Ácido lipotenónico
M	Proteína de envoltura del virus sincitial respiratorio
M2-1	Factor de antiterminación del virus sincitial respiratorio
M2-2	Proteína involucrada en la transcripción y replicación del virus sincitial respiratorio
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos
MIP-1α	Proteína inflamatoria de macrófagos
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MϕA	Macrófagos infectados agudamente con virus sincitial respiratorio

MϕN	Macrófagos sin infectar
MϕP	Macrófagos infectados persistentemente con virus sincitial respiratorio
N	Proteína de la nucleocápside del virus sincitial respiratorio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
NF-κB	Factor de transcripción nuclear κ B
NO	Óxido nítrico
NO₂	Dióxido de nitrógeno
NOS	Óxido nítrico sintasa (n-neuronal, e-endotelial, i-inducible)
NS1	Proteína no estructural 1 del virus sincitial respiratorio
NS2	Proteína no estructural 2 del virus sincitial respiratorio
O₂	Oxígeno singulete
ONOO-	Peroxinitrito
P	Fosfoproteína del virus sincitial respiratorio
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
PKR	Proteína cinasa R
PPRs	Receptor de reconocimiento de patrones
RANTES	Quimiocina regulada por activación, espresada y secretada por células T
RIG-1	Proteína inducible por ácido retinóico
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa
SH	Proteína hidrofóbica del virus sincitial respiratorio
SNAP	S-Nitroso-N acetil-DL-penicilamina
STAT	Proteína señal de la transducción y transcripción
TARC	Quimiocina regulada por activación en timocitos
TGF-β	Factor de crecimiento tumoral
TLRs	Receptores tipo toll (3, 4, etc)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral
Tr	Región extragénica tráiler del genoma
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Introducción

Aspectos moleculares del virus

Fig. 1	Genoma viral y proteínas codificantes.....	10
Fig. 2	Estructura del HRSV.....	11

Replicación del HRSV

Fig. 3	Replicación del HRSV.....	15
--------	---------------------------	----

Generación de especies reactivas de nitrógeno

Fig. 4	Síntesis de Óxido nítrico.....	21
Tabla 1	Isoformas de NOS.....	22
Fig. 5	Representación esquemática de las isoformas de NOS.....	23
Tabla 2	Agentes que estimulan o inhiben la expresión de NOS.....	25

Donadores de óxido nítrico

Fig. 6	Estructura de Tioles y S-Nitrosotioles.....	26
--------	---	----

Antecedentes

Fig. 7	Expresión del antígeno del HRSV en macrófagos persistentes.....	30
Fig. 8	Expresión del gen N del HRSV en macrófagos persistentes.....	30

Resultados

Caracterización del sistema

Fig. 9	Caracterización del sistema.....	47
--------	----------------------------------	----

Determinación del efecto del óxido nítrico en la multiplicación del HRSV en macrófagos infectados persistentemente

Fig. 10	Determinación del efecto del óxido nítrico endógeno.....	48
Fig. 11	Determinación de la concentración de nitritos.....	49

Viabilidad celular

Fig. 12	Determinación de la viabilidad celular.....	50
---------	---	----

<u>Determinación del óxido nítrico exógeno en la multiplicación del HRSV en macrófagos infectados persistentemente</u>	
Fig. 13	Determinación de la integridad del RNA total..... 51
Fig. 14	Determinación del numero del copias del gen N..... 52
Fig. 15	Determinación del numero de copias del mRNA del gen L..... 53
Fig. 16	Confirmación del efecto del óxido nítrico en la multiplicación del HRSV. 54
<u>Determinación de la expresión de la proteína NOS II</u>	
Fig. 17	Determinación del efecto del donador en la expresión de la NOS II..... 55
<u>Análisis de la expresión del antígeno viral</u>	
Fig. 18	Determinación del efecto del donador en la expresión del antígeno viral..... 56
<u>Titulación del virus infectivo presente en el sobrenadante</u>	
Fig. 19	Titulación del virus infectivo extracelular..... 57
<u>Determinación de la presencia de partículas virales defectivas en el sobrenadante</u>	
Fig. 20	Determinación de la generación de partículas virales defectivas. 60
<u>Determinación del efecto del óxido nítrico exógeno en infecciones agudas</u>	
Fig. 21	Determinación del efecto del óxido nítrico exógeno en infecciones agudas..... 63

RESUMEN

El virus sincitial respiratorio (HRSV) se considera como el agente causal más importante de enfermedades del tracto respiratorio en infantes a nivel mundial; problemas respiratorios crónicos y recurrentes posteriores a la infección se han asociado con la posible persistencia del virus. La producción de óxido nítrico (NO), un radical libre altamente reactivo, actúa como un componente importante de la respuesta inmune del huésped en muchas infecciones virales agudas y es considerado como un efector antiviral de algunos virus de DNA y RNA. El propósito de este estudio fue examinar los efectos del NO endógeno y exógeno en el nivel de multiplicación del HRSV en una línea celular de macrófagos infectada persistentemente (M ϕ P). La producción endógena de NO se estimuló por medio de la infección con la bacteria *H. influenzae* no tipificable, mientras que la producción exógena de NO se promovió usando el donador S-Nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP). La carga viral se determinó por medio de RT-PCR en tiempo real; de igual forma se evaluó el efecto del donador de NO en la carga viral en infecciones agudas; mediante Western blot se evaluó si la presencia del donador en los cultivos persistentes afecta la expresión de la proteína NOS II y por Citometría de flujo se analizó tanto la expresión de proteínas virales como la presencia de virus infectivo extracelular posterior a los tratamientos y la presencia de partículas virales defectivas en los sobrenadantes de los cultivos. Los resultados muestran que el NO endógeno, posiblemente en conjunto con otros factores celulares producidos por la presencia de la bacteria, reduce el número de copias del genoma del HRSV. El NO exógeno, contrario a lo esperado, incrementa el número de copias del HRSV tanto en infecciones persistentes como agudas, pero este incremento no se ve reflejado en cambios en la producción de proteínas virales ni virus infectivo extracelular. Aunque, cuando las células no infectadas son tratadas con los sobrenadantes de los cultivos persistentes que contienen el donador, la eficiencia de infección con HRSV silvestre se reduce, lo cual sugiere la generación de partículas virales defectivas y/o la producción de otros factores celulares solubles que afectan la replicación viral. Por otro lado, la presencia del

donador no afecta la expresión de la proteína NOS II, pero sí afecta la viabilidad celular a medida que se incrementa la concentración. Éstas y otras evidencias sugieren que el incremento en la concentración del NO ocasionado por el donador, conlleva a un estado oxidante que tiene como consecuencia la desregulación de la homeostasis celular, lo que favorece la replicación viral aunque sin la generación de partículas infecciosas.

ABSTRACT

Respiratory syncytial virus (RSV) is considered as the most important causative agent of respiratory tract illnesses in children worldwide; chronic and recurrent respiratory problems after infection have been associated with the possible persistence of the virus. The production of nitric oxide (NO), a highly reactive free radical, acts as an important component of the host immune response in many acute viral infections and is considered as an antiviral effector of some DNA and RNA viruses. The purpose of this study was to examine the effects of endogenous and exogenous NO on the level of multiplication of RSV in a persistently infected (MφP) macrophage cell line. The endogenous production of NO was stimulated by infection with the non-typeable *H. influenzae* bacteria, whereas exogenous NO production was promoted by using the donor S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP). The viral load was determined by RT-PCR in real time; similarly the effect of NO donor in the viral load in acute infection was evaluated; By Western blot we assessed whether the presence of the donor in the persistent cultures affects the expression of NOS II protein and by flow cytometry viral protein expression, presence of extracellular infectious virus post-treatment and the presence of defective virus particles in the culture supernatants was analyzed. The results show that the endogenous NO, possibly together with other cellular factors produced by the presence of bacteria, reduces the copies of the RSV genome. Exogenous NO, contrary to expectations, increases the number of copies of RSV in both persistent and acute infections, but this increase is not reflected in the production of viral proteins or extracellular infectious virus. Although, when the uninfected cells are treated with supernatants from persistent cultures containing the donor, the efficiency of infection with wild RSV decreases, suggesting the generation of defective viral particles and/or the production of other soluble cell factors that affect viral replication. Furthermore, the presence of the donor does not affect the expression of NOS II protein, but does affect cell viability as the concentration increases. These and other evidences suggest that the increased concentration of NO caused by the donor, leads to an oxidizing condition that

results in the deregulation of cell homeostasis, which promotes viral replication but not the generation of infectious viral particles.

INTRODUCCIÓN

VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO

Aspectos Epidemiológicos y clínicos de la infección

El virus sincicial respiratorio (HRSV) fue aislado por primera vez en 1955 de un chimpancé que padecía enfermedad del tracto respiratorio superior (Morris *et al.*, 1956) y fue rápidamente identificado como virus que infecta humanos, demostrando además ser un importante patógeno respiratorio a nivel pediátrico (Chanock y Finberg, 1957; Chanock *et al.*, 1957). Actualmente, el virus sincicial respiratorio está considerado a nivel mundial como uno de los principales patógenos causantes de infecciones severas del tracto respiratorio inferior que requieren hospitalización y son la principal causa de morbilidad y mortalidad en niños menores de 2 años (Hall *et al.*, 2009; Nair *et al.*, 2010).

En México, datos epidemiológicos reportan a las infecciones respiratorias, sin considerar la etiología, entre las tres primeras causas de muerte infantil a nivel nacional (Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica, 2002; Sistema nacional de información en salud, 2000-2008; Organización Mundial de la Salud, 2012). En el 2009 se reportaron 2 694 871 casos de infecciones respiratorias agudas (IRA) en niños menores de 1 año, de los cuales, 24 932 casos fueron de neumonías y bronconeumonías; mientras que en niños de 1 a 4 años se reportaron 6 417 828 casos de IRA y 32 614 casos de neumonías y bronconeumonías (Compendio de anuarios de morbilidad, 1984-2009).

La infección por este virus se presenta principalmente en niños entre las 6 semanas y los nueve meses de edad; origina síntomas respiratorios del tracto respiratorio superior (flujo nasal, estornudo, faringitis y malestar en general). Sin embargo, entre el 25 y 40% de estas infecciones tiene una evolución hacia el tracto respiratorio inferior, cuyas principales manifestaciones son bronquiolitis y neumonía (Collins *et al.*, 2001; Muller-Pebody *et al.*, 2002). La infección por HRSV en adultos es común, en personas mayores de 60 años y en pacientes

inmunocomprometidos llega a presentarse en forma severa; la mortalidad asociada a neumonía en estos casos puede ser muy alta (80-100%) (Han *et al.*, 1999).

Aspectos Moleculares del Virus

El HRSV pertenece al orden de los *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae*, género *Pneumovirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses). Es un virus envuelto, de ácido ribonucleico (RNA) de una sola cadena no segmentada, en sentido negativo y posee aproximadamente de 15 191 a 15 385 nucleótidos (nts) que conforman 10 genes que codifican 11 proteínas; 9 de las cuales son estructurales (N, P, M, SH, G, F, M2-1, M2-2 y L) y 2 son no estructurales (NS1 y NS2); además contiene una pequeña región extragénica líder en el extremo 3' y una región trailer 5' (Fig. 1). Cada gen se transcribe en diferentes RNA mensajeros (mRNA) poliadenilados y cada uno codifica para una sola proteína viral, excepto en el caso del mRNA de M2, que contiene dos marcos abiertos de lectura superpuestos expresados por un mecanismo ribosomal de parada-arranque generando dos proteínas diferentes, la M2-1 y la M2-2 (Gould *et al.*, 2007).

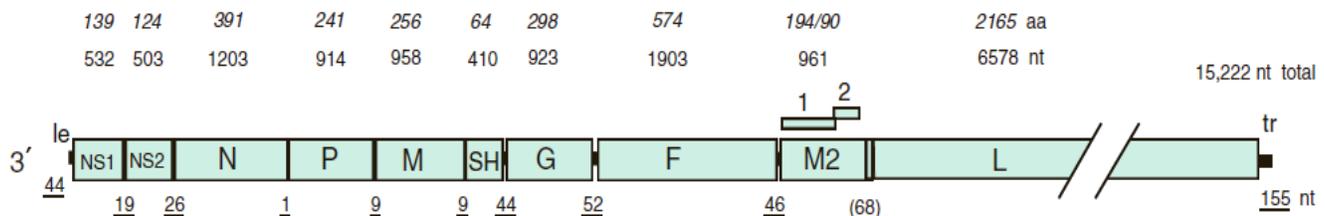


Fig. 1 Genoma Viral y proteínas codificantes. El genoma de polaridad negativa es representado en sentido 3' a 5' mostrando las regiones extragénicas 3' líder (le) y 5' tráiler (tr) y los 10 genes virales que se expresan como mRNA separados. Las proteínas M2-1 y M2-2 tienen marcos de lectura abiertos del mRNA que se traslapan. Los genes M2 y L se traslapan ligeramente, y L se expresa por retroceso de la polimerasa. En la parte superior se muestra la cantidad de aminoácidos y nucleótidos que conforman cada una de las proteínas. Los números subrayados corresponden a la cantidad de nucleótidos que conforman las regiones intergénicas. Entre paréntesis se muestra el número de nucleótidos que se traslapan entre las proteínas M2 y L (Tomado y modificado de Collins *et al.* 2013).

Al inicio de cada gen, se encuentra una secuencia de 10 nts (“gene start”, GS), altamente conservada 3'-CCCCGUUUA, excepto para el gen L cuya señal es 3'-CCCUGUUUUA. Cada gen termina con una secuencia semiconservada 12-13 nts (“gene end”, GE) que dirige la señal de poliadenilación y la liberación del mRNA. Los primeros 9 genes están separados por regiones intergénicas. Los dos últimos genes se traslapan por 68 nts; la secuencia de GS de L se encuentra dentro del gen M2 (Fearnis *et al.*, 2000).

Los viriones del HRSV que se producen en cultivo celular consisten en partículas pleomórficas que tienen un diámetro entre 100 y 350 nanómetros (nm), similar a los otros paramixovirus y filamentos largos de 60 a 200 nm de diámetro y hasta 10 micrómetros (µm) de longitud (Jeffrey *et al.*, 2003). El virión contiene una doble capa lipídica, la cual deriva de la membrana plasmática de la célula hospedera; esta envoltura contiene 3 glicoproteínas virales, la de la unión a la célula (G), la de fusión (F) y una pequeña proteína hidrofóbica (SH) cuya función aun no está clara. Cubriendo a la nucleocápside se encuentra la proteína de matriz (M) y formando la nucleocápside están las proteínas N (nucleoproteína), P (fosfoproteína), L (polimerasa) y M2-1 (factor de anti-terminación) (Fig. 2).

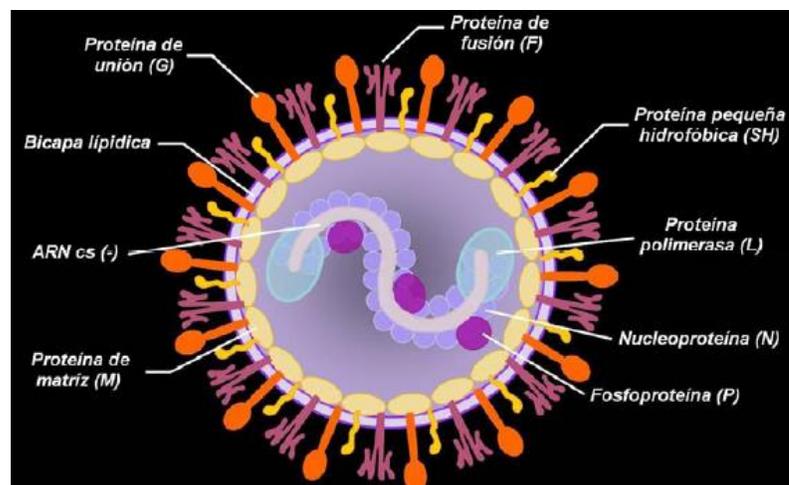


Fig. 2 Estructura del HRSV. Virión del HRSV mostrando las principales proteínas estructurales (Tomado y modificado de Cowton *et al.*, 2006).

De manera particular, se ha demostrado que la proteína G, de 298 aminoácidos (aa), también participa en la evasión de la respuesta inmune ya que contiene un motivo CX3C que mimetiza la función del receptor CXCR3, lo que reduce el influjo de células de respuesta inmune a los pulmones de ratones infectados con HRSV (Tripp *et al.*, 2001). Además, la forma secretada de la proteína interfiere con la neutralización mediada por anticuerpos (Bukreyev *et al.*, 2008), y se ha especulado que mimetiza al receptor de TNF- α , lo que podría inhibir los efectos antivirales de dicha citocina (Langedijk *et al.*, 1998). También se ha demostrado que G puede interactuar con DC-SIGN en células dendríticas humanas y alterar vías de señalización asociadas con la presentación de antígeno (Johnson *et al.*, 2012). Finalmente, el dominio central conservado de G inhibe la activación de diversos TLRs, incluyendo TLR-4, contrarrestando el efecto de la proteína F (Polack *et al.*, 2005).

Con base en la diversidad genética de la glicoproteína G, el HRSV se divide en dos grupos, A y B. La secuencia completa del genoma de los subtipos A y B tiene el 81% de homología; la divergencia más grande se encuentra en el ectodominio de la proteína G, la cual tiene el 44% de identidad entre los dos subgrupos. Dentro de un mismo subgrupo, la secuencia de aminoácidos de la proteína G puede variar hasta en un 20%. Estos dos grupos circulan en la población en una misma epidemia, siendo el de mayor prevalencia el grupo A; sin embargo, la severidad de la enfermedad no se asocia preferentemente con alguno de los tipos virales en particular (Collins *et al.*, 2001).

La proteína F de 574 aa, como se mencionó anteriormente, dirige tanto la fusión del virus con la célula hospedera como la fusión de las células infectadas con células vecinas para formar sincitios. Además esta proteína se une a TLR-4 lo que inicia la transducción de señales y la respuesta inmune (Haynes *et al.*, 2001).

Se ha observado que SH (64 aa) forma estructuras pentaméricas similares a poros que le confieren actividad similar a canales catiónicos (Carter *et al.*, 2010; Gran *et al.*, 2012), aunque el significado de esto en HRSV no está claro. También

se ha reportado que SH puede reducir la apoptosis pero el efecto es muy bajo (Fuentes *et al.*, 2007), además parece que SH puede inhibir la vía de señalización de la citocina antiviral TNF- α (Fuentes *et al.*, 2007). Sin embargo, el HRSV recombinante que carece de la proteína SH puede replicarse más eficientemente *in vitro* que el HRSV nativo y se mostró ligeramente más atenuado en ratones y chimpancés (Whitehead *et al.*, 1999).

M es una proteína de 256 aa que juega un papel clave en la morfogénesis de los viriones. En etapas tempranas de la infección se detecta en el núcleo y parece ser responsable de la inhibición de la transcripción de genes del huésped durante la infección por HRSV y en etapas tardías, se encuentra asociada a cuerpos de inclusión y membrana plasmática (Ghildyal *et al.*, 2006).

La proteína N de 391 aminoácidos que conforma la nucleocápside, encapsula estrechamente el RNA genómico, lo que probablemente reduce la detección de estos RNA's virales por los receptores tipo Toll (TLRs) de la célula hospedera y la detección intracelular por las helicasas que inician la respuesta inmune innata a través de factores regulatorios de interferón y el factor nuclear κ B (NF- κ B) (Akira *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007). Por otro lado, N se une a la proteína cinasa PKR regulada por RNA de doble cadena, lo que previene que se fosforile eIF-2 α inhibiendo la síntesis de proteínas (Groskreutz *et al.*, 2010).

Por otro lado, la proteína P de 241 aminoácidos es un cofactor esencial para la polimerasa durante la síntesis de mRNA. También actúa como un adaptador que une a las proteínas N, M2-1 y L para mediar las interacciones en el complejo nucleocápside-polimerasa. Además, P se une a los monómeros libres de N y los lleva a los complejos nacientes de genoma/antigenoma, lo que previene la agregación de N o su unión con RNA no viral (Castagne *et al.*, 2004). La sola expresión de N y P es suficiente para la formación de los cuerpos de inclusión virales, que son estructuras citoplásmicas densas que se cree que son los sitios de síntesis de RNA viral (Castagne *et al.*, 2004) y parece participar en la

disociación de la proteína M de la nucleocápside durante el desnudamiento para iniciar la infección (Asenjo *et al.*, 2008).

La proteína L es la más grande, contiene 2 165 aminoácidos; es muy similar en longitud a las proteínas homólogas de otros paramixovirus. Algunos segmentos específicos se conservan dentro y más allá de los mononegavirales que se cree que representan dominios catalíticos que participan en la polimerización. El análisis de mutantes de HRSV ha proporcionado la identificación preliminar de regiones funcionales, incluyendo un dominio de polimerización (Fix *et al.*, 2011), un sitio putativo de unión a nucleótidos involucrado en el “capping” (Liuzzi *et al.*, 2005), así como los residuos que afectan a la eficiencia de reconocimiento de señales de paro (Cartee *et al.*, 2003).

M2-1 y M2-2 son factores involucrados respectivamente en la transcripción y en la modulación del balance entre la transcripción y replicación de RNA (Fearnly y Collins, 1999; Bermingham y Collins, 1999). Es tentador especular que una reducción en los niveles de la M2-1 puede facilitar la infección persistente por regulación de la expresión de la mayoría de los genes virales, aunque manteniendo una cierta expresión NS1 y NS2 de los antagonistas de defensa del huésped. Las proteínas no estructurales NS1 y NS2 pueden estar involucradas en la modulación de la transcripción puesto que sus transcritos se sintetizan al inicio de la infección y se acumulan en células infectadas, además se ha reportado que interfieren con la actividad del interferón (Bossert y Conzelmann, 2002).

Existen versiones animales del HRSV incluyendo RSV bovino, ovino y pneumonia virus de ratón, lo que sugiere que el salto entre especies ocurrió durante la evolución de estos virus; sin embargo, no existe ningún reservorio animal para el RSV humano.

Replicación del HRSV

La replicación del RNA del HRSV comienza con la unión de la polimerasa viral a la región promotora ubicada dentro de la secuencia líder (Le) en el extremo

3' del genoma viral. De manera interesante, la polimerasa viral es capaz de ignorar las secuencias de inicio y paro de la transcripción y de esta manera sintetiza un RNA de polaridad positiva denominado antigenoma (aRNA), que al igual que el genoma (gRNA), carece de las secuencias “cap” o poli A en las regiones 5' y 3' (Fig. 3) (Cowton *et al.*, 2006). Posteriormente, el aRNA funciona como templado para la síntesis de gRNA. A diferencia del RNA mensajero (mRNA) que es liberado “desnudo”, tanto el gRNA como el aRNA, al ser liberados se asocian con la nucleoproteína del virus (N) para formar nucleocápsides estables. La encapsidación protege al RNA de la degradación y evita el reconocimiento por parte de la célula hospedera (Cowton *et al.*, 2006).

En el caso de la transcripción, la polimerasa viral nuevamente se une a la región promotora del gRNA y continua transcribiendo hasta encontrar una señal de paro; una vez identificada la señal de paro, la polimerasa realiza la poliadenilación y liberación del mRNA. Posteriormente, aún sin dissociarse del templado, la polimerasa reinicia la síntesis de mRNA al identificar una nueva secuencia de inicio del siguiente gen (Cowton *et al.*, 2006).

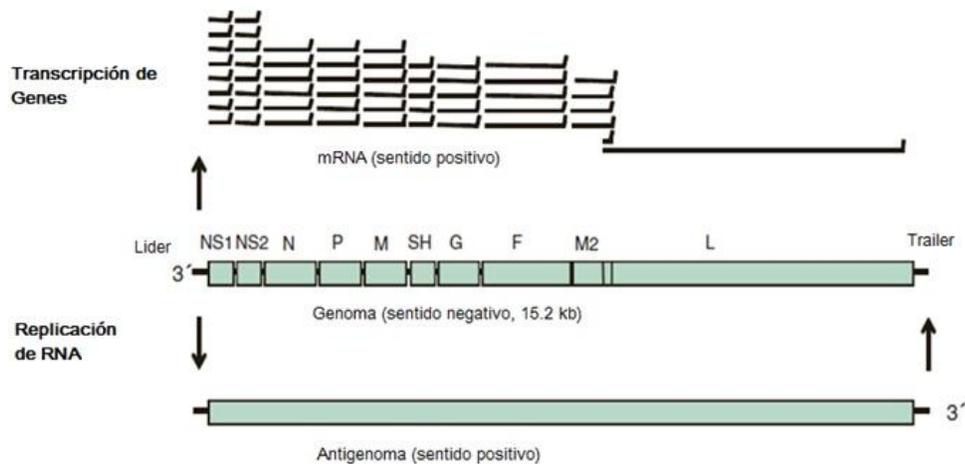


Fig. 3 Replicación del HRSV. El HRSV se replica sintetizando una cadena complementaria o antigenoma que sirve como templado para la síntesis de la hebra molde. Además, la transcripción ocurre en forma de gradiente. (Tomado y modificado de Cowton *et al.*, 2006).

Dado que solo existe una secuencia promotora de inicio de la replicación/transcripción en el gRNA del HRSV y que la polimerasa tiende a

disociarse del templado en regiones intergénicas, es frecuente obtener un gradiente de expresión génica (Fig. 3), en el que los genes que se localizan más próximos a la región 3' se transcriben en mayor proporción con respecto a los localizados cerca del extremo 5' (Cowton *et al.*, 2006).

Infección de macrófagos con HRSV

Los macrófagos alveolares son la primera línea de defensa contra patógenos inhalados y son los principales fagocitos profesionales en el organismo, para esto expresan receptores que reconocen microorganismos que poseen patrones moleculares asociados a patógenos (Mizgerd, 2008). También cuentan con lisosomas especializados que se fusionan con vesículas fagocíticas recién formadas (fagosomas), exponiendo a los microorganismos fagocitados a una mezcla concentrada de hidrolasas lisosómicas y una descarga de moléculas altamente reactivas que son producidas enzimáticamente como el superóxido (O_2^-), hipoclorito (HOCl), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peroxinitrito (ONOO-), cuyos sustratos más afines son los grupos hemo, grupos tiólicos reducidos, o núcleos prostéticos de Fe-S. Tanto el NO como el O_2^- son potentes mutágenos del DNA, lo que supone un mecanismo adicional en su acción antimicrobiana (Nathan, 1987).

Los macrófagos también son responsables del reconocimiento y remoción de células senescentes, dañadas o muertas en muchos tejidos, y son las únicas células capaces de ingerir microorganismos grandes como los protozoarios (Alberts *et al.* 2002).

Los macrófagos están expuestos al HRSV en el transcurso de la infección y se ha descrito que las partículas virales modifican las funciones de los macrófagos alveolares, lo cual puede contribuir al riesgo de adquisición de infecciones secundarias de tipo bacteriano durante o después de la infección por el virus (Franke-Ullmann *et al.*, 1995; Cirino *et al.*, 1993; Midulla *et al.*, 1993; Franke *et al.*, 1994).

Como se mencionó anteriormente, además de su capacidad de fagocitosis frente a patógenos, el macrófago presenta una gran actividad como célula secretora, pues libera una gran variedad de sustancias, participando en múltiples procesos biológicos entre los que se encuentran el crecimiento celular y la citotoxicidad. Debido a su abundancia, distribución, motilidad y capacidad de respuesta, los macrófagos pueden influir en cada aspecto de la respuesta inmune e inflamatoria (Nathan, 1987).

Respuesta inmune a la infección por HRSV

El HRSV se considera como un potente estimulador de la expresión y/o secreción de mediadores proinflamatorios e inmunomoduladores. Se ha demostrado que en la infección de las células epiteliales por HRSV (y en otros tipos celulares como monocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos), se induce la expresión de diversos factores incluyendo citocinas y quimiocinas como TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, RANTES, MIP-1 α , MCP-1, TARC e INF- β , entre otros (Noah y Becker, 1993; Stark, 2000), así como receptores proteicos como ICAM-1 y Fas (Chini *et al.*, 1998; O'Donnell *et al.*, 1999) y otras moléculas de señalización importantes, incluyendo óxido nítrico (NO) (Stark *et al.*, 2005). El control de la expresión de estas moléculas está regulado a nivel transcripcional por factores que son activados después de la infección por HRSV (Mastronarde *et al.*, 1995; Chini *et al.*, 1998).

Evidencia reciente sugiere que el NO es un mediador clave de la inflamación en las vías respiratorias, potencialmente facilitando la compleja interacción de múltiples tipos de células residentes y la migración de células inflamatorias a las vías respiratorias (Ricciardolo, 2003). La relación entre la producción de óxido nítrico y replicación viral se ha documentado en células epiteliales infectadas en forma aguda y células dendríticas infectadas persistentemente. En epiteliales, la producción del NO interfiere en la multiplicación viral; en dendríticas la inhibición del NO endógeno favorece la multiplicación viral (Ali-Ahmad *et al.*, 2003; Hobson y Everard, 2008).

Particularmente, en la etapa inicial de la infección viral, las proteínas de superficie del HRSV, sobre todo la proteína G, se unen a moléculas de glicosaminoglicanos localizadas en la membrana celular del macrófago, que favorecen la adhesión del virión a la célula (Openshaw y Tregoning, 2005). Una vez unido el virus, la proteína F del HRSV es capaz de activar una vía de señalización a través del receptor tipo Toll cuatro (TLR4) en la célula hospedera y generar una respuesta mediada por el factor de transcripción NF- κ B (Kurt-Jones *et al.*, 2000), estimulando la producción de interleucinas 1, 6 y 10, así como del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), entre otras citocinas de tipo proinflamatorio, ocasionando un cuadro clínico de inflamación y obstrucción de las vías aéreas (Haeberle *et al.*, 2002).

Una vez que el genoma del virus se encuentra dentro de la célula, induce una respuesta inmune de mayor magnitud que activa factores de transcripción como STAT y NF- κ B, induciendo la expresión de quimiocinas, citocinas (RANTES, MIP-1 α , IL-8, IFN- α , IFN- β , TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1, TARC, ICAM-1 y Fas) y factores de respuesta como factores que responden a interferón (IRF), tipo 1 y 7 y otras moléculas de señalización importantes incluyendo óxido nítrico, que inician la respuesta antiviral (Liu *et al.*, 2004).

Por otra parte el RNA de doble cadena, generado como intermediario de la replicación viral, puede ser reconocido por otros receptores citoplásmicos como TLR3 y proteínas como la del gen inducible del ácido retinoico (RIG-1) que también participan en la inducción de la respuesta inmune innata a través de la activación de NF- κ B (Rudd *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007).

Infecciones Persistentes

La persistencia por el HRSV en humanos es un área de interés importante debido a que se sospecha de la participación de este virus en procesos de hiperreactividad crónica. Padecimientos como enfermedad obstructiva crónica y dificultad para respirar, se han asociado con bronquitis debida a infección por

HRSV (Piedemonte, 2002). Aunque la persistencia del HRSV en humanos no está claramente demostrada, existen observaciones que lo sugieren como son:

1. Virus de la misma familia establecen infecciones persistentes en humanos (Müller *et al.*, 1995; Álvarez *et al.*, 2004; Thacore and Youngner, 1969).
2. Las constantes reinfecciones en niños y la existencia de reportes que permiten asociar los casos de bronquitis obstructiva crónica, bronquitis recurrente y exacerbaciones de asma con la persistencia del HRSV (Mejias *et al.*, 2004 y 2005; Lukacs *et al.*, 2007; Everard, 2006; Krivitskai *et al.*, 1992 y 1996; Openshaw, 2005; Beckham *et al.*, 2005; Falsey *et al.*, 2006).
3. La persistencia del virus en la nasofaringe de niños asintomáticos y con la enfermedad de Paget (Isaia *et al.*, 1982; Mills *et al.*, 1981, 1984, 1987).
4. HRSV persiste en pacientes con inmunodeficiencias adquiridas (SIDA) y congénitas (Wyde, 1998; Collins *et al.*, 2001; Openshaw, 1995)
5. RNA mensajero viral se ha obtenido de tejido *post-mortem* de niños fallecidos durante los meses en que no se aísla el virus, lo que sugiere que el HRSV persiste en humanos por lo menos en los periodos inter epidémicos puesto que el hombre es el único huésped natural (Cubie *et al.*, 1997).
6. Evidencia *in vivo* de infección persistente por el HRSV en leucocitos de pacientes infantiles que adquirieron al virus en forma natural (Domurat *et al.*, 1985).
7. La persistencia del HRSV se ha establecido *in vivo* e *in vitro* (Hegele *et al.*, 1994; Streckert *et al.*, 1996; Dakhama *et al.*, 1997; Mejias *et al.*, 2008; Baldrige y Senterfit, 1976; Bangham and McMichael, 1986; Iankevich y Drežin, 1977; Fernie *et al.*, 1981; Valarcher *et al.*, 2001)

ÓXIDO NÍTRICO

Aspectos generales

El óxido nítrico (NO) es un radical libre en forma de gas que funciona como vasodilatador y neurotransmisor; también es un mediador de los desordenes fisiopatológicos como “shock” séptico y rechazo de aloinjertos (Moncada *et al.*, 1991). Es relativamente inestable en el ambiente biológico y reacciona mediante vías complejas para producir especies reactivas de nitrógeno (ERN) secundarias y terciarias como peroxinitrito (ONOO⁻) y dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$), sin embargo, ambos productos pueden ser más perjudiciales que el radical NO (Hensley *et al.*, 2000).

En células como macrófagos, linfocitos T y células NK, el NO, afecta la producción de más de veinte citocinas que participan en la respuesta inmune como: IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α y TGF- β entre otros (Bodgan, 2001).

Además el NO desempeña un papel importante como mediador fisiológico durante la inflamación. Ciertos mediadores lipídicos solubles, citocinas y factores de crecimiento incrementan enormemente la síntesis de este radical en respuesta a daño tisular o infección. Sin embargo, tanto en los procesos inflamatorios agudos, como crónicos, una producción excesiva de NO puede resultar tóxica ya que adicionalmente altera por nitrosilación de grupos hidroxilo las funciones de proteínas, interfiere con la actividad enzimática de proteínas con grupos hemo y puentes disulfuro al interaccionar con dominios de hierro (Fe) y azufre (S), promueve desaminación, rompimiento de DNA y apoptosis, así como daño oxidante por la formación de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno, que a su vez pueden actuar como moléculas de señalización celular (Wu *et al.*, 2001).

Generación de especies reactivas de nitrógeno

La generación de especies reactivas de nitrógeno (ERN) por células de mamífero fue descrita por primera vez en 1916 por Mitchell y colaboradores (Mitchell *et al.*, 1916). Las ERN, entre ellas el NO, se producen en diversas células vía la activación de las óxido nítrico sintasas (NOS; EC 1.14.13.39) a partir de L-arginina y oxígeno molecular, utilizando electrones donados por nicotinamina adenina di-fosfato en forma reducida (NADPH). En este proceso enzimático, una molécula de L-arginina, es oxidada en dos ocasiones sucesivas para generar NO y L-citrulina, con la formación intermediaria de N-hidroxi-L-arginina (Aktan, 2004) (Fig. 4). En ausencia de L-arginina y tetrahidrobiopterina (BH₄), la activación molecular de O₂ por NOS resulta en la reducción divalente de O₂ para producir aniones superóxidos ($\cdot\text{O}_2^-$) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Zweier *et al.*, 1988).

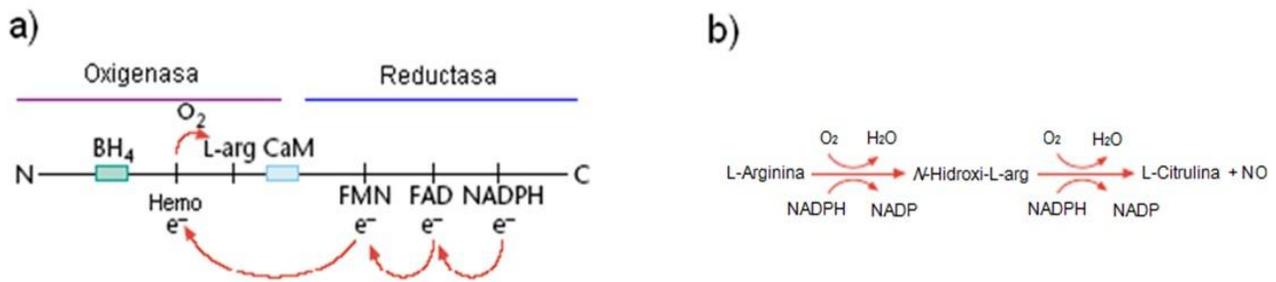


Fig. 4 Síntesis de óxido nítrico (a) Estructura general de la óxido nítrico sintasa (NOS), mostrando los sitios de unión conservados para cofactores y sustratos, así como la transferencia de electrones del dominio de reductasa al dominio de oxigenasa. (b) Reacción general catalizada por la NOS para producir NO, a partir de dos oxidaciones sucesivas de L-arginina, formando como intermediario de la reacción a N-hidroxi-L-arginina (Tomado y modificado de Kenneth 2001).

Se han descrito tres isoformas de NOS que son expresadas en las vías respiratorias y median varias funciones incluyendo la inmunidad innata del huésped (Karupiah *et al.*, 1993). Cada isoforma se origina de un gen diferente (Forstermann *et al.*, 1995; Nathan and Xie, 1994). De acuerdo al modo de activación, las isoformas pueden ser clasificadas en dos grupos: las NOS expresadas de manera constitutiva que son dependientes de Ca²⁺-Calmodulina, originalmente encontradas en neuronas (nNOS, bNOS o NOS1) y células endoteliales (eNOS o NOS3); y la NOS inducible inmunológicamente,

independiente de Ca^{2+} originalmente descubierta en macrófagos (iNOS o NOS2) y cuya expresión está regulada por la transcripción de DNA (Forstermann *et al.*, 1995; Stuehr y Griffith, 1992).

En general, la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la neuronal (nNOS) se expresan bajo condiciones fisiológicas en tejido endotelial y neural respectivamente liberando NO en pequeñas concentraciones en el rango de picomolar y están reguladas a nivel post-traducciona por acilaciones y a nivel funcional por los cambios en los niveles de Ca^{2+} y calmodulina. El óxido nítrico liberado, como se mencionó anteriormente, actúa como mensajero en el sistema nervioso central, inhibe la adhesión y agregación plaquetaria e induce vasodilatación. Por el contrario, la enzima inducible (iNOS), que se expresa en macrófagos, neutrófilos, células endoteliales y células de musculo liso (Akira *et al.*, 2006), es regulada en presencia de factores proinflamatorios como IFN- γ , VEGF y TNF- α (Chesrown *et al.*, 1994; Dembinska-Kiec *et al.*, 1997). Ésta produce la liberación de grandes cantidades de NO, que constituyen un componente esencial de los mecanismos de defensa del organismo (Tabla 1).

Tabla 1
Isoformas de NOS

Isoforma	Otros nombres <small>a</small>	Características	Localización cromosómica	Actividad del ·NO producido
NOS neuronal	nNOS	150-160 kDa.	Cromosoma	Mensajero de SNC
	bNOS	Citosólica y unida a membrana.	12q24.2	Inhibición de agregación plaquetaria
	cNOS	Expresión constitutiva.		
	ncNOS	Dependiente de Ca^{2+} /calmodulina		Vasodilatación
	bcNOS			
	NOS 1	Baja producción de ·NO		
	NOS I	Dominio PDZ N-terminal		
		Prototipo celular: Neuronas		
NOS inducible	iNOS	125-135 kDa	Cromosoma	Mecanismo esencial de defensa del
	macNOS	Predominantemente citosólica	17cen-q11.2	
	hepNOS	Expresión inducible		

	NOS 2	Independiente de		organismo
	NOS II	Ca ²⁺ /calmodulina		
		Alta producción de ·NO		
		Prototipo celular: Macrófagos		
NOS	eNOS	135 kDa	Cromosoma	Mensajero de SNC
endotelial	cNOS	Unida a membrana (caveolas)	7q35-7q36	Inhibición de
	ecNOS	Expresión constitutiva		agregación
	NOS 3	Dependiente de		plaquetaria
	NOS III	Ca ²⁺ /calmodulina		Vasodilatación
		Baja producción de ·NO		
		Miristilación co-traduccionál		
		Palmitoilación Post-traduccionál		
		Prototipo celular: Endotelio		

^a n, neuronal; b, cerebro; e, endotelial; c, constitutiva; i, inducible; mac, macrófago; hep, hepatocito; SNC, sistema nervioso central

Tomado y modificado de Gilbert y Colton 2002.

Todas las isoformas de NOS tienen dos dominios funcionalmente distintos (Fig. 5 Kenneth 2001): El dominio oxigenasa que reside en la región amino terminal y contiene un grupo hemo y los sitios de unión de L-arginina y tetrahidrobiopterina; y el dominio reductasa localizado en la región carbono terminal que además es altamente homólogo a P450 reductasa y contiene los sitios de unión a FAD, FMN, calmodulina y NADPH (Chen *et al.*, 1996; Ghosh *et al.*, 1996; Lowe *et al.*, 1996).

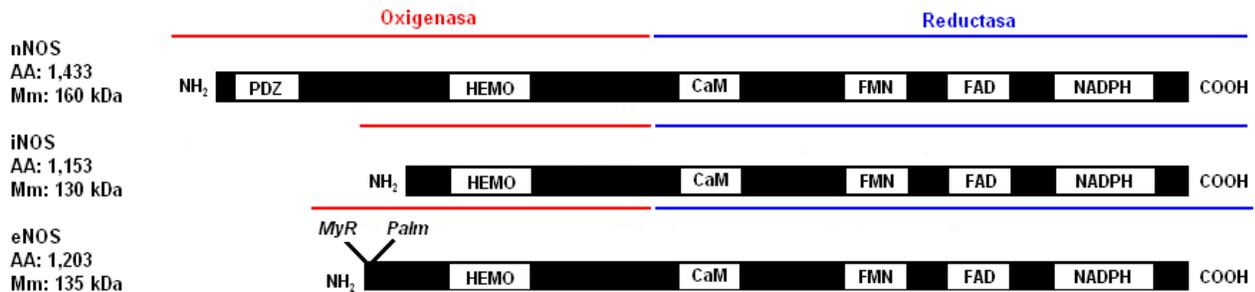


Figura 5. Representación esquemática de las isoformas NOS mostrando la relación de las secuencias de unión consenso para varios cofactores y otras proteínas. n neuronal, i inducible, e endotelial, AA amino ácidos, Mm masa molecular, PDZ región contenedora del sitio de unión a GLGF; CaM secuencia de unión a calmodulina, Myr sitio de miristilación, Palm sitio de palmitoilación (Tomado y modificado de Kenneth 2001).

En su estado activo, las tres isoformas de NOS se encuentran en forma de homodímeros de subunidades que van desde 130 a 160 kDa (Bredt *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 1991; Xie *et al.*, 1992). La unión de calmodulina a las NOS produce un cambio conformacional que permite el flujo de electrones desde el NADPH al FAD, FMN y al grupo hemo (Marletta 1994; Su *et al.*, 1995). La dimerización activa la síntesis de NO al permitir la transferencia de electrones entre los dominios de reductasa y oxigenasa (Siddhanta *et al.*, 1996). El grupo hemo y BH₄ contenidos en el dominio oxigenasa parecen ser esenciales para que ocurra la dimerización (Cho *et al.*, 1995; Klatt *et al.*, 1996). De manera interesante, la L-arginina altera el equilibrio del “spin” del hierro contenido en el grupo hemo, aumentando la oxidación de NADPH y promoviendo el ensamble de las formas activas diméricas de NOS a partir de monómeros inactivos; todas estas acciones pueden proveer la regulación positiva para la síntesis de NO (Sennequier y Stuehr 1996). De manera inversa, el NO puede interferir en el ensamble intracelular de los dímeros de NOS al prevenir la inserción del grupo hemo y disminuir su disponibilidad, un efecto que podría representar un mecanismo de regulación negativa para limitar la actividad de las NOS (Albakri and Stuehr 1996).

En el caso de NOS II, los inductores de su expresión (Tabla 2) activan diferentes vías de señalización que conllevan a la translocación nuclear de varios factores de transcripción, claves en la expresión de NOS II. La región promotora de la iNOS murina contiene sitios de unión para varios factores de transcripción y su expresión óptima depende de dos regiones reguladoras, la región proximal localizada entre las posiciones -48 a -209 pb, que tiene sitios de unión a NF-κB y C/EBP, y la región distal localizada entre -913 y -1029, tiene sitios de unión a los factores de transcripción NF-κB, STAT e IRF. La región distal cumple la función de incrementar la respuesta iniciada por la región proximal, en respuesta a estímulos como LPS o IFN-γ. La unión simultánea de todos los factores de transcripción mencionados, permite el reclutamiento de coactivadores transcripcionales como CBP/p300 y la formación de un complejo transcripcional sinérgico, que promueve una expresión intensa y sostenida de la NOS II (Vila-Del Sol *et al.*, 2007).

Tabla 2

Agentes que estimulan o inhiben la expresión de iNOS

Estimuladores	Inhibidores
<ul style="list-style-type: none"> • Lipopolisacárido bacteriano • Citocinas IL-1β, IL-4, INF-γ, TNF-α • Angiotensina II • Agentes elevadores del AMPc • Plasmina • Hipoxia/Isquemia • Factores de crecimiento: FGF básico/acídico, PDGF, EGF. • Lípido A y análogos • Proteína neurotópica derivada de la Glia S100-β • Estrés oxidante • Sílice • Luz ultravioleta 	<ul style="list-style-type: none"> • Citocinas IL-4, IL-6, IL-10 • TGF-β • Inhibidores de NF-κB: \cdotNO, glucocorticoides, aspirina, inhibidores del proteosoma, pirrolidina, ditiocarbamato, antioxidantes. • Esteroides: aldosterona, progesterona, glucocorticoides (postranscripcional) • Drogas antiinflamatorias no esteroideas. • Péptidos: angiotensina II, trombina, osteoponina. • Factores de crecimiento: FGF básico/acídico, PDGF, EGF. • p53 • Agonistas del receptor de purinas P₂γ • Activadores de PKC • Inhibidores de tirosin cinasa • Inhibidores de proteína fosfatasa 1 y 2A • Antioxidante Rotenona (postranscripcional) • L-Canavanina

Tomado y modificado de Gilbert y Colton 2002.

El factor de transcripción NF- κ B, es el principal inductor de la expresión de NOS II en células murinas (Goldring *et al.*, 1996; Lowenstein *et al.*, 1993; Xie *et al.*, 1994), y humanas (Marks-Konczalik *et al.*, 1998, Taylor *et al.*, 1998), por lo tanto este factor de transcripción es blanco tanto de activadores como de inhibidores de la expresión de NOS II (Gosh *et al.*, 1998).

Uno de los principales supresores de la expresión de NOS II en el sistema murino es el TGF- β , que es capaz de inhibir la expresión de NOS II por varios mecanismos: Afecta la estabilidad del mRNA, inhibe la traducción del mRNA e induce inestabilidad a la enzima sintetizada (Vodovotz *et al.*, 1993).

Adicionalmente otras citocinas inhibidoras de la síntesis del NO como: IL-4, IL-10 e IL-13, pueden actuar de manera sinérgica (Gern *et al.*, 1995).

Donadores de óxido nítrico

Actualmente se han utilizado diversos compuestos químicos como sustitutos en la generación de óxido nítrico, entre ellos se encuentran los S-Nitrosotioles. Estos compuestos poseen una estructura genérica de RSNO y bajo las condiciones apropiadas, liberan óxido nítrico y el disulfuro correspondiente (Ignarro *et al.*, 1981). Los donadores de NO más utilizados son S-nitrosoglutación (GSNO) y S-Nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP) (Fig 6)

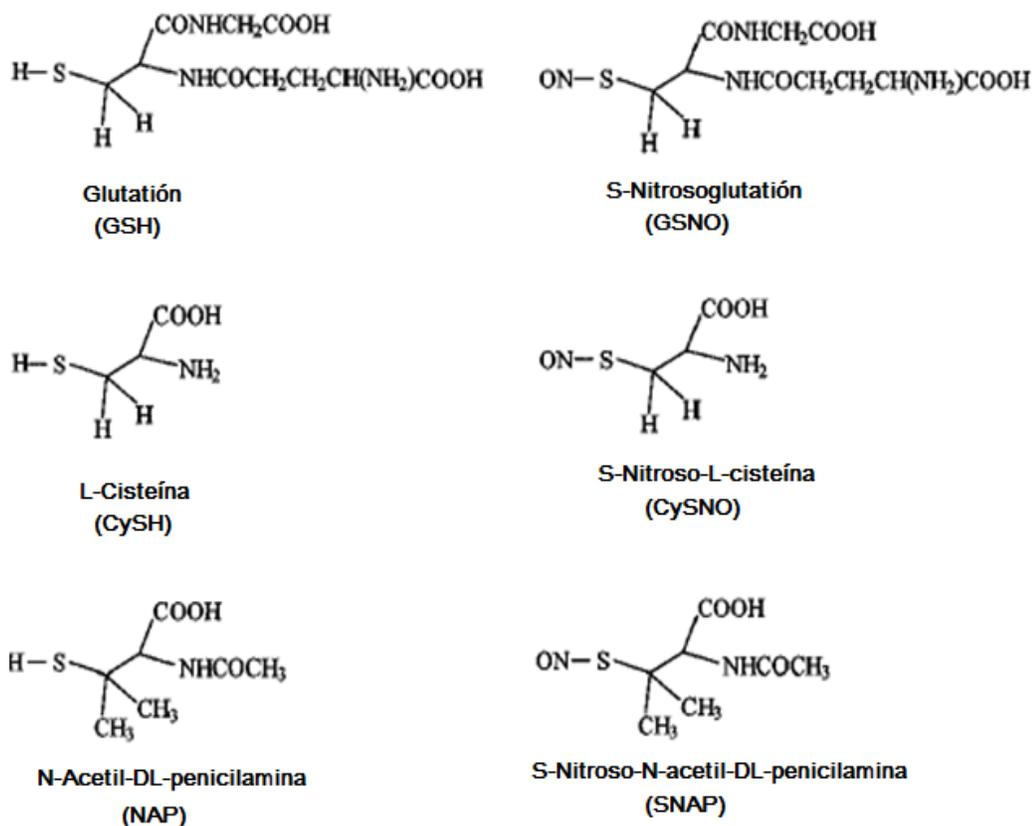
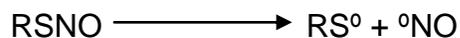


Fig. 6 Estructura de Tioles y S-Nitrosotioles

Se ha demostrado que tanto el SNAP como el GSNO tienen diversos efectos biológicos; el SNAP, por ejemplo, es un potente vasodilatador (Ignarro *et al.*, 1981) y el GSNO a bajas concentraciones proporciona protección al miocardio isquémico (Konorev *et al.*, 1996). De manera general se propone que los S-nitrosotioles se descomponen mediante un corte homolítico en el sitio de unión de S-N:



Esta reacción genera óxido nítrico y un radical RS, sin embargo, esta aseveración no ha sido demostrada en su totalidad bajo condiciones fisiológicas.

Singh y colaboradores (1996) han demostrado que la presencia de trazas de iones de metales de transición (presentes en todos los buffers) estimula el rompimiento catalítico de los s-nitrosotioles para la generación de NO y disulfuros; además, los agentes reductores como Cu⁺, glutatión y ascorbato estimulan la descomposición de estos compuestos.

ANTECEDENTES

El HRSV infecta tanto células epiteliales como macrófagos, que participan en forma importante en la modulación de la respuesta inmune, por lo tanto la alteración en alguna de sus funciones compromete la eficiente resolución de la infección. En la infección con el HRSV, los macrófagos alveolares son el principal determinante en la respuesta inmune inicial, sin embargo, su papel en la respuesta inmune adaptativa está limitado a la secreción de mediadores inflamatorios y a la expresión de moléculas coestimuladoras (Pribul *et al.*, 2008).

La infección de macrófagos alveolares con el HRSV, induce una reducción en la producción de intermediarios reactivos de oxígeno, así como en la capacidad fagocítica y la eliminación de protozoarios (Arrevillaga *et al.* 2012), no obstante el incremento en la producción de citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-6 (Ullmann *et al.*, 1995).

Se ha demostrado en experimentos previos que la infección por HRSV induce la producción de NO en un gran número de células en las vías respiratorias, y que el NO producido tiene importantes propiedades antivirales y de modulación inmune. Muchos estudios indican que el NO generado endógenamente tiene un papel importante en la modulación de la multiplicación intracelular de HRSV (Ali-Ahmad *et al.*, 2003).

En células dendríticas se ha visto que el HRSV permanece latente durante periodos prolongados y su replicación es activada por la supresión de la producción endógena de NO (Hobson y Everard, 2008).

También se ha observado que el aumento en la producción de óxido nítrico inhibe la replicación del coronavirus respiratorio porcino en células testiculares porcinas (Jung *et al.*, 2010), del parvovirus porcino en células PK-15 (células de riñón porcino) (Wei *et al.*, 2009), del virus del Dengue en mosquitos *Aedes aegypti*

y *Anopheles albimanus* (Ramos-Castañeda *et al.*, 2008), del hantavirus en células Vero E6 (Klinström *et al.*, 2006).

La persistencia del HRSV es un área de interés importante debido a que se sospecha de la participación de este virus en procesos de hiperreactividad crónica. Algunos padecimientos como enfermedad obstructiva crónica y dificultad para respirar, se han asociado con bronquitis debida a infección por HRSV (Piedemonte, 2002). En el laboratorio de la Dra. Gómez se desarrolló una línea celular de macrófagos murinos infectada de manera persistente con el HRSV que permite estudiar la interacción virus-célula, así como los mecanismos del establecimiento de infecciones persistentes.

Como se ha mencionado anteriormente, los macrófagos participan ampliamente en la respuesta inmune del huésped, además de que son la primera línea de defensa contra patógenos y son permisibles al HRSV. Por otro lado, al poseer funciones accesorias o de lujo como fagocitosis, presentación de antígenos, entre otras, facilita el estudio de los cambios que se presentan tanto en la célula como en el virus durante el establecimiento de la infección persistente.

Las infecciones persistentes se establecieron en una línea celular de macrófagos (P388D1) obtenida de un neoplasma linfóide inducido con metilcloroantreno en ratones DBA/2 (Koren *et al.* 1975). Por otro lado, el HRSV cepa long se purificó por ensayo de placa y precipitación con polietilenglicol por gradiente de sucrosa y se propagó y tituló en la línea celular VERO.

Para obtener la línea celular persistente, los macrófagos se infectaron con HRSV a multiplicidad de infección de 1 y después de permitir la adsorción del virus por 2 horas a 37 °C se agregó medio de mantenimiento al 2% de suero fetal bovino. La viabilidad celular se determinó por exclusión de azul tripano. Posteriormente el cultivo se mantuvo durante seis días cambiando el medio de mantenimiento diariamente. Al término de los 6 días post-infección, las células

supervivientes fueron extensamente lavadas con medio de mantenimiento y subsecuentemente propagadas.

Cada 3 o 4 días, las células fueron subcultivadas en una dilución 1:2. En cada pase, la persistencia viral fue monitoreada determinando el porcentaje de células que presentaban el antígeno viral (Fig. 7), así como la expresión del gen N del virus (Fig. 8) y la presencia de partículas defectivas.

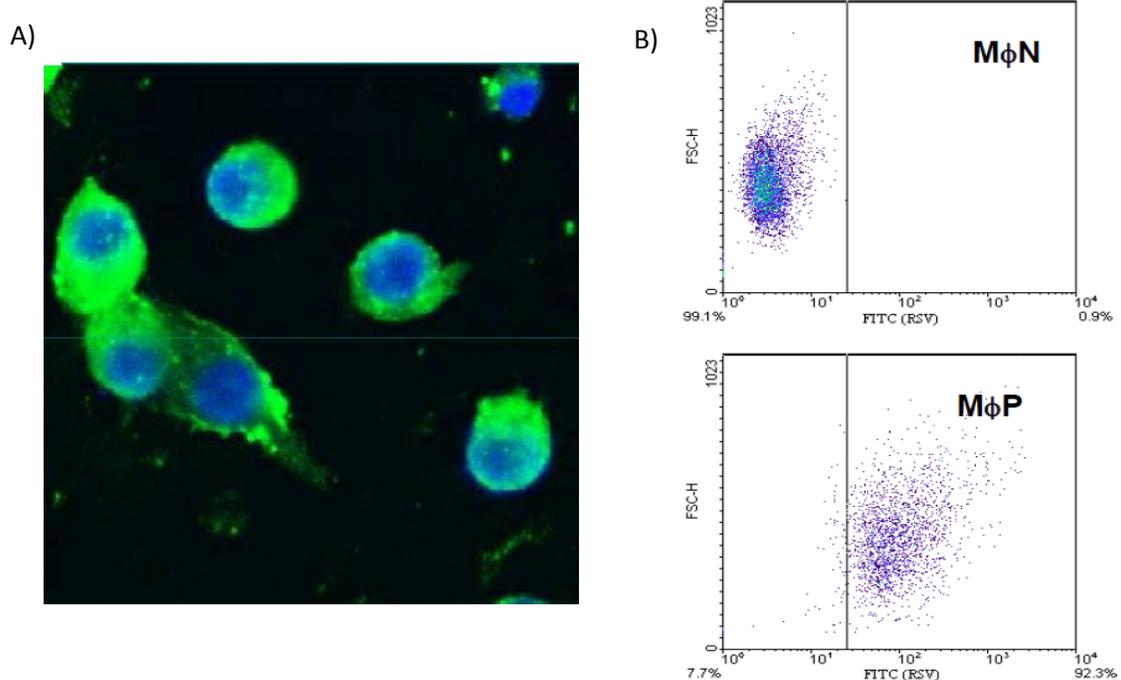


Fig. 7 Expresión del antígeno del HRSV en macrófagos persistentes. A) La imagen de microscopía confocal muestra en verde la distribución del antígeno viral en el macrófago infectado de manera persistente. En azul se muestran los núcleos celulares. B) El análisis del porcentaje de células persistentes (MφP) que presentan el antígeno viral se realizó por citometría de flujo tomando como control a células no infectadas (MφN).

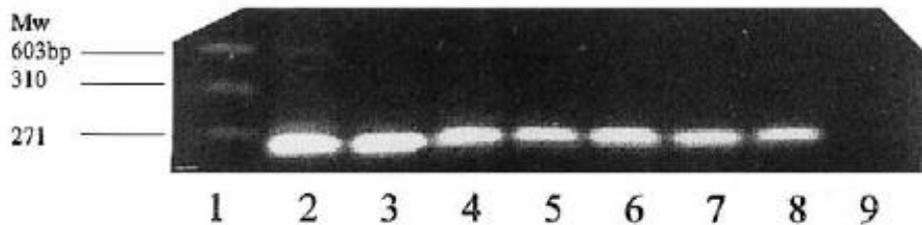


Fig. 8 Expresión del gen N del HRSV en macrófagos persistentes. Por RT-PCR se amplificó un segmento de 278 bp correspondiente al gen N del HRSV y se separó e identificó en geles de agarosa.

Actualmente se trabaja con subpases provenientes del pase 75 y se ha observado que la infección persistente no altera la producción de especies reactivas de oxígeno en los macrófagos, mientras que la infección en forma aguda si incrementa la producción de estas moléculas. Por otro lado, también se reporta que la infección persistente incrementa las actividades fagocíticas dependientes de receptores Fcγ RII y RIII del macrófago, así como la producción de IL-1β e IL-6 (Guerrero-Plata *et al.*, 2001).

JUSTIFICACIÓN

El disponer de un modelo *in vitro* de persistencia viral provee una herramienta para el estudio de la interacción virus-macrófago y nos permite estudiar los factores que influyen en el establecimiento y mantenimiento de la infección persistente por el HRSV. Además permite el estudio de aspectos celulares e inmunológicos en una estirpe celular que probablemente participa en la patogenia de la infección viral.

La infección aguda y persistente del HRSV altera las actividades biológicas del macrófago, como son fagocitosis mediada por anticuerpos, la producción de factores que modulan la respuesta inmune (Ullmann *et al.*, 1995; Guerrero-Plata *et al.*, 2001; Collins y Graham, 2008), y la actividad bactericida (Raza *et al.*, 2000). Debido a que el óxido nítrico es inducido por infección aguda con el HRSV en células epiteliales y a que actúa como uno de los principales compuestos microbicidas con actividad antiviral en la respuesta inmune, en el presente trabajo nos planteamos determinar el efecto del óxido nítrico en la multiplicación del HRSV, en una línea celular de macrófagos murinos infectada persistentemente.

HIPÓTESIS

El óxido nítrico es una molécula que tiene actividad antiviral, lo que podría tener efecto en la multiplicación del virus sincitial respiratorio en un cultivo de macrófagos persistentemente infectado.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto del óxido nítrico exógeno y endógeno en la multiplicación del virus sincitial respiratorio en un cultivo de macrófagos persistentemente infectado.

Objetivos particulares

1. Determinar comparativamente la producción del ON por la reacción de Griess en macrófagos testigo (MφN) y macrófagos infectados persistentemente (MφP).
2. Determinar la carga viral por PCR-Tiempo Real en MφP.
3. Inducir la síntesis de ON endógeno con la bacteria *Haemophilus influenzae* no tipificable inactivada y determinar la carga viral en MφP.
4. Añadir el donador del ON (SNAP), determinar la síntesis del ON y la carga viral.
5. Determinar el efecto del SNAP en la expresión de la NOS II.
6. Determinar la infectividad viral extra celular por ensayos de TCID_{50/ml} y citometría de flujo.
7. Determinar la presencia de partículas defectivas interferentes en los cultivos tratados con el donador de óxido nítrico.
8. Determinar en infecciones agudas (MφA) el efecto de SNAP en la multiplicación del genoma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Se utilizó la línea celular murina P388D1 (American Type Culture Collection ATCC: CCL-46) obtenida por Dawe y Potter (1957), derivada de un neoplasma linfoide inducido en ratones DBA/2 con metilcloroantreno que presenta características similares a macrófagos maduros y estables (M ϕ N) (Koren *et al.*, 1975). Los macrófagos persistentemente infectados con el virus sincitial respiratorio (M ϕ P) se obtuvieron y caracterizaron en el laboratorio de la Doctora Beatriz Gómez García (Sarmiento *et al.*, 2002).

Los cultivos de M ϕ N y M ϕ P así como los macrófagos infectados de manera aguda (M ϕ A), se mantuvieron y se propagaron en medio RPMI 1640 (GIBCO/BRL, Grand Island, NY), suplementado con antibióticos (penicilina 100 μ l/ml y estreptomycinina 100 mg/ml), 0.2% de NaHCO₃, 25 mM de HEPES, 1x10⁻⁶ Molar de β -mercaptoetanol y Suero Fetal Bovino al 5% v/v a 37°C y 5% CO₂ (condiciones de incubación).

La línea celular epitelial humana HEp-2 (ATCC: CCL-23) y la línea celular de fibroblastos de riñón de mono verde VERO (ATCC: CCL-81), ambas permisibles al virus sincitial respiratorio, se propagaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO/BRL Grand Island, NY), suplementado con antibióticos (penicilina 100 μ l/ml y estreptomycinina 100 mg/ml), 0.2% de NaHCO₃, 10mM de HEPES, 2 mM de glutamina y Suero Fetal Bovino al 5% v/v a 37°C y 5% CO₂.

Virus

En este trabajo se utilizó la cepa Long del virus sincitial respiratorio (HRSV) (ATCC, VR-26) donado por el Dr. Michael Trudel (Institute Armand-Frappier, Montreal, Canadá). Tanto la propagación del virus como la determinación de su infectividad se llevaron a cabo en la línea celular VERO.

Caracterización del sistema

La determinación del antígeno viral, así como el porcentaje de células infectadas persistentemente se realizó por citometría de flujo a través de inmunofluorescencia directa para el HRSV. Las células se lavaron con PBS, se centrifugaron a 3 000 rpm/3 min y se eliminó el sobrenadante (esta serie de pasos se realizó después de cada tratamiento dado a la células). Posteriormente, las células se fijaron durante 15 min a 4 °C con paraformaldehído al 4% resuspendiendo cada 5 min; se colocó saponina al 0.3% manteniendo durante 15 min a 37°C. Las células se bloquearon con suero de neonato al 5% en PBS durante 15 min a 4 °C y se incubaron con una solución de anticuerpo anti-HRSV (IMAGEN™ Respiratory Syncytial Virus, OXOID) 13:100 en suero de neonato al 3% en PBS durante 30 min a 4 °C protegidas de la luz. Finalmente las células fueron resuspendidas en 300 µl de PBS para ser analizadas en el citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). Los resultados se analizaron con el software WinMDI 2.9

Propagación viral

Se infectaron monocapas semiconfluentes de células Vero en placas de 150 cm² con HRSV a multiplicidad de infección (moi) de 0.5 en un volumen total de 5 ml en medio DMEM y se incubó durante 2 horas a 37 °C y 5% CO₂ agitando cada 15 min. Al término de la incubación se adicionaron 8 ml de medio DMEM con 5% SFB y se mantuvo la placa en condiciones de incubación. En el día 4 post-infección, se removió el medio conservando únicamente 2 ml con los que se recolectaron todas las células de la monocapa y se colocaron en un tubo falcon de 50 ml al que se le agregaron 10 ml de medio DMEM con 5% SFB. Se sonicaron las células durante 5 segundos 3 veces manteniendo a 4 °C y se removieron los restos celulares por centrifugación a 3 000 rpm/7 min/4 °C. Se decantó el sobrenadante en un tubo nuevo, el cual se alicuotó y se almacenó a -70°C hasta su utilización.

Titulación viral

El virus obtenido por propagación se diluyó 1:10 de manera serial en medio DMEM y se determinó el título viral infeccioso. La titulación se hizo en placas de 96 pozos con células VERO semiconfluentes. Para cada dilución se utilizaron 8 pozos con 50 μ l/pozo de la dilución del virus y la placa se incubó por 2 horas para permitir la adsorción del virus, posteriormente el medio se eliminó y a cada pozo se le añadieron 100 μ l de DMEM sin suero. La placa se incubó durante 72 horas más y finalmente el título viral infeccioso se calculó de acuerdo a la fórmula de Kärber que se basa en el efecto citopático (ecp) observado en la placa y se expresa como dosis media infecciosa por mililitro (TCID₅₀/ml) de acuerdo a Payment y Trudel (1993):

—

Donde:

Δ = Logaritmo con base 10 de la dilución con 100% de pozos positivos a ecp.

= Logaritmo con base 10 del factor de dilución

Σ = sumatoria de los pozos que presentan ecp (expresado en fracciones), tomando en cuenta las siguientes diluciones: la dilución en la que el total de los pozos presenta efecto citopático (8/8) y hasta la primer dilución en la que ningún pozo presenta efecto citopático (0/8).

Sobreproducción e inhibición de Nitritos

La bacteria gram negativa *H. influenzae* no tipificable (HiNT) (ATCC: 2019) se utilizó para aumentar la producción de óxido nítrico endógeno mediante la inducción de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (NOS II). La bacteria se propagó en placas de agar-chocolate suplementadas con polienriquecimiento (Dibico) a 37 °C, en una atmósfera al 5% CO₂ por 18 horas. Posteriormente se inactivó por calor en un baño María durante una hora a 70 °C y se colocó en los cultivos de M ϕ P a moi de 2 permitiendo su acción durante 24 hrs previamente a la cuantificación de nitritos.

La sobreproducción de óxido nítrico exógeno se realizó mediante el donador de óxido nítrico S-Nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP Sigma Aldrich N3398-50MG). El donador se agregó a los cultivos en un rango de concentraciones de 50 a 200 $\mu\text{M}/\text{ml}$ y se permitió su acción por 12 horas en M ϕ P y 8 hrs en M ϕ A previo a la cuantificación de nitritos.

La inhibición de la actividad de la óxido nítrico sintasa inducible en macrófagos se realizó mediante el compuesto N ω -Nitro-L-arginina metil ester clorhidrato (L-NAME Sigma-Aldrich N5751-1G) que es un competidor del sustrato por el sitio activo de la enzima. El inhibidor se agregó a los cultivos en una concentración de 200 μM y se permitió su acción por 24 horas previo a la cuantificación de nitritos.

Determinación de Nitritos

La sobreproducción de óxido nítrico se determinó de manera indirecta al cuantificar la cantidad de nitritos presente en los sobrenadantes a través de la reacción descrita por Griess en 1879 y de acuerdo a las instrucciones del Griess Reagent System (Promega G2930). La reacción se realizó en una placa de 96 pozos de fondo plano (Nunclon, Dinamarca). En cada pozo se incubaron 50 μl de sobrenadantes provenientes de los cultivos de M ϕ N, M ϕ P y M ϕ A tanto de los controles como los tratados con HiNT, SNAP y L-NAME, más 50 μl de una solución de sulfanilamida al 1% (disuelta en una solución al 5% de ácido fosfórico) por 10 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Posteriormente, a cada uno de los pozos se les agregaron 50 μl de la solución de NED (naftil-etilendiamina dihidrocloruro al 0.1%) y se incubaron nuevamente por 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La reacción de Griess generó un producto de color magenta que se analizó en un lector de placas microplate spectrophotometer (BIO-RAD) a una longitud de onda de 535 nm. Cada determinación se hizo por triplicado y la concentración de nitritos totales de las muestras se calcularon utilizando una curva estándar obtenida a partir de

diluciones seriales de una solución de nitrito de sodio 100 μM que se hizo simultáneamente al momento de cuantificar la absorbancia de la muestras.

Viabilidad celular

La viabilidad celular se analizó mediante la determinación de la tasa de reducción de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Amresco 0793-5G). Los macrófagos fueron sembrados en placas de 96 pozos e incubados durante 12 horas con o sin SNAP (50, 100 y 200 $\mu\text{M}/\text{ml}$). Al término del tratamiento se retiró el medio y se realizaron 3 lavados con PBS; posteriormente se incubó con una solución de MTT 5 mg/ml en RPMI 5% SFB durante 3 hrs a 37 °C y 5% CO_2 en oscuridad. Se retiró el MTT, se realizaron 3 lavados con PBS y la sal de formazán precipitada se solubilizó con DMSO. Se leyó la absorbancia a 570 nm. El porcentaje de células viables se calculó por medio de la formula:

Donde DO: Densidad óptica.

Cuantificación del Genoma Viral

Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó con el RNeasy Mini Kit y siguiendo las instrucciones del protocolo Purification of Total RNA from Animal Cells Using Spin Technology (QIAGEN). Las células se resuspendieron en 350 μl del buffer RLT, se homogeneizaron por vórtex durante 30 segundos y se les agregó la misma cantidad en volumen de etanol al 70%. Posteriormente la muestra se transfirió a la columna de separación del kit y se centrifugo a 10 000 rpm/15 s. Se desechó el sobrenadante y a la columna se le agregó 700 μl de buffer RW1 para lavar la membrana, se centrifugó nuevamente a 10 000 rpm/15 s. Se prosiguió con un par de lavados con 500 μl de buffer RPE centrifugando a 10 000 rpm durante 15 s y 2

min respectivamente. Después se colocó un nuevo tubo recolector y se agregó a la columna 50 µl de agua libre de RNAsas para eluir el RNA y se centrifugó a 10 000 rpm/1 min. Finalmente se recolectó el RNA contenido en el sobrenadante en tubos eppendorff y se congeló a -70°C hasta su utilización. La cantidad de RNA total extraído se determinó por espectrofotometría con el equipo Nanodrop 2000 de Thermo scientific

Determinación de la integridad del RNA

Para determinar la integridad del RNA total extraído, se sometió una muestra de cada ensayo a electroforesis horizontal. Previo al análisis, se eliminaron las RNAsas presentes en la cámara de electroforesis realizando un lavado por 12 hrs con NaOH 50 mM, se enjuagó 2 veces con agua-benzal (100:1) y finalmente se realizó un lavado con agua estéril. Se mezclaron 5 µl de la muestra de RNA con 10 µl de formamida, 3.5 µl de formaldehído, 2 µl de buffer MOPS 10X, 1 µl de bromuro de etidio y 1 µl de buffer de carga (Bio-Rad Nucleic Acid Sample Buffer 5X); se desnaturalizó la mezcla 5 min a 65 °C y se separó en un gel desnaturalizante de agarosa al 1% con formaldehído con una corriente de 80 voltios durante una hora. Los geles se analizaron en un transiluminador de luz ultravioleta a 260 nm de Bio-Rad. Se tomaron fotografías de las muestras y se identificaron las bandas correspondientes a las subunidades 28 y 18 S.

Cuantificación del Genoma Viral

La cuantificación de la expresión del gen N del HRSV se realizó por medio de RT-PCR en tiempo real en un solo paso con el kit Path-RSVA-AD (Primer Design) y de acuerdo a las instrucciones de The PrimerDesign™ Kit for Respiratory Syncytial Virus type A (HRSV-A) genomes. Para cada tubo de reacción se colocaron 10 µl de enzima Taq Man® MasterMix One step RT-PCR (Applied Biosystems), 1 µl Primer/Probe Mix, 4 µl de agua libre de RNAsas y 5 µl de muestra de RNA a una concentración de 2 000 ng/µl. La amplificación se llevó a cabo bajo el siguiente programa:

	Paso	Tiempo	Temperatura
50 ciclos	Transcripción Reversa	30 min	48° C
	Activación enzimática	10 min	95° C
	Desnaturalización	15 seg	95° C
	Recolección de Datos	60seg	60° C

Diseño de Oligonucleótidos

La determinación de la expresión del mRNA de la polimerasa del HRSV se llevó a cabo mediante PCR en tiempo real en dos pasos. Para este ensayo se diseñaron oligonucleótidos específicos. El diseño se realizó con el software File builder 3.1 de Applied Biosystems a partir de la región traducida del gen de la polimerasa viral. Las secuencias de los oligonucleótidos son:

Forward: 5'(GAACCTACTTATTTTCAGTCATTA CTTATGACATACA)3'

Reverse: 5'(TCTATAGCTCTTCTTATTATCTTTTTAAGTAAATTAGTGGTA)3'

Ambos oligonucleótidos fueron sintetizados por TaqMan® Gene Expression Assays.

Retrotranscripción

El cDNA se sintetizó por medio de la transcripción reversa a partir del RNA total obtenido de las muestras, utilizando oligo dT para enriquecer y amplificar RNA's mensajeros. También se utilizaron dNTP's que funcionan como sustrato para la transcriptasa reversa. El RT-PCR se realizó en dos fases:

En la primera fase se mezclaron: 1 µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 µg/ml), 1 µg de RNA total, 1 µl mezcla de dNTP's 10 mM cada uno y dH₂O estéril (llevar a 13 µl). La reacción se sometió a un ciclo de desnaturalización a 65 °C por 5 min, transcurrido este tiempo, los tubos se mantuvieron a 4 °C para evitar la renaturalización.

En la fase 2, a la mezcla anterior se agregaron 4 µl Buffer First-Strand 5X y 2 µl DTT 0.1 M. Esta nueva mezcla se incubó a 42 °C por dos minutos, posteriormente, se agregó 1 ul de la enzima SUPERSRIPT II y se sometió la mezcla a un ciclo de síntesis de cDNA a 42 °C por 50 min. Finalmente, se inactivó la enzima a 70 °C por 15 min. El cDNA se almacenó a -70 °C hasta su utilización.

Amplificación de cDNA

Para amplificar las regiones transcritas del mRNA de la polimerasa viral, los ensayos de PCR fueron realizados de la siguiente manera:

Para cada tubo de reacción se colocaron 10 µl de enzima Taq Man® Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems), 1 µl Primer (TaqMan® Gene Expression Assays), 4 µl de agua libre de RNAsas y 5 µl de muestra de cDNA. La amplificación se llevó a cabo bajo el siguiente programa:

	Paso	Tiempo	Temperatura
40 ciclos	Desnaturalización inicial	2 min	50° C
	Activación enzimática	10 min	95° C
	Alineamiento	15 seg	95° C
	Extensión	60 seg	60° C

Los resultados de amplificación se analizaron con el software StepOne v2.2.2. Cada cuantificación se realizó por triplicado y el número de copias totales del gen N se calculó utilizando una curva estándar obtenida a partir de diluciones seriales del control positivo que se hizo simultáneamente al momento de amplificar las muestras.

Confirmación del efecto de SNAP en la Replicación del HRSV por Northern Blot

Los ensayos de Northern Blot se realizaron en el laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología de la Escuela de Medicina de Boston University, Boston, Massachusetts bajo la dirección de la Dra. Rachel Fearn.

Se utilizaron extractos de RNA total de MφP. De los extractos obtenidos se cargaron 3000 ng de RNA total por carril en geles de agarosa al 1.5% y se separaron con una corriente de 90 voltios durante 3 hrs. Posteriormente, el RNA fue transferido durante toda la noche a una membrana de Nylon (Nytran 0.45 μm cat. no. 10 416196, GE Healthcare Life sciences Walthman™) con el sistema de transferencia TurboBlotter™ (Rapid Downward Transfer System Strack Tray E04706) de Schleicher & Schuell utilizando papel cromatográfico (Chromatography paper, grado 3MM CHR, cat. no. 3030-931; grado GB003, cat. no. 10427804 y grado GB002, cat. no. 3030-8165, Whatman™). Posteriormente se neutralizó la membrana durante 10 min con buffer 6x SSC (Dilución de solución 20x SSC - Saline sodium citrate- American Bioanalytical cat. no. AB 13156- 01000) y se dejó secar al aire libre durante 15 min. El RNA se fijó a la membrana al exponerla durante 1 min a luz UV (CL-100 ultraviolet crosslinking. Modelo CL-1000. Energy: x100 μJ/cm²). Una vez fijado el RNA, la membrana se bloqueó con 20 ml de solución para prehibridar (6x SSC, 2x Denhardt's solution Alfa Aesar It# E28Z506 y 10% SDS) incubando por aproximadamente 10 min a 65 °C; al término de los 10 min se agregó una alícuota de 200 μl de DNA de esperma de salmón (Salmon Sperm DNA no. cat. 15632-011) y se mantuvo a 65 °C durante 1 hr en agitación constante.

Se diseñaron los siguientes oligonucleótidos para la amplificación de un segmento de 500 pares de bases (pb) del gen de interés que será utilizado posteriormente como sonda de hibridación.

Para N:	Para β-Tub:
Forward:	Forward
5' GGCTCTTAGCAAAGTCAAG 3'	5' CTGAACCATCTCGTCTCGGC 3'
Reverse	Reverse
5' CCCCTGCTGCTAATTTAGTTA 3'	5' CACCCGTGTAAGTGGAGGAA 3'

Los segmentos de interés se amplificaron a partir de RNA total por PCR punto final bajo el siguiente protocolo: 94°C/2'; 94°C/15" ; 46°C/15"; 72°C/30";

posteriormente, los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% 75 volts/1 hr utilizando el marcador de DNA Gel Red Nucleic Acid Stain 10 000X RGB-4103 Phoenix Research, este marcador reemplaza al BrEt y se excita a 302/312 nm. Las bandas correspondientes a 500 pb se identificaron con luz UV en un transiluminador (Foto/Prep modelo 3-3500, no. de serie: PTG1-0995-2637 Fotodyne Inc. 120W, 60 Hz y 1.20 Amp), se cortaron y se purificó el cDNA con el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen #28704). La banda se cortó en pedazos pequeños, se pesó y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se añadieron 3 volúmenes de buffer QG por cada volumen de Gel (100mg~100µl) y se incubó a 50 °C por 10 min para derretir el gel. Se adicionó 1 volumen (de gel) de isopropanol mezclando por vórtex. Se colocó la mezcla en la columna y se centrifugó a 13 000 rpm/1 min. Se agregaron 0.5 ml de buffer PE y se centrifugó. Se cambió el tubo colector y se eluyó el DNA en buffer EB (10mM Tris-Cl pH 8.5).

Una vez purificado el cDNA, mediante PCR punto final y utilizando únicamente los primers reverse para N o β -tubulina se incorporaron los nucleótidos marcados radioactivamente (α -³²P-dATP 50 uCi (3000 Ci/mmol)) a las sondas de hibridación. Posteriormente se hibridaron las membranas con las sondas marcadas radioactivamente durante toda la noche a 65 °C y con agitación constante. Finalmente se realizaron dos lavados colocando la membrana en 100 ml de buffer de lavado (2X SSC, 0.1% SDS) a 65 °C y agitación constante durante una hora y un lavado con 100 ml de buffer astringente (0.1X SSC, 0.1% SDS) en un baño de agua a 65 °C durante 15 min. Se dejó secar la membrana durante 10 min y se expuso al film (Kodak BioMax MR 8" x 10" CAT# 870 1302) en oscuridad absoluta. Se mantuvo la exposición a -70 °C durante 24 hrs y finalmente se reveló el film. El análisis densitométrico se realizó con el software Quantity One de BIO-RAD® y los valores obtenidos se graficaron como nivel de expresión del gen normalizado con respecto a β -tubulina.

Análisis de Proteínas

Extracción de Proteínas

Para evaluar la posible acción de SNAP sobre la proteína NOS II de los MφP, posterior a los tratamientos con diferentes concentraciones del donador, las células se lisaron con 50 µl de buffer de extracción RIPA con inhibidor de proteasas de serina AEBSF (R&D Systems) 1:10; el botón de células se resuspendió varias veces evitando que se formaran grumos y se pasó por el vórtex durante 20 seg. Posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm/30 min a 4 °C y se recolectó el sobrenadante.

Cuantificación de Proteínas ASSAY DC modificado de Lowry

Se utilizó una placa de 96 pozos para hacer la cuantificación. Se colocaron 5 µl de la muestra en el pozo (por triplicado) y se le adicionó 25 µl del reactivo A' (conformada por 20 µl de reactivo S por cada ml de reactivo A). Posteriormente se agregaron 200 µl del reactivo B en cada pozo. Se agitó suavemente la placa y se dejó incubar por 15 min. Finalmente se leyó la absorbancia a 750 nm. La concentración de proteínas totales se calculó utilizando una curva estándar obtenida a partir de diluciones seriales de una solución de 10 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA) que se hizo simultáneamente al momento de cuantificar las muestras.

Western Blot

Los ensayos de inmunotransferencia se realizaron con extractos de proteína total de MφP. De los extractos obtenidos se cargaron 15 µg de proteína total por carril en geles de poliacrilamida con un gradiente de concentración de 4-12% (Nu-Page 4-12% Bis-Tris gel. Novex by Life Technologies) y se separaron con una corriente de 200 voltios durante 50 min. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana hidrofóbica de difluoruro de polivinildieno optimizada para transferencia de proteínas (Hybond™ PVDF, de Amersham Pharmacia Biotech) en una cámara de transferencia semi seca durante 50 min a

30 voltios. Una vez confirmada la transferencia, la membrana se trató con solución de bloqueo (PBS al 8% de leche descremada, libre de grasa) y mantenida en agitación constante por 1 hr a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se incubó durante toda la noche en agitación constante a 4 °C con uno de los siguientes anticuerpos primarios policlonales (Santa Cruz Biotechnology) anti-NOS II (sc-650) y anti- β -tubulina (sc-9104), diluidos en solución de bloqueo (PBS al 2.5% de leche descremada, libre de grasa) 1:750 y 1:2500 respectivamente. Después de lavar la membrana 3 veces por 10 min c/u con solución de lavado (PBS al 0.5% de tween-20), se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Antibodies Incorporated) IgG anti-conejo (48-156-3H) a una dilución de 1:5000 en la solución de bloqueo al 2.5 % de leche. La membrana se mantuvo en agitación constante 1 hr a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó varias veces con TBS 1X y se incubó con una solución reveladora 1:1 de Buffer de Peroxidasa y Luminol (Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate; Thermo Scientific) durante 3 min en oscuridad y temperatura ambiente, posteriormente se expuso a la película reveladora en oscuridad 3-5 min y se incubó la película en solución reveladora, se lavó con agua y finalmente se incubó en solución fijadora. El análisis densitométrico se realizó con el software Quantity One de BIO-RAD® y los valores obtenidos se graficaron como nivel de expresión de la proteína normalizada con respecto a β -tubulina.

Análisis de Antígeno Viral en Macrófagos Persistentes

Posterior a la sobreproducción de Nitritos en macrófagos infectados persistentemente con las concentraciones de 50, 62.5, 75, 87.5 y 100 μ M/ml SNAP, las células se analizaron por citometría de flujo a través de inmunofluorescencia directa para el HRSV siguiendo la técnica descrita anteriormente para determinar cambios en el porcentaje de células que presentaban antígeno viral.

Ensayo de infectividad del virus

Las partículas infecciosas virales presentes en sobrenadantes se cuantificaron por inmunofluorescencia directa de las células que expresaban el antígeno viral. Se utilizaron monocapas confluentes de células Hep-2 crecidas en placas de 12 pozos. Se infectaron durante 2 horas con los sobrenadantes provenientes de los tratamientos dados a los MφP (Control, 25, 50, 75 y 100 μM de donador de óxido nítrico –SNAP-) y posteriormente se les dejó incubar por 72 horas en medio de mantenimiento (DMEM 2% SFB). Al término, las células se analizaron por citometría de flujo siguiendo la técnica descrita anteriormente y se determinó el porcentaje de células que presentaron antígeno viral.

Determinación de Partículas Defectivas por interferencia con la replicación del virus silvestre.

Se infectaron monocapas confluentes de células VERO y MφN en placas de 6 pozos (2×10^6 células por pozo) con 1 ml de sobrenadantes provenientes de cultivos MφP tratados con distintas concentraciones de SNAP y se incubaron por 2hr a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente se retiró el medio, se lavaron con PBS y se infectaron de la misma manera con virus silvestre a moi de 2. A las 24 hrs post infección, las células se recuperaron y se prepararon para determinar el porcentaje de células infectadas por citometría de flujo siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Efecto del SNAP en infecciones Agudas

Se infectaron monocapas confluentes de Mφ N en placas de 6 pozos (2×10^6 células por pozo) con HRSV a MOI 2 incubando durante 2 horas a 37°C; posteriormente se retiró el virus y se colocó medio de mantenimiento (RPMI 5% SFB). A las 16 hrs post-infección se colocó el donador SNAP a diferentes concentraciones; a las 24 hr se extrajo el RNA total de las células y se determinó por RT-PCR en tiempo real el número de copias del genoma viral.

Análisis estadístico

Los resultados que se muestran son el promedio de 3 a 5 determinaciones independientes con sus respectivas desviaciones estándar a los que se les aplicó la prueba de t-student con el programa GraphPad Prism 6. Las diferencias entre los tratamientos, denotadas con *, se consideraron significativas cuando se obtuvo una $p < 0.05$.

RESULTADOS

1) Caracterización del sistema

De manera rutinaria y previamente a la realización de cualquier experimento, se comprobó el porcentaje de células que expresan el antígeno viral en todos los cultivos (M ϕ N, M ϕ A y M ϕ P) mediante inmunofluorescencia directa por citometría de flujo. El porcentaje de células que expresan el antígeno viral en macrófagos infectados de manera persistente se encuentra por encima del 95% en todos los pases, mientras que en los macrófagos infectados de forma aguda, el porcentaje de células presenta variaciones amplias del 26 al 87% (Fig. 9).

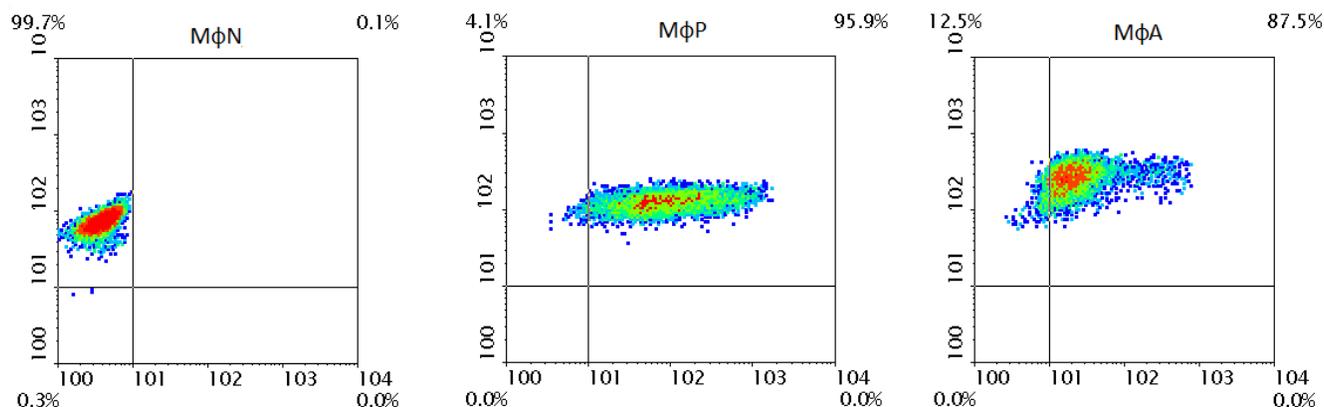


Fig 9 Caracterización del sistema. La determinación de la expresión del antígeno viral en M ϕ N, M ϕ P y M ϕ A se realizó por inmunofluorescencia directa en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson) 24 hrs p.i. en M ϕ A y 24 hrs de cultivo de M ϕ N y M ϕ P. Se presenta el porcentaje de células positivas al antígeno en cada uno de los cultivos.

2) Determinación del efecto del óxido nítrico endógeno en la multiplicación del HRSV en macrófagos infectados persistentemente.

El efecto del óxido nítrico endógeno se determinó al inducir la producción del mismo con la bacteria gram negativa inactivada *H. influenzae* no tipificable (HiNT); la bacteria se colocó en cocultivo con M ϕ P durante 24 horas y simultáneamente se utilizó el compuesto L-NAME que es un inhibidor competitivo del sustrato por el

sitio activo de la enzima NOS II para comprobar que el efecto observado se debía al óxido nítrico generado por la presencia de la bacteria; al término se cuantificó de manera indirecta con la reacción de Griess la cantidad de nitritos presente en los sobrenadantes, y por RT-PCR en tiempo real se determinó el número de copias de genoma viral generadas en presencia de óxido nítrico. El cultivo persistente produce niveles basales de óxido nítrico similares a los observados en cultivos de macrófagos no infectados (datos no mostrados). Los resultados muestran que en presencia de la bacteria, la producción de nitritos sufre un incremento de casi el 50%, mientras que el inhibidor L-NAME abate la producción de nitritos en un 40% con respecto MφP que no fueron tratados (Tabla. 10 A). Por otro lado, se observó que el incremento en la concentración de nitritos debido a la bacteria tiene como resultado el decremento en la multiplicación del HRSV, mientras que al utilizar el inhibidor y por lo tanto disminuir la concentración de nitritos en el medio resulta en el aumento de la multiplicación del HRSV (Fig. 10 B), lo que concuerda con estudios previos en los que se demuestra que el óxido nítrico presenta actividad antiviral (Jung *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2009; Ramos-Castañeda *et al.*, 2008; Klinström *et al.*, 2006).

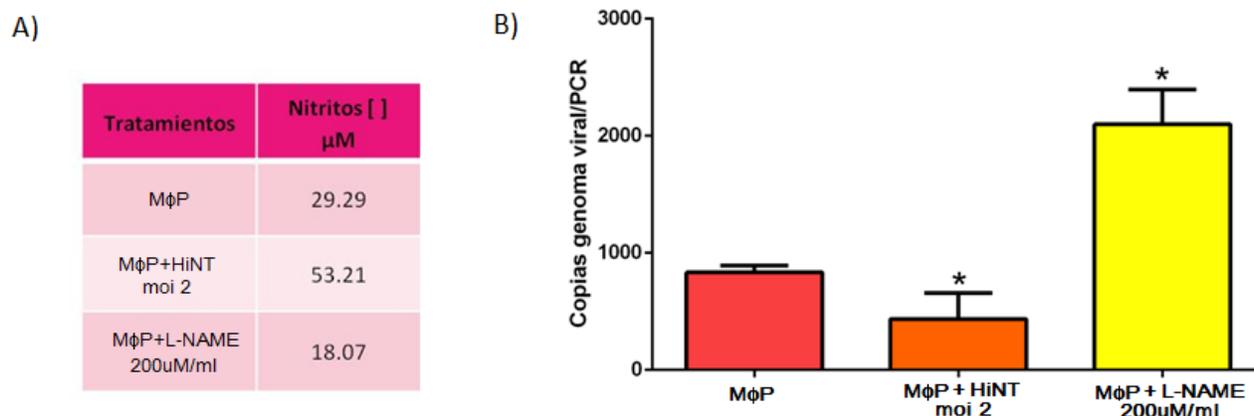


Fig 10. Determinación del efecto del óxido nítrico endógeno. Los MφP se infectaron con HiNT moi 2 y se trataron con 200 μM/ml de L-NAME durante 24 hrs. A) La producción de nitritos se determinó por la reacción de Griess B) El número de copias del genoma viral se determinó por RT-PCR en tiempo real. Los resultados que se muestran son el promedio de 3 experimentos independientes y las diferencias significativas se denotan con * ($p < 0.05$).

Sin embargo, tanto la bacteria como el óxido nítrico producido por la enzima NOS II son capaces de afectar la producción de diferentes citocinas que participan en la respuesta inmune del macrófago, tales como: interleucinas, IFN- γ , TNF- α y TGF- β entre otros (Bodgan, 2001), lo que podría resultar en un efecto sinérgico entre el NO y estas moléculas. Por esta razón, para poder determinar con mayor claridad y únicamente el efecto del óxido nítrico en la multiplicación del virus, decidimos utilizar el donador SNAP, lo que eliminaría la posible activación del macrófago y por consiguiente la producción de otras moléculas que podrían enmascarar y/o alterar el efecto del NO. El donador se utilizó en distintas concentraciones y se permitió su acción en los cultivos de M ϕ N y M ϕ P por 12hrs (Fig. 11).

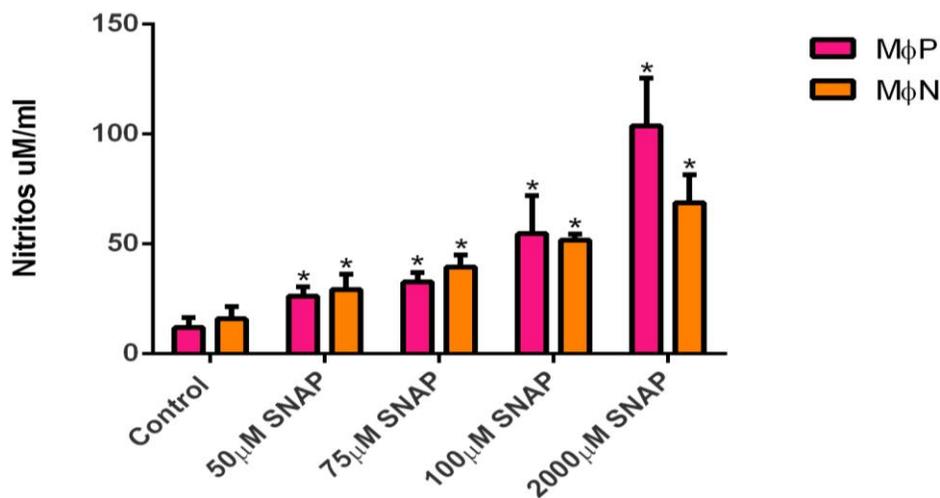


Fig 11. Determinación de la concentración de nitritos. Los cultivos de M ϕ P y M ϕ N fueron tratados con distintas concentraciones del donador de óxido nítrico (SNAP) durante 12 hrs. La concentración de nitritos en sobrenadantes se determinó por la reacción de Griess. Los resultados que se muestran son el promedio de 5 experimentos independientes y las diferencias significativas se denotan con * ($p < 0.05$).

Los resultados muestran que la producción basal de óxido nítrico en los cultivos de M ϕ P no se ve alterada por la presencia del virus con respecto a los M ϕ N. Además, tanto en los macrófagos testigo (M ϕ N), como en los macrófagos infectados de manera persistente con el HRSV (M ϕ P), la concentración de nitritos y por lo tanto de óxido nítrico aumenta de manera dosis dependiente a la concentración de SNAP.

3) Viabilidad Celular

En general, un estímulo oxidante de baja intensidad hace que una célula pueda resistir posteriormente condiciones más oxidantes (Hansberg, 2002). Sin embargo, las especies reactivas tanto de oxígeno como de nitrógeno (a las que pertenece el NO) que se generan en cualquier estado fisiológico, producen continuamente daño al DNA, proteínas y lípidos celulares (Ding *et al.*, 2005); este daño, como es de esperarse, se incrementa conforme se altera el estado redox de la célula, por ejemplo al aumentar la concentración de NO. Cuando los mecanismos de reparación celular se ven superados por el daño, las células entran en apoptosis y en algunos casos extremos se activan los mecanismos de necrosis celular (Moustafa *et al.*, 2004). Por esta razón, se determinó la viabilidad de los cultivos celulares posterior a los distintos tratamientos con el donador, y se encontró que la supervivencia de las células, tanto infectadas persistentemente con el HRSV como no infectadas, disminuye de manera dosis dependiente a la concentración de nitritos generados por el donador (Fig. 12); sin embargo, el efecto fue más drástico en células infectadas de manera persistente.

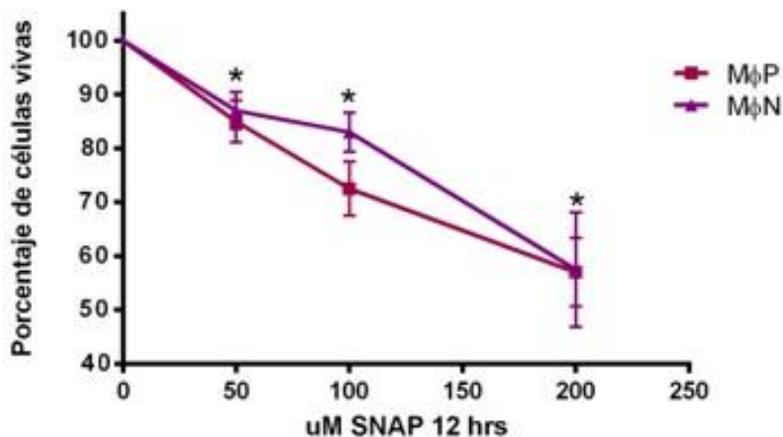


Fig 12. Determinación de la viabilidad celular. Los cultivos de MφP y MφN fueron tratados con distintas concentraciones del donador de óxido nítrico (SNAP) durante 12 hrs. La viabilidad celular se determinó por la tasa de reducción del MTT. Los resultados que se muestran son el promedio de 5 experimentos independientes y las diferencias significativas se denotan con * ($p < 0.05$).

4) Determinación del efecto del NO exógeno en la multiplicación del HRSV en MφP

Previo a la determinación de la expresión de genes virales, el RNA extraído de cada uno de los cultivos tratados con el donador se sometió a electroforesis en geles de agarosa para determinar su integridad y garantizar la veracidad de los resultados posteriores. En la figura 13 A se muestra el control de degradación del RNA y en la figura 13 B se demuestra la integridad de las muestras utilizadas en los ensayos posteriores.

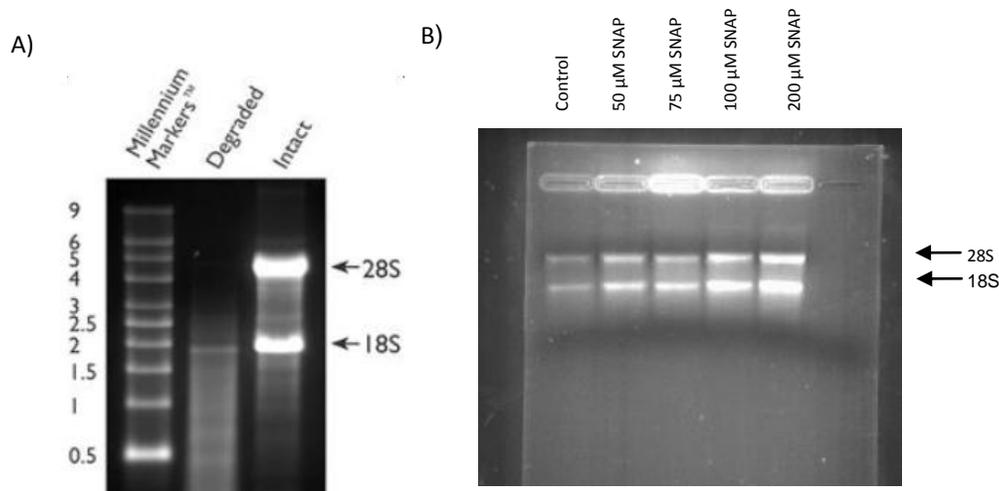


Fig. 13 Determinación de la integridad del RNA total. A) Control de degradación del RAN (<http://epidemiologiamolecular.com/analisis-perfil-expresion-genica-celulas-sangre-periferica/>) B) Ensayo representativo de múltiples determinaciones.

Una vez confirmada la integridad del RNA total, se determinó el número de copias de 2 genes virales por PCR en tiempo real; utilizando el kit Path-RSVA-AD (Primer Design) se cuantificó la expresión del gen N del virus, localizado al inicio del genoma a partir de una curva estándar generada con diluciones seriales de un plásmido y para el mRNA del gen L que se localiza en la parte final del genoma viral se diseñaron oligonucleótidos específicos. Se encontró que el incremento en la concentración de óxido nítrico aumenta de manera dosis-dependiente el número de copias tanto para el gen N (Fig. 14) como para el mRNA del gen L (Fig. 15).

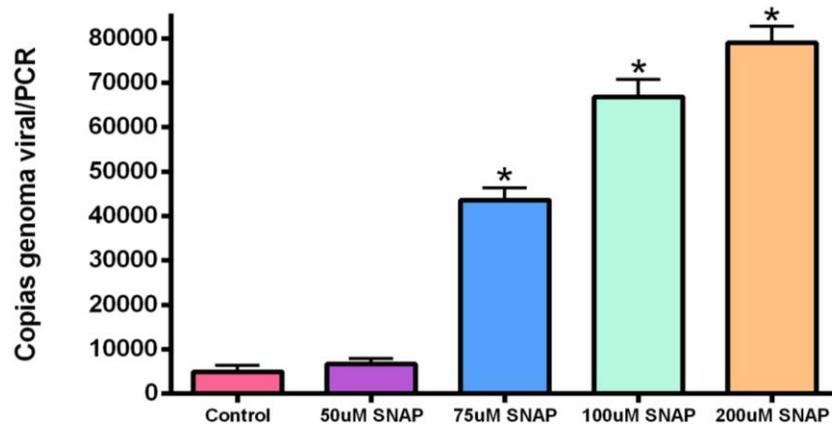


Fig 14. Determinación del número de copias del gen N. Los cultivos de MφP fueron tratados con distintas concentraciones del donador de óxido nítrico (SNAP) durante 12 hrs. Se extrajo el RNA total y se cuantificó por RT-PCR en tiempo real, el número de copias del gen N del HRSV. Los resultados que se muestran son el promedio de 5 experimentos independientes y las diferencias significativas se denotan con * ($p < 0.05$).

En el caso del mRNA del gen L no se reporta el número específico de copias generadas en cada tratamiento, se reporta en su lugar, el ciclo de amplificación, en cuyo caso los resultados se interpretan de la siguiente manera: a menor cantidad de ciclos de amplificación, mayor número de copias del gen de interés (Fig.15). Al no contar con un plásmido del mRNA del gen L para generar una curva estándar y así poder extrapolar los datos de los ciclos de amplificación obtenidos en el ensayo de PCR, es necesario normalizar los datos con respecto a un gen endógeno (gen celular) que no se modifique con los tratamientos dados. Sin embargo, se probaron los genes endógenos GAPDH, β -Actina y RNA ribosomal 18S, pero todos se encontraron modificados en distintos grados, lo que podría estar relacionado con algún efecto en la célula dado por cambios en la concentración de óxido nítrico.

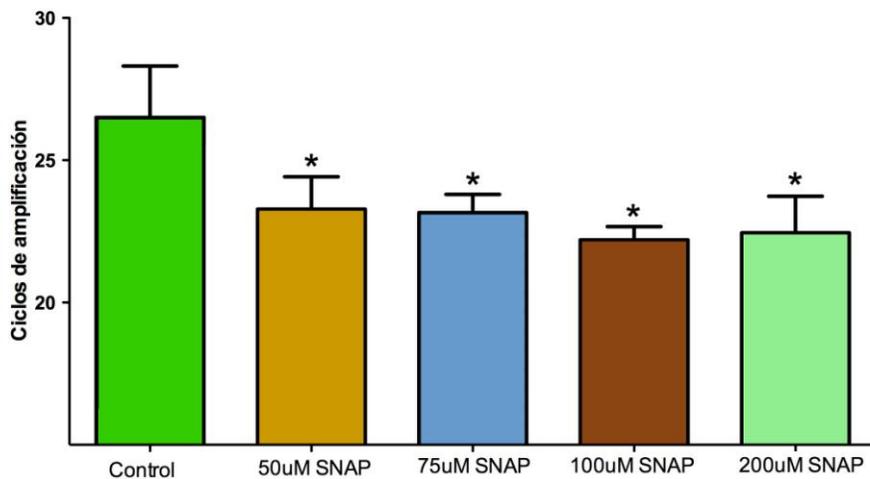


Fig 15. Determinación del número de copias del gen L. Los cultivos de MφP fueron tratados con distintas concentraciones del donador de óxido nítrico (SNAP) durante 12 hrs. Se extrajo el ARN total y se cuantificó por PCR en tiempo real, el número de copias del mRNA L del HRSV. Los resultados que se muestran son el promedio de 5 experimentos independientes y las diferencias significativas se denotan con * ($p < 0.05$).

El efecto del óxido nítrico en la multiplicación del HRSV se comprobó por medio de Northern Blot. Esta técnica permite el análisis de fragmentos más grandes de los genes de interés, así como la identificación de RNA genómico (gRNA), RNA mensajero (mRNA) y antigenoma, que es la cadena de RNA complementaria al ARNg y que se sintetiza como precursor de la cadena molde en el proceso de replicación del HRSV. El análisis de los datos por Northern Blot se realizó en el Laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología de la Escuela de Medicina de Boston University en Massachusetts bajo la dirección de la Dra. Rachel Fearn, cuya línea principal de investigación es el estudio de la replicación y transcripción del HRSV. En la figura 16 se observa un incremento de manera dosis-dependiente (a la concentración del donador) en la expresión del mRNA del gen N del virus y del antigenoma. Al encontrar la misma tendencia de incremento del antigenoma, aunque en menor intensidad que el mRNA, podemos concluir que tanto la replicación como la transcripción del virus se encuentran incrementadas.

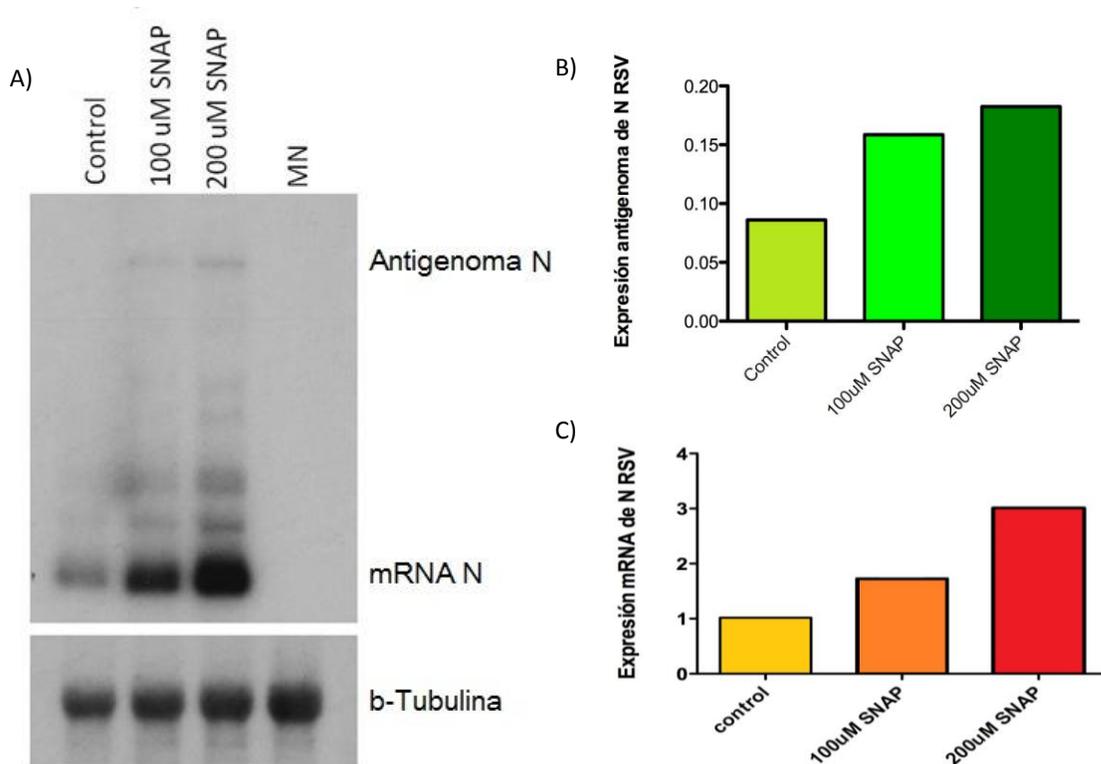


Fig 16. Confirmación del efecto del óxido nítrico en la multiplicación del HRSV. Los cultivos de MφP fueron tratados con distintas concentraciones del donador de óxido nítrico (SNAP) durante 12 hrs. A) Se extrajo el RNA total y se determinó por Northern Blot la expresión del mRNA y el antigenoma. El análisis densitométrico de los blots confirmó la expresión incrementada de B) el antigenoma de N y C) El mRNA de N. Los MφN se utilizaron como control del experimento.

5) Determinación de la expresión de la proteína NOS II

En el artículo de Morin y colaboradores (1994) se comprueba que el óxido nítrico generado de manera exógena a partir de diversos compuestos químicos, es capaz de inhibir la actividad de la NOS II, con lo que se evita la formación de óxido nítrico endógeno y que es precisamente el NO endógeno el que actúa como antiviral. En nuestros resultados observamos que al generar óxido nítrico de manera exógena con el SNAP se favorece la replicación del HRSV y que este efecto es completamente opuesto al encontrado con el óxido nítrico generado de manera endógena con la bacteria; por lo que nos preguntamos si el SNAP puede inhibir la expresión de la NOS II y por lo tanto la generación de NO endógeno, lo que podría explicar las diferencias en la multiplicación del HRSV con respecto a la

fuentes de generación de óxido nítrico. Sin embargo, el análisis por western blot de las proteínas celulares no mostró diferencias en la expresión de la NOS II (Fig. 17). Cabe mencionar que este ensayo solo nos permitió, como se mencionó anteriormente, determinar cambios en los niveles de expresión de la proteína, sin embargo, es necesario realizar el ensayo de manera tal que sea posible encontrar cambios en la activación de la enzima u otras alteraciones que puedan explicar el resultado tan controversial que se obtuvo.

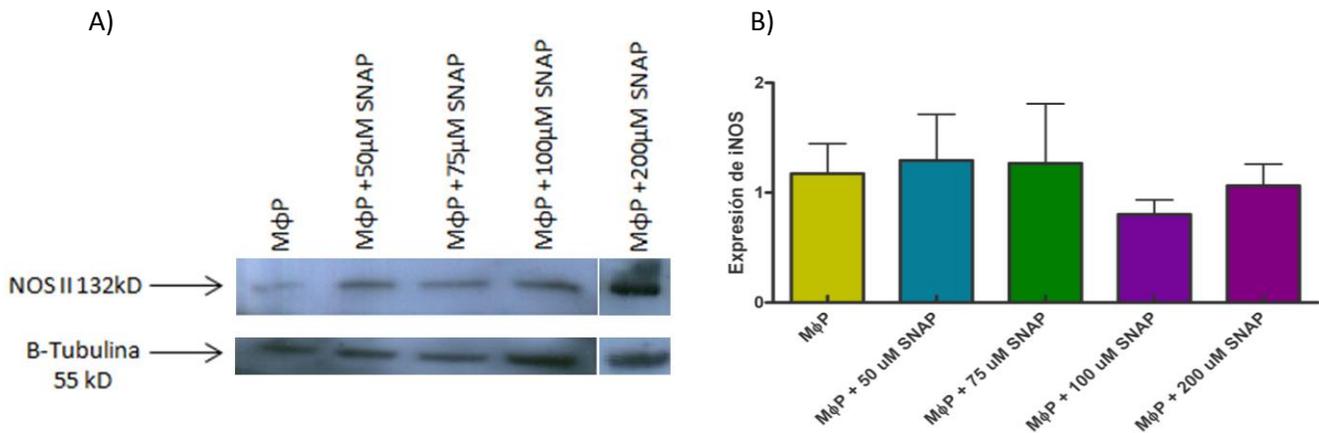


Fig 17. Determinación del efecto del donador en la expresión de la NOS II. Los cultivos de MφP fueron tratados con distintas concentraciones del donador de óxido nítrico (SNAP) durante 12 hrs. A) Se extrajeron las proteínas celulares y por Western Blot se determinó la expresión de la proteína NOS II. B) El análisis densitométrico muestra el promedio de 4 determinaciones independientes.

6) Análisis de la expresión del antígeno viral

Dado que se observó un incremento significativo de la replicación y transcripción del HRSV, decidimos determinar si también existía incremento en la traducción del genoma viral, con lo que se observaría un aumento en la expresión del antígeno viral en las células. Este experimento se realizó tratando los macrófagos infectados persistentemente con diferentes concentraciones del donador y analizando por citometría de flujo con un anticuerpo policlonal acoplado a FIT-C la expresión total de dos proteínas virales: la proteína N que se encuentra

en el citoplasma de la célula y la proteína F que se localiza anclada a la membrana celular. En la figura 18 A se demuestra que los tratamientos con el donador no alteran el porcentaje de células que expresan antígeno viral, mientras que en B, se muestra que la intensidad de fluorescencia cambia significativamente en uno solo de los tratamientos, lo que significa que la expresión de estas 2 proteínas virales se aumenta únicamente al adicionar 50 $\mu\text{M}/\text{ml}$ de SNAP en el cultivo.

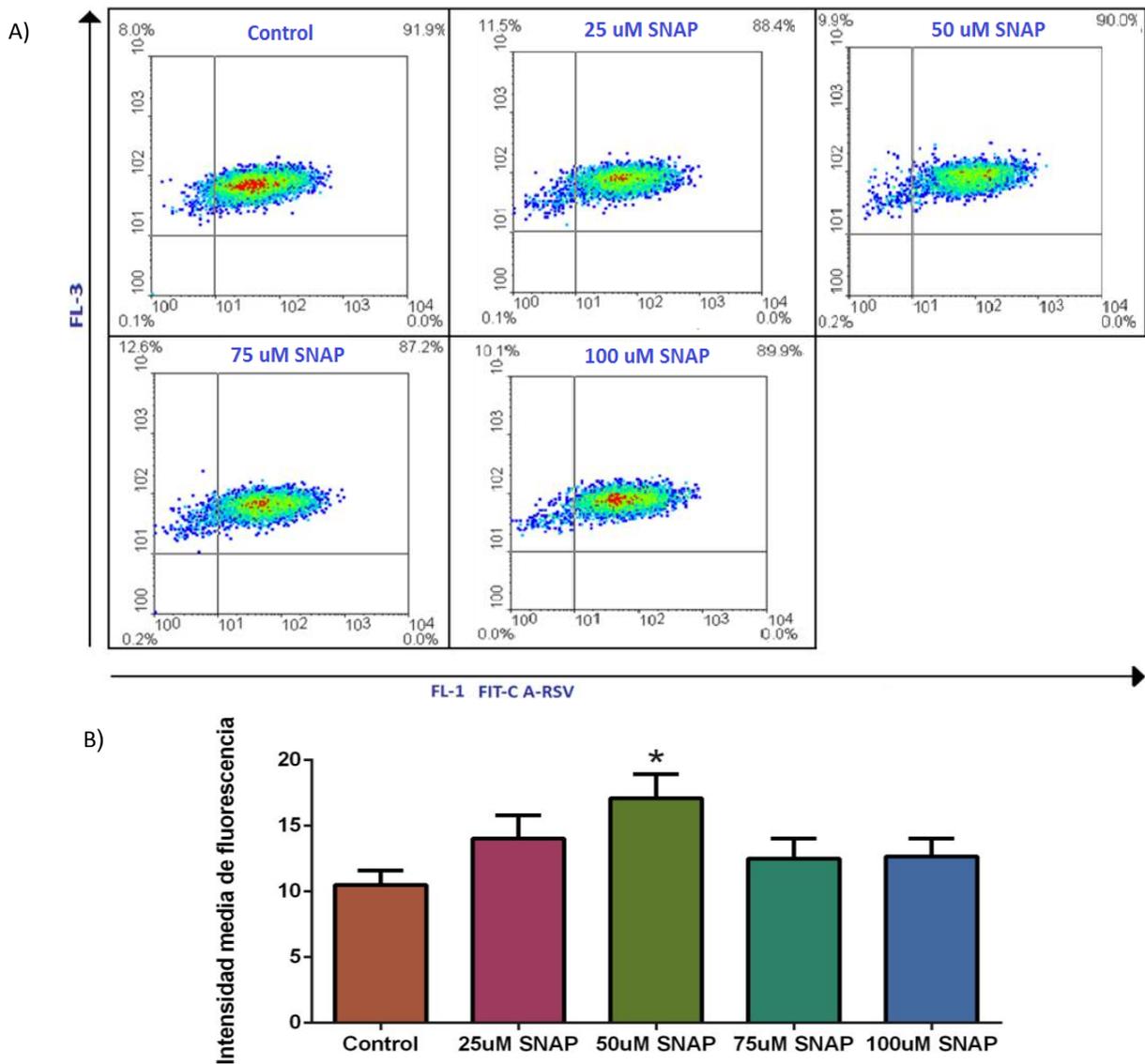
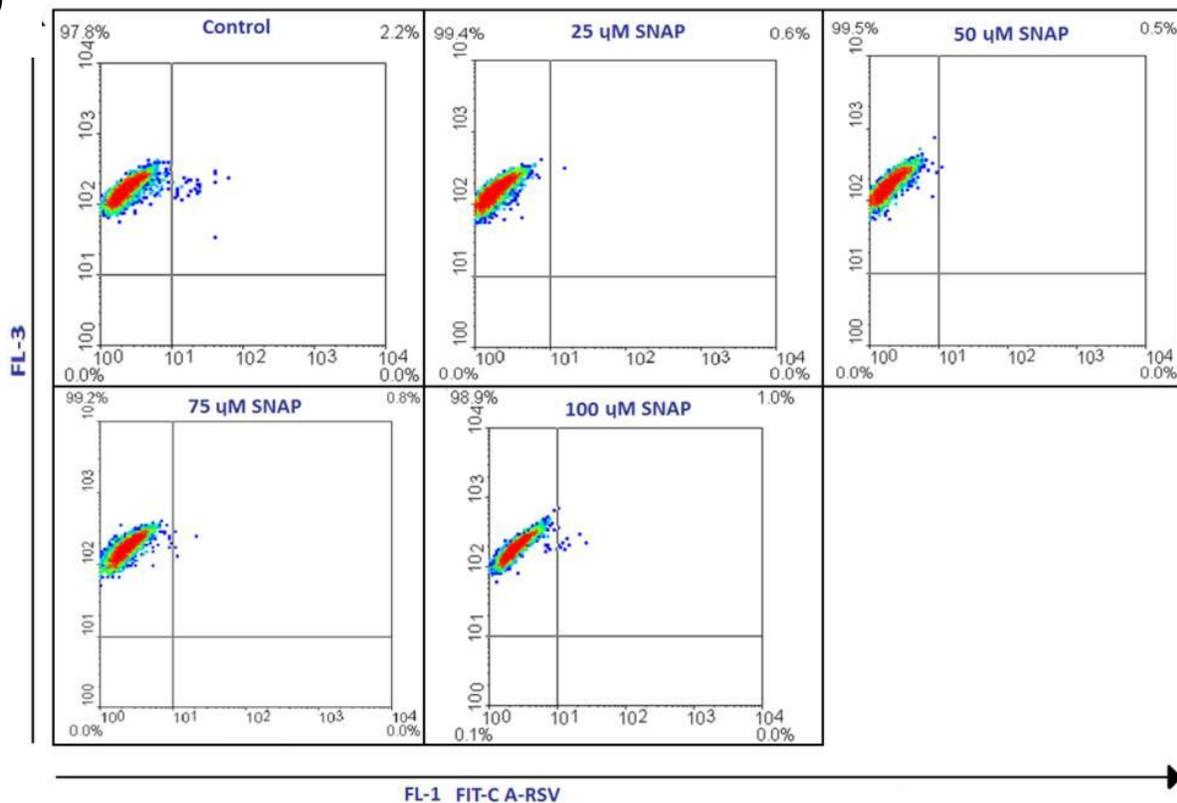


Fig 18. Determinación del efecto del donador en la expresión del antígeno viral. Los cultivos de M ϕ P fueron tratados con distintas concentraciones del donador de óxido nítrico (SNAP) durante 12 hrs. Por inmunofluorescencia directa por citometría de flujo se analizó la expresión del antígeno viral. A) Porcentaje de células que presentan el antígeno viral. B) Intensidad de fluorescencia del antígeno viral.

7) Titulación del Virus infeccioso presente en sobrenadante

Al encontrar diferencias en la expresión de proteínas virales únicamente en uno de los tratamientos, nos preguntamos si existía la posibilidad de que el incremento en la replicación del virus se viera reflejado en el aumento de partículas virales infecciosas en el sobrenadante, es decir, el virus se replica, se traduce, se ensambla y gema al medio extracelular, lo que podría explicar tanto el incremento en el número de copias del genoma, como la ausencia de cambios en la intensidad de fluorescencia del antígeno viral. Por esta razón, se recolectaron los sobrenadantes de todos los cultivos de MφP tratados con el donador en diferentes concentraciones y se tituló el virus infeccioso presente en ellos en células HEp-2 (Fig. 19).

A)



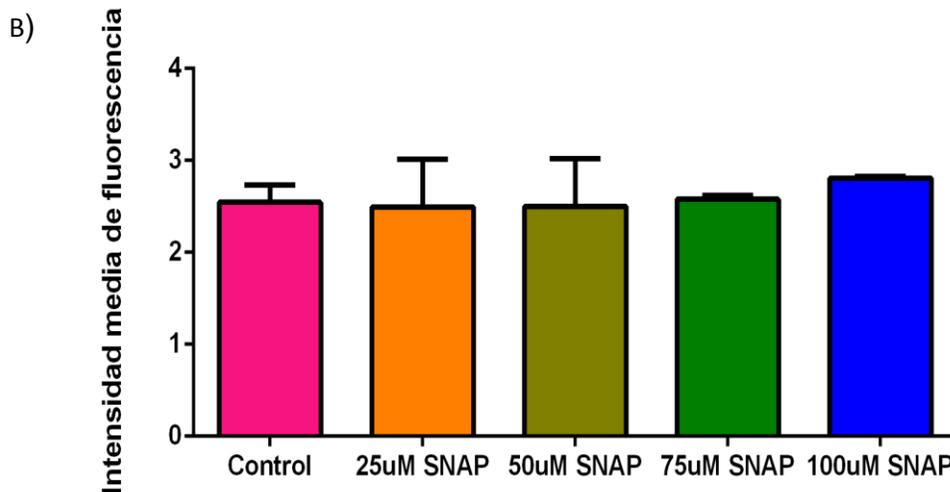


Fig 19. Titulación del virus infeccioso extracelular. Las células HEp-2 fueron infectadas con los sobrenadantes provenientes de los MφP tratados con distintas concentraciones del donador de óxido nítrico (SNAP). A) El porcentaje de células fue determinado por citometría de flujo a las 24 horas post-infección. B) Intensidad de fluorescencia del antígeno viral.

El análisis se realizó por $TCID_{50/ml}$ e inmunofluorescencia directa por citometría de flujo a 24 horas post-infección. Sin embargo, por $TCID_{50/ml}$ no se observó efecto citopático, por lo que fue imposible determinar el título viral (datos no mostrados). En el caso de la inmunofluorescencia directa, como se muestra en la figura 11, no se encontró incremento en el virus infeccioso extracelular medido por porcentaje de células que presentan el antígeno viral (A) y por intensidad de fluorescencia (B), lo que tomando en cuenta los resultados anteriores, sugiere que el óxido nítrico incrementa únicamente la replicación y transcripción de manera dosis-dependiente, pero no así la traducción, en cuyo caso se incrementa solo bajo determinadas condiciones, lo que podría explicar la ausencia de partículas virales infecciosas. Otra posibilidad es que el ambiente oxidante de la célula generado por el donador podría afectar la estabilidad de las proteínas virales, impidiendo el ensamblaje de las cápsidas virales y por lo tanto, su gemación al medio extracelular. Estas afirmaciones deberán ser confirmadas.

8) Determinación de la presencia de partículas virales defectivas en el sobrenadante

Dado que nosotros observamos incremento en la replicación, la transcripción y bajo ciertas condiciones, la traducción del HRSV, pero no así incremento en virus infectivo extracelular, planteamos la posibilidad de la generación de partículas defectivas en nuestros cultivos como respuesta al incremento en la concentración de óxido nítrico; dicho de otra manera, el SNAP favorece la generación de partículas virales defectivas.

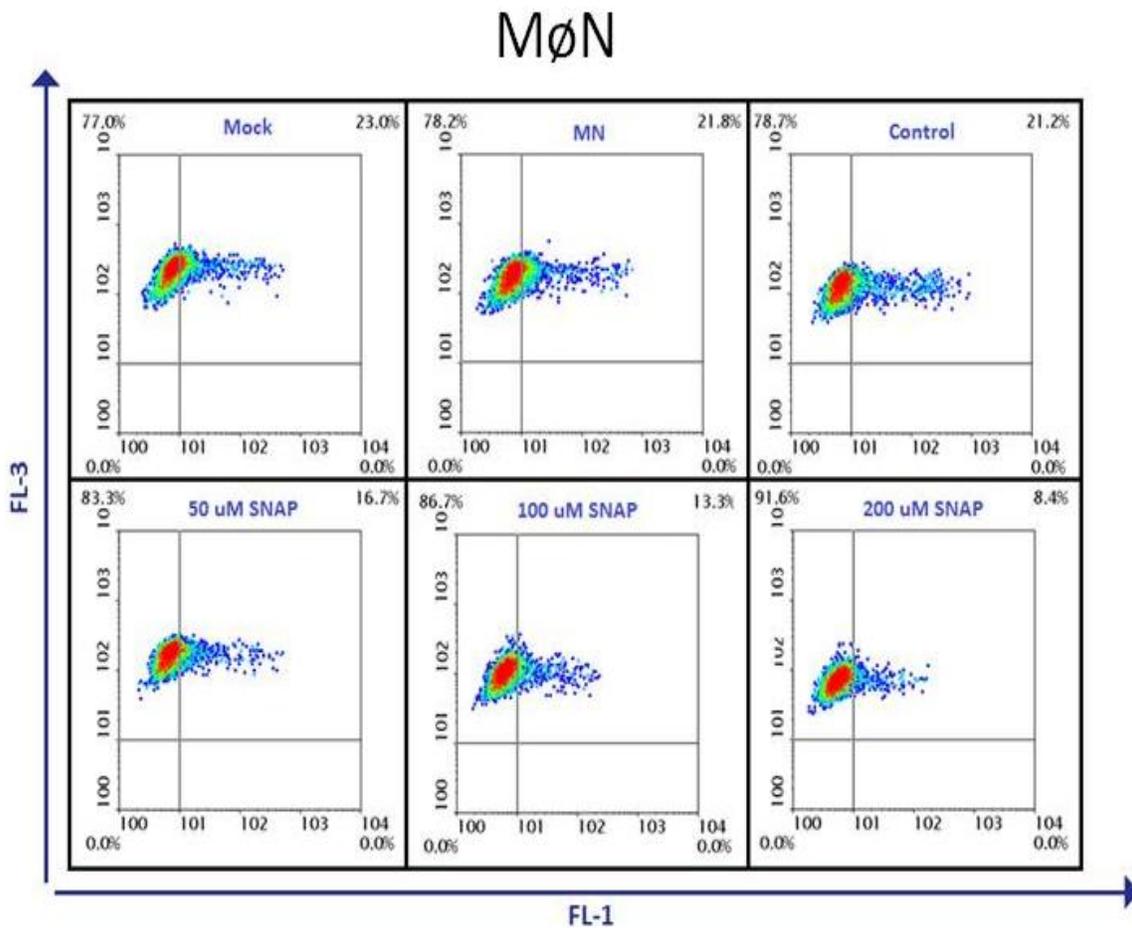
Nos inclinamos por esta hipótesis ya que, se ha demostrado que las partículas virales defectivas necesitan mantener determinadas secuencias en cis implicadas en procesos de replicación (como sitios de reconocimiento por parte de la RNA polimerasa dependiente de RNA [RdRp], sitios de unión con factores del huésped o zonas promotoras para la síntesis de las cadenas complementarias) generalmente localizadas en los extremos 5' y 3' del genoma parental (Knorr *et al.*, 1991; Resende *et al.*, 1991; Inove-Nagata *et al.*, 1998; Finnen y Rochon 1993; Chang *et al.*, 1995; Havelda y Burgyán 1995; Pogany *et al.*, 1997 Mawassi *et al.*, 1995), lo que explicaría el incremento en la expresión de los genes virales que nosotros estudiamos y que se encuentran localizados en los extremos 3' y 5' del genoma viral.

Por otro lado, se ha observado que las partículas defectivas confieren protección a la célula ante reinfecciones con el virus silvestre u otros virus, ya que bloquean los receptores de unión al virus y compiten con el virus completo por los factores necesarios para la replicación, por lo que también interfieren a este nivel.

Existen varios métodos para comprobar esta nueva hipótesis; entre ellos destacan: la determinación de la interferencia en la adhesión del virus parental a los receptores celulares, la determinación de la existencia de partículas defectivas por gradiente de separación y la determinación en la interferencia en la replicación del virus parental; nosotros decidimos utilizar el último método mencionado y

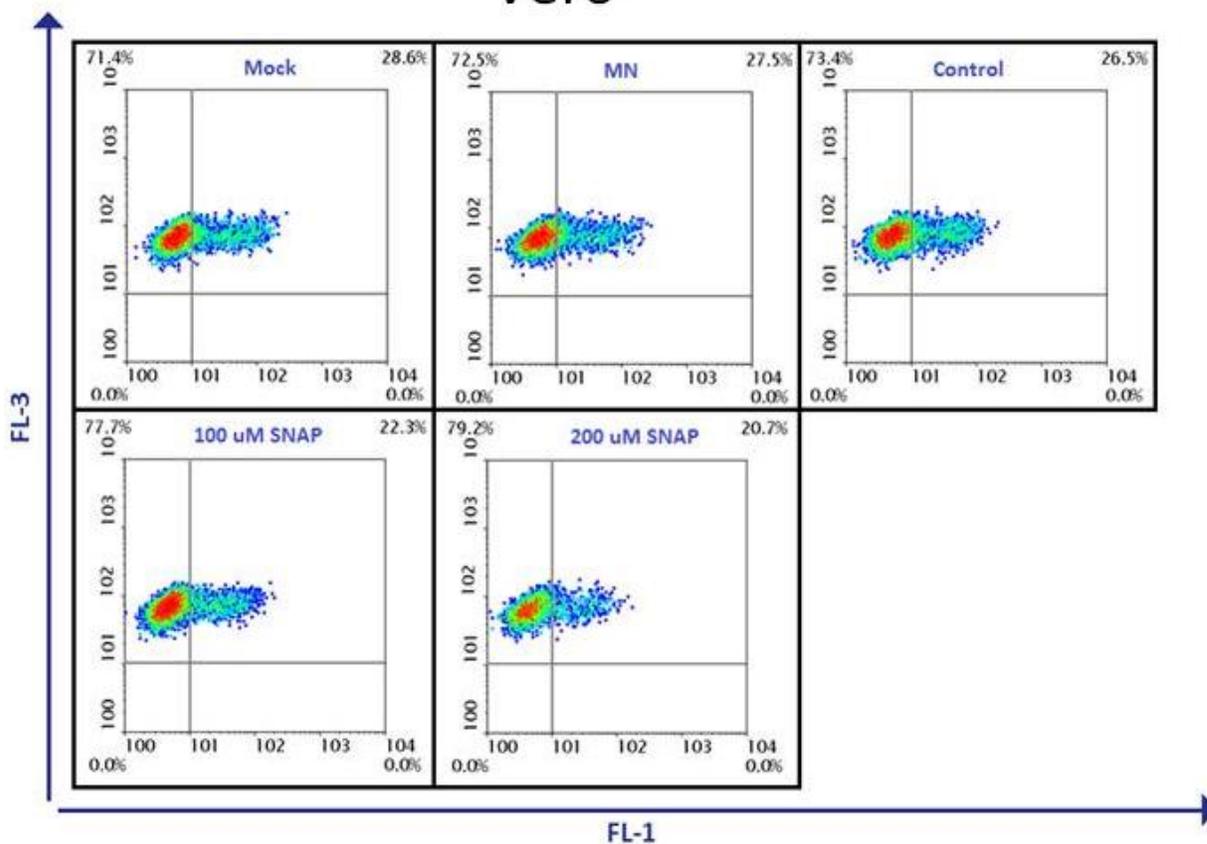
realizar el análisis mediante la determinación de expresión del antígeno viral por citometría de flujo. Para esto, se incubaron durante 2 horas macrófagos testigo con los sobrenadantes de los macrófagos persistentes tratados con SNAP y posteriormente se infectaron con virus silvestre a multiplicidad de infección de 2 y el antígeno viral se determinó a las 24 horas posteriores a la infección (Fig. 20).

A)



Vero

B)



C)

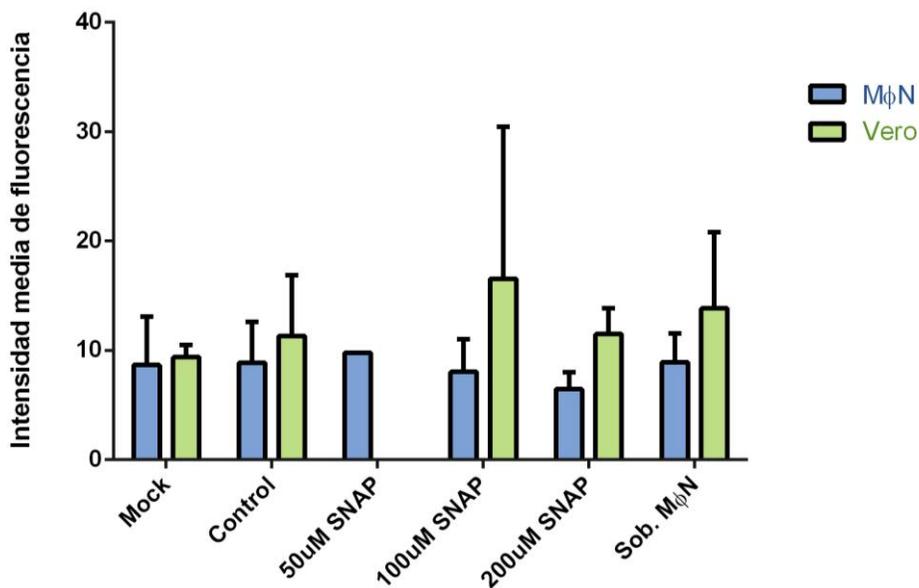
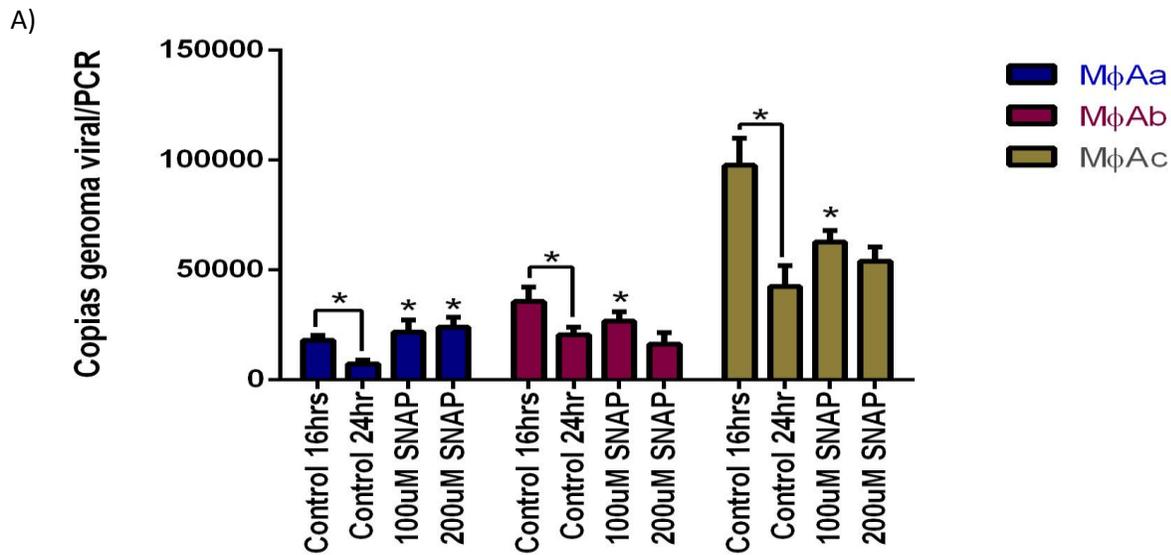


Fig 20. Determinación de la generación de partículas defectivas. Los MφN y las células Vero fueron incubadas con los sobrenadantes provenientes de los MφP tratados con distintas concentraciones del donador de óxido nítrico (SNAP) y posteriormente infectadas con HRSV silvestre moi 2. El porcentaje de células fue determinado por citometría de flujo a las 24 horas post-infección. A) Porcentaje de MφN infectados B) Porcentaje de células Vero infectadas. C) Intensidad de fluorescencia del antígeno viral.

Como se muestra en la figura 20 A), en el caso de los macrófagos, el incremento en la concentración de SNAP se refleja en la disminución del porcentaje de células que expresan el antígeno viral; de 21.8% de células infectadas se disminuye a 8.4%; sin embargo, en B), se observa que el efecto no es igual en órdenes de magnitud al realizar el experimento en células VERO; de 27.5% de células infectadas se disminuye a 20.7%. Esto podría deberse a diversos factores solubles presentes en los sobrenadantes como interferón y otras citocinas además del óxido nítrico y las partículas defectivas. Muchos de estos factores, entre ellos el interferón son especie específicos, por lo que al tratar la línea celular murina con los sobrenadantes provenientes de la misma línea celular, todos estos factores que puedan encontrarse presentes en los sobrenadantes podrían afectar la entrada del virus a las células, esta especificidad de los factores explicaría la disminución tan drástica en el porcentaje de macrófagos infectados y también explicaría el efecto de disminución tan bajo en células VERO que es una línea celular de mono, pero no descarta la existencia de partículas defectivas en los sobrenadantes. Al analizar los resultados, no se encontraron diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia (C).

9) Determinación del efecto del óxido nítrico exógeno en infecciones agudas

Finalmente decidimos analizar si el efecto observado en cultivos infectados persistentemente se presentaba también en cultivos infectados de manera aguda. Para la realización de este experimento, se igualaron en medida de lo posible, las características de los cultivos persistentes, es decir, las células testigo se infectaron con el HRSV y se permitió el avance del ciclo replicativo del virus durante 16 horas, posteriormente, se adicionó el donador SNAP en diferentes concentraciones; se extrajo el RNA total y se cuantificó por RT-PCR en tiempo real el número de copias del genoma viral (Fig. 21).



B)

Ensayo	Nitritos μM
MφA 16 hrs	24.448
MφA 24 hrs	27.899
MφA 24 hrs + 100uM SNAP	64.203
MφA 24 hrs + 200uM SNAP	82.058

Fig 21. Determinación del efecto del óxido nítrico exógeno en infecciones agudas. Los MφN fueron infectados de manera aguda (MφA) con VSR silvestre moi 2 y posteriormente tratados con el donador SNAP en distintas concentraciones. A) El RNA total fue extraído y se determinó el número de copias del genoma viral por RT-PCR en tiempo real. B) Concentración de nitritos presentes en el cultivo. Las diferencias significativas se denotan con * ($p < 0.05$).

Encontramos que a las 16 horas post-infección existe un pico de replicación del virus que disminuye a las 24 horas, lo que concuerda con el ciclo normal de replicación del virus en una infección aguda. De manera interesante, al adicionar el SNAP encontramos que se incrementa tanto la concentración de NO (Tabla 21 B) como la replicación del HRSV, con respecto a los niveles de replicación observados a las 24 hrs p.i. (Fig. 21 A). Con esto comprobamos que el efecto del óxido nítrico exógeno no es exclusivo para las infecciones persistentes.

DISCUSIÓN

La participación del óxido nítrico como molécula antiviral se ha reportado ampliamente en infecciones virales agudas, con distintas especies virales y en diversas estirpes celulares (Jung *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2009; Ramos-Castañeda *et al.*, 2008; Klinström *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 1997), pero existen muy pocos reportes de este mismo efecto en infecciones persistentes.

En estudios previos realizados en el laboratorio de la Dra. Gómez se encontró evidencia de que la continua expresión del RNA genómico del HRSV en una infección persistente, induce el incremento en la transcripción del mRNA de la proteína NOS II con respecto a macrófagos sin infectar y este incremento es equiparable al observado durante una infección aguda; sin embargo, tanto los niveles de expresión de la enzima como la producción de óxido nítrico en una infección persistente, son similares a los observados en macrófagos testigo, lo que sugiere una posible regulación post-transcripcional del mRNA de la NOS II por parte del virus como estrategia para su supervivencia a largo plazo dentro de la célula (Santiago, 2008). Estos hallazgos nos llevaron a hipotetizar que la presencia de un estímulo externo en los cultivos de macrófagos infectados persistentemente con HRSV tendría como resultado el incremento en la síntesis de óxido nítrico y se observaría el efecto antiviral reportado en la literatura.

La bacteria gram negativa *H. influenzae* no tipificable inactivada, en co-cultivo con los macrófagos infectados persistentemente, actúa como un inductor de la producción de la enzima NOS II y por lo tanto de la síntesis de óxido nítrico (Nitritos Fig. 10 Tabla). El efecto que nosotros observamos al realizar los experimentos de esta manera fue precisamente de reducción en la multiplicación del virus sincitial respiratorio y confirmamos la participación del óxido nítrico como molécula antiviral al utilizar el compuesto L-NAME, que es un inhibidor de la producción de NO, con el que se observa un incremento considerable en la replicación del virus (Fig. 10 gráfica). Sin embargo, es necesario tomar en

consideración que la respuesta de incremento en la producción de óxido nítrico, no es la única que se presenta en un macrófago ante una infección de tipo bacteriana.

La activación clásica de los macrófagos se desarrolla en respuesta a dos estímulos o señales. La primera señal es dada por interferón gamma (INF γ) y la segunda señal es provista por “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPS por sus siglas en inglés) (Harding *et al.*, 2003), éstos son secuencias repetidas de moléculas que se encuentran en la superficie de muchas bacterias; entre los PAMPS se encuentran el lipopolisacárido bacteriano (LPS), ácido lipoténico (LTA) peptidoglucanos, etc. Los PAMPS estimulan la activación del macrófago a través de receptores tipo Toll (TLRs) y receptores de reconocimiento de patrones (PPRs), con lo que se produce TNF (Van Ginderachter *et al.*, 2006; Delbridge y O’Riordan 2007), se activa la cascada del complemento, se induce apoptosis y se activa la secreción de citocinas (Martinon y Tschopp, 2007; Franchi *et al.*, 2006) entre otros efectos; específicamente, se ha observado que la expresión de 977 genes se encuentra alterada en macrófagos que han sido estimulados con bacterias tanto gram positivas como gram negativas y entre los genes afectados se incluyen los codificantes para citocinas proinflamatorias y quimiocinas (Nau *et al.*, 2002). De modo que los resultados obtenidos con la bacteria no pueden atribuirse únicamente al efecto del óxido nítrico y podrían deberse a la acción sinérgica de distintas vías activadas en el macrófago.

Se ha reportado que la línea celular P388D1 no responde al estímulo ante LPS (Barbour, 1998), por lo que para eliminar el efecto sinérgico de otras vías que podrían encontrarse activadas por la presencia de la bacteria y así poder determinar de manera específica el efecto del óxido nítrico en la multiplicación del HRSV, decidimos añadir al cultivo un donador exógeno de NO. El donador que utilizamos es el compuesto químico S-Nitroso N-Acetil-DL-Penicilamina (SNAP) que pertenece al grupo de los nitrosotioles y que se ha utilizado como donador de

óxido nítrico tanto en macrófagos como en otras líneas celulares (Jung *et al.*, 2010; Xing y Schat, 2000).

Primero comprobamos que el óxido nítrico se incrementa de manera dosis dependiente a la concentración de donador adicionado a los cultivos de M ϕ N y M ϕ P con relación a los cultivos en los que no se colocó el donador (Fig. 11).

Dado que el óxido nítrico en concentraciones altas (en el rango de 1 μ M) puede conducir a apoptosis y senescencia celular (Thomas *et al.*, 2008) se evaluó el efecto del SNAP en la viabilidad celular mediante la tasa de reducción del MTT y encontramos que el porcentaje de células muertas se incrementa de manera dosis-dependiente a la concentración del donador de NO (Fig. 12); esto nos habla de un posible estado de estrés nitrosante presente en la célula debido al SNAP que habrá que tomar en cuenta para el análisis de los resultados obtenidos en el futuro.

En cuanto al mecanismo antiviral esperado por el incremento en el NO, sorpresivamente observamos que el efecto fue completamente opuesto; el óxido nítrico producido de manera exógena con el donador SNAP incrementó la replicación y la transcripción del HRSV. El efecto tanto en la replicación como en la transcripción se observó mediante RT-PCR en tiempo real a través del aumento en la expresión del gen viral N para replicación y el mRNA de L para transcripción (Figs. 14 y 15). Mediante ensayos de Northern blot se observó el incremento en la transcripción del mRNA de N y también se observó aumento en la síntesis de antígeno, que es la cadena complementaria al RNA genómico del HRSV y que se sintetiza como precursor de la misma en el proceso replicativo del HRSV (Fig. 16), lo que confirma el aumento en replicación y transcripción del HRSV.

El efecto antiviral del óxido nítrico se ha asociado en diversos virus con la nitrosilación de proteasas virales en residuos de cisteína, lo que hace que éstas

pierdan sus funciones y por lo tanto no se lleve a cabo de manera eficiente el ciclo replicativo del virus (Saura *et al.*, 1999; Guy *et al.*, 1991; Ma *et al.*, 1994; Persichini *et al.*, 1998). Otro blanco de la nitrosilación de residuos de cisteína son las replicasas virales, en cuyo caso, el NO induce cambios conformacionales en la proteína que impiden que éstas puedan unirse al genoma viral y realizar sus funciones de replicación y transcripción (Persichini *et al.*, 1999; Chavan *et al.*, 1995; Kameoka *et al.*, 1996; Loya *et al.*, 1997). También se ha observado que el NO puede regular la reactivación del virus de Epstein-Barr mediante la interacción con el factor de transcripción viral Zta. Zta se une a los elementos ZI y ZII que conforman un dominio similar a AP-1 dentro del promotor del gen viral BZLF1; la expresión de BZLF1 es suficiente para inducir un cambio en el proceso infeccioso del virus que lo lleva de un estado latente a un estado lítico (Chevallier-Greco *et al.*, 1986; Abate *et al.*, 1990; Flemington y Speck, 1990).

Se han descrito además otros mecanismos en los que participa el óxido nítrico en el efecto antiviral durante el curso de la infección (Colasanti *et al.*, 1999), sin embargo, existen muy pocos reportes en los que se asocia la producción de óxido nítrico con un incremento en la multiplicación de los virus. Existe un reporte del virus de inmunodeficiencia humana en el que se ha observado que la síntesis de óxido nítrico en bajas cantidades (0.1 - 1 μM) incrementa la replicación del virus; sin embargo, en el mismo artículo se menciona que el incremento en la cantidad de óxido nítrico resulta en la inhibición de la replicación viral (Blond *et al.*, 2000); por otro lado, no podemos equiparar nuestros resultados a este trabajo, ya que las concentraciones que denominan altas y que están alrededor de 10 μM , son concentraciones en las que no se observan cambios significativos en nuestro estudio (datos no mostrados); además al incrementar aún más la concentración de SNAP, se esperaría un efecto inhibitorio en la replicación del HRSV, sin embargo, siempre obtuvimos incremento en la expresión de genes virales incluso utilizando 500 μM de SNAP (datos no mostrados) y decremento en el porcentaje de células viables.

El efecto antiviral del óxido nítrico se ha asociado principalmente a la producción endógena del mismo por la enzima NOS II, y está ampliamente descrito que uno de los mecanismos que utiliza la célula para protegerse del daño nitrosante y oxidante causado por la generación de radicales libres en respuesta a un estímulo externo como las infecciones virales o bacterianas, es la regulación de la expresión de la NOS II a través del mismo óxido nítrico producido, es decir, la enzima puede autorregularse dependiendo de la cantidad de óxido nítrico presente en el ambiente celular (Morin *et al.*, 1994), de modo que es posible que este mecanismo esté presente en nuestro sistema y que el incremento en el óxido nítrico exógeno resulte en la inhibición de la expresión de la NOS II y por lo tanto, la producción del NO endógeno se encuentre abatida y con ello el efecto antiviral.

Para comprobar esta hipótesis, analizamos la expresión de la NOS II por Western blot en los cultivos de MφP tratados con diferentes concentraciones de SNAP. En nuestros experimentos encontramos todas las bandas en el mismo nivel de peso molecular que corresponde a 132 kDa y que es el reportado en la literatura para la NOS II, pero no encontramos diferencias en los niveles de expresión de la proteína (Fig. 17). Sin embargo, estas observaciones en los niveles de expresión de la NOS II no proveen información sobre posibles modificaciones post-traduccionales de la proteína, tales como fosforilaciones, cambios conformacionales, nitrosilaciones, etc., que pudieran afectar la eficiencia en la actividad enzimática, de modo que es necesario analizar en experimentos posteriores para analizar las posibles alteraciones ocurridas en la proteína por el estrés nitrosante.

Nuestros resultados sugieren que el incremento en la concentración del óxido nítrico proveniente de una fuente exógena, induce aumento en la replicación y transcripción del HRSV en macrófagos infectados de manera persistente y que este efecto no está dado por la regulación de la expresión de la NOS II, de modo

que el punto de interés ahora es determinar si el resultado obtenido en la replicación viral se refleja en incremento en la expresión de proteínas virales y en virus infeccioso extracelular, es decir, el virus se replica más y por lo tanto deberá haber más proteínas virales y más progenie viral.

Tanto el análisis de proteínas virales, como la detección de virus infecciosos en sobrenadante se realizaron con inmunofluorescencia directa por citometría de flujo. Para ambos experimentos se utilizó un anticuerpo policlonal que detecta el antígeno viral, en nuestro caso, dos proteínas: la proteína N de la nucleocápside del virus que se localiza en citoplasma y la proteína F de fusión, que en el ciclo replicativo se encuentra anclada a la membrana celular; los resultados muestran que no hay diferencias significativas en el porcentaje de células que presentan el antígeno viral (Fig. 18 A) y tampoco en el porcentaje de células infectadas con los virus presentes en los sobrenadantes de MφP tratados con SNAP (Fig. 19 A). En cambio, se observa un incremento en la intensidad de fluorescencia del antígeno viral cuando las células son tratadas con 50 μ M de SNAP, aunque el cambio es mínimo, es significativo; esto quiere decir que hay más antígeno viral en este tratamiento (Fig. 18 B), sin embargo, desconocemos la razón de este hallazgo, ya que a nivel de mRNA no se encontraron cambios significativos en estas condiciones.

Es posible que se active algún mecanismo de regulación de la traducción por el estrés nitrosante en presencia de altas concentraciones del donador y que en concentraciones bajas de NO este mecanismo no se encuentre estimulado, otra posibilidad es que a concentraciones mayores de NO, se induce un estado de estrés nitrosante en la célula, lo que conlleva al daño generalizado y por lo tanto, los mecanismos de traducción proteica de la célula se encuentran comprometidos; por otro lado, en la intensidad de fluorescencia presente en las células tratadas con sobrenadantes no se observan cambios (Fig. 19 B).

Analizando todos los datos, asumimos que el efecto del óxido nítrico en el ciclo de vida del HRSV es a nivel de incremento en la transcripción, replicación y bajo ciertas condiciones en la traducción, ya que solo se observa aumento en la síntesis de proteínas virales en una concentración determinada de NO, sin embargo, no se observa presencia de progenie viral infectiva en el medio extracelular.

En los virus cuyo material genético es una cadena de RNA como el HRSV, la replicación se da mediante la síntesis de cadenas complementarias (antigenoma) que son usadas posteriormente como plantados para la generación de nuevas copias del genoma. Además, la síntesis de cada molécula de RNA requiere del reclutamiento de una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) en el extremo 3' del plantado. Una característica importante de las RdRps es que son notoriamente propensas a producir errores, por lo que los virus de RNA están potencialmente sujetos a alteraciones catastróficas debidas a su propia maquinaria de síntesis (Virology. Principles and Applications).

Se estima que la tasa de error de la RdRp viral está entre 1.5×10^{-3} bp-1 (Fago Q β) y 7.2×10^{-5} bp-1 (Influenza virus) (Drake, 1993). Esta baja fidelidad de la polimerasa es un factor importante en la biología de los virus de RNA, ya que provee una fuente de diversidad para las secuencias genómicas, lo que permite la formación de cuasiespecies virales capaces de adaptarse a ambientes evolutivos (Domingo *et al.*, 2000).

Uno de los principales mecanismos que utilizan los virus de RNA para establecer infecciones persistentes con sus hospederos *in vivo* e *in vitro* (Poidinger *et al.*, 1991; Liao *et al.*, 1998) es la alteración de la replicación y transcripción, es decir, la replicasa viral durante la síntesis de la nueva cadena puede “saltar” a otro lugar de la misma cadena molde continuando así la síntesis de la nueva cadena en otra posición, o bien traslocarse a otro molde distinto

(Lazzarini *et al.*, 1981; Makino *et al.*, 1988), lo que resulta en una infección no lítica que produce virus incompetentes o defectivos (Huang y Baltimore, 1970; Brinton, 1982; Poidinger *et al.*, 1991; Meyer and Southern, 1997; Sarmiento *et al.*, 2002). Este mecanismo está en concordancia con diversos estudios que muestran que la replicación continua de los virus lleva a la generación de partículas defectivas que proceden de deleciones y/o reorganizaciones del genoma viral aunadas a la tasa de error de la replicasa viral.

De manera general, se han propuesto 3 mecanismos de formación de partículas defectivas: 1) la recombinación homóloga, en donde el genoma defectivo no contiene secuencias alteradas del genoma original o parental; 2) la recombinación homóloga aberrante, en donde el genoma defectivo conserva una gran similitud con el genoma original, sin embargo, contiene modificaciones como mutaciones, deleciones o inserciones en los sitios donde se ha producido la recombinación y, 3) la recombinación heteróloga, que es producida por la combinación entre genomas virales distintos o entre el genoma viral y el genoma de la célula hospedera (King, 1988; Lai, 1992).

De manera interesante, se ha observado que las partículas virales defectivas necesitan mantener determinadas secuencias en *cis* implicadas en procesos de replicación generalmente localizadas en los extremos 5' y 3' del genoma parental (Knorr *et al.*, 1991; Resende *et al.*, 1991; Inoue-Nagata *et al.*, 1998; Finnen y Rochon 1993; Chang *et al.*, 1995; Havelda y Burgyán 1995; Pogany *et al.*, 1997 Mawassi *et al.*, 1995), y además, al conservar estos sitios y carecer de secuencias que le permiten transcribirse y traducirse eficientemente, obtiene ventajas replicativas sobre el genoma parental e impide que este último lleve su proceso replicativo de manera normal.

Con base en los resultados de incremento en la replicación del HRSV por la presencia de NO en los cultivos y tratándose de una infección persistente, además

de no obtener progenie viral infectiva ni aumento en proteínas virales, es altamente probable que se favorezca la generación de genomas virales defectivos en nuestro sistema. En la figura 20 A podemos observar que el porcentaje de macrófagos testigo que lograron infectarse con el HRSV después de los tratamientos con los sobrenadantes de M ϕ P tratados con el donador, disminuye a medida que se incrementa la concentración de NO presente en el medio; este resultado sugiere que a medida que se incrementa el NO en los cultivos de M ϕ P, se favorece la generación de partículas virales defectivas que geman al medio extracelular y que al ponerse en contacto con macrófagos no infectados (M ϕ N), se unen a los receptores celulares impidiendo el posterior reconocimiento del HRSV completo por parte del macrófago, lo que resulta en la disminución de la infección y por lo tanto el porcentaje de células que presentan el antígeno viral disminuye. Sin embargo, cuando realizamos el mismo experimento en células VERO, el efecto de interferencia en la infección del virus completo es menor (Fig. 20 B).

Una de las posibles explicaciones para la discrepancia en los resultados es que la acumulación de genomas virales defectivos activa la cascada de señalización de interferón (IFN) (Kilip *et al.*, 2013; Ngunjiri *et al.*, 2012; Tapia *et al.*, 2013) y la subsecuente producción de citocinas, quimiocinas y otros factores solubles; por lo que en el sobrenadante de los M ϕ P deberán encontrarse tanto los virus defectivos como estos factores.

El interferón es una molécula especie-específica y al producirse en células murinas no tiene efecto en la línea celular epitelial VERO, ya que ésta proviene de mono verde; de manera que, al tratar a los macrófagos murinos con sobrenadantes de la misma línea celular, el IFN y las otras moléculas solubles actuarán de modo sinérgico con las partículas defectivas y el efecto de inhibición en la infección del virus parental será mayor. Las células VERO no responden al interferón, por lo que el efecto observado es menos drástico que en los

macrófagos, lo que sugiere que en realidad el efecto de inhibición de la infección del HRSV está dado posiblemente por interferón, sin embargo no se puede descartar la presencia de partículas virales defectivas. Para comprobar la generación de estas partículas y la presencia de interferón en los sobrenadantes, será necesario realizar experimentos más concluyentes.

En el caso de la intensidad de fluorescencia, no se encontraron diferencias en ambas líneas celulares (Fig. 20 C). Este resultado es concordante pues la intensidad de fluorescencia determina la cantidad de antígeno viral presente en cada tratamiento, que al haber sido inoculados todos los pozos con la misma multiplicidad de infección, la cantidad de antígeno no debería variar.

Otro aspecto importante que se analizó, fue el efecto del SNAP en infecciones agudas. Previamente se igualaron las características de los cultivos persistentes al infectar macrófagos testigo con el HRSV y permitir la replicación del genoma durante 16 horas; en ese momento se adicionó el SNAP y a las 24 horas post-infección se realizó la determinación de la carga viral por RT-PCR en tiempo real. A las 16 horas de infección encontramos un pico de replicación que descendió a las 24 horas. Este proceso es normal en una infección aguda, ya que a las 24 horas p.i. ya se encuentran activos muchos procesos celulares que se encargan de la eliminación del virus; lo interesante de estos resultados, es que una vez que se adiciona el donador, se rescata la replicación viral justo como sucede en una infección persistente (Fig. 21).

El mecanismo exacto por el cual se da la estimulación de la replicación viral, tanto en cultivos persistentes como en cultivos infectados de manera aguda, es incierto; sin embargo, hemos formulado algunas hipótesis que podrían explicar este fenómeno y que deberán ser probadas posteriormente.

Es un hecho que en los cultivos tratados con el donador se encuentra

alterado el balance redox porque al someter una célula a estrés oxidante y/o nitrosante se inducen cambios en proteínas, lípidos, carbohidratos e incluso ácidos nucleicos que resultan en la activación varias vías de señalización, entre ellas la de caspasas que conducen a apoptosis y en nuestros experimentos observamos que la viabilidad celular se reduce en función de la concentración de NO por lo que es muy probable que estas vías se encuentren activadas, además no logramos determinar algún mRNA celular cuya expresión fuera constante para utilizarlo como control endógeno y con base en su expresión, normalizar los datos obtenidos para el mRNA de la proteína viral L. Probamos GAPDH y β -actina, entre otros, y la expresión se encontraba alterada en relación a la concentración del donador (datos no mostrados), lo que nos habla de efectos negativos a nivel celular.

Por otro lado, la alteración del balance redox también puede conducir al arresto del ciclo celular, ya que al someter a la célula a condiciones oxidantes que producen daño generalizado se activan los mecanismos de reparación celular y como consecuencia el ciclo celular se detiene, y se ha demostrado que concentraciones altas de NO, del orden de micro moles, las células se arrestan en la transición de la fase G1 a la fase de síntesis vía la activación de p53 (Lu *et al.*, 2007). Muchos virus, entre ellos el HRSV poseen proteínas que inducen el arresto del ciclo celular también en la transición G1/S vía p53 (Bian *et al.*, 2012) y además, utilizan esta estrategia para disponer de una mayor cantidad de factores que le permitan replicarse con mayor eficacia. De modo que es posible que en nuestro modelo celular, tanto en la infección persistente como en las infecciones agudas, el incremento de la concentración de óxido nítrico, así como la misma presencia del virus, induzcan el arresto del ciclo celular, con lo que se favorece la replicación del HRSV; además tomando en cuenta las evidencias encontradas, es posible que este incremento en la replicación tenga como resultado la generación de partículas virales defectivas, lo que explicaría la falta de incremento en la expresión de proteínas virales y progenie viral infectiva en sobrenadantes.

CONCLUSIONES

- ✱ La infección persistente no afecta la producción basal de óxido nítrico; los niveles se mantienen muy similares a los observados en macrófagos no infectados.
- ✱ Tanto la bacteria HiNT como el donador SNAP incrementan la acumulación de óxido nítrico en los cultivos de MφN, MφP y MφA.
- ✱ El SNAP afecta la viabilidad celular de manera dosis-dependiente.
- ✱ El óxido nítrico endógeno producido por la bacteria, en conjunto con otros factores solubles, disminuye la replicación viral.
- ✱ El óxido nítrico producido de manera exógena con el donador SNAP induce la replicación y transcripción viral de manera dosis-dependiente y bajo ciertas condiciones incrementa la traducción de proteínas virales.
- ✱ El donador de óxido nítrico no afecta la expresión de la proteína NOS II.
- ✱ El incremento en el óxido nítrico no resulta en el incremento de virus infectivos extracelulares.
- ✱ La interferencia en la infección del HRSV completo puede deberse tanto a la presencia de partículas virales defectivas como a interferón en los sobrenadantes como consecuencia del incremento en la concentración de NO.
- ✱ El efecto del óxido nítrico en la replicación del VSR no es exclusivo de infecciones persistentes y se presenta también en infecciones agudas.

PERSPECTIVAS

- ✱ Analizar la participación tanto del HRSV como del NO en la progresión del ciclo celular.
- ✱ Confirmar la existencia de partículas defectivas en sobrenadantes mediante ensayos de separación de las partículas virales por gradiente.
- ✱ Determinar la presencia de factores solubles en sobrenadantes que participen en la interferencia de la infectividad del HRSV.

REFERENCIAS

- Abate, C., Patel, L., Rauscher, F. J. III., Curran, T. (1990). Redox regulation of FOS and Jun DNA-binding activity in vitro. *Science*, 249, 1157-61.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801.
- Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences*, 75(6), 639-53.
- Albakri, Q. A., Stuehr, D. J. (1996). Intracellular Assembly of Inducible NO Synthase Is Limited by Nitric Oxide-mediated Changes in Heme Insertion and Availability. *Journal of Biological Chemistry*, 271(10), 5414-21.
- Alberts, B., Jonson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. U.S.A: Garland Science.
- Ali-Ahmad, D., Bonville, C. A., Rosenberg, H. F., Domachowske, J. B. (2003). Replication of respiratory syncytial virus is inhibited in target cells generating nitric oxide in situ. *Frontiers in Bioscience*, 8, a48-53.
- Alvarez, R., Harrod, K. S., Shieh, W. J., Zaki, S., Tripp, R. A. (2004). Human metapneumovirus persists in BALB/c mice despite the presence of neutralizing antibodies. *Journal of Virology*, 78(24), 14003-11.
- Arrebillaga, G., Gaona, J., Sánchez, C., Rosales, V., Gómez, B. (2012). Respiratory syncytial virus persistence in macrophages downregulates intercellular adhesion molecule-1 expression and reduces adhesion of non-typeable Haemophilus influenzae. *Intervirology*, 55(6), 442-50.
- Asenjo, A., Gonzalez-Armas, J. C., Villanueva, N. (2008). Phosphorylation of human respiratory syncytial virus P protein at serine 54 regulates viral uncoating. *Virology*, 380(1), 26-33.
- Baldrige, P., Senterfit, L. B. (1976). Persistent infection of cells in culture by respiratory syncytial virus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 151(4), 684-8.
- Bangham, C. R. M., McMichael, A. J. (1986). Specific human cytotoxic T cells recognize B-cell lines persistently infected with respiratory syncytial virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(23), 9183-7.
- Barbour, S. E., Wong, C., Rabah, D., Kapur, A., Carter, A. D. (1998). Mature macrophage cell lines exhibit variable responses to LPS. *Molecular Immunology*, 35(14-15), 977-87.
- Beckham, J. D., Cadena, A., Lin, J., Piedra, P. A., Glezen, W. P., Greenberg, S. B., Atmar, R. L. (2005). Respiratory viral infections in patients with chronic, obstructive pulmonary disease. *The Journal of Infection*, 50(4), 322-30.
- Bermingham, A., Collins, P. L. (1999). The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulator factor involved in the balance between RNA replication and transcription.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 11259-64.
- Bian, T., Gibbs, J. D., Orvell, C., Imani, F. (2012). Respiratory syncytial virus matrix protein induces lung epithelial cell cycle arrest through a p53 dependent pathway. *PLoS One*, 7(5), e38052.
- Blond, D., Raoul, H., LeGrand, R., Dormont, D. (2000). Nitric oxide synthesis enhances human immunodeficiency virus replication in primary human macrophages. *Journal of Virology*, 74(19), 8904-12.
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, 10(2), 907-16.
- Bossert, B., Conzelmann, K. K. (2002). Respiratory Syncytial Virus (RSV) Nonstructural (NS) Proteins as Host Range Determinants: a Chimeric Bovine RSV with NS Genes from Human RSV Is Attenuated in Interferon-Competent Bovine Cells. *Journal of Virology*, 76(9), 4287-93.
- Bredt, D. S., Hwang, P. M., Glatt, C. E., Lowenstein, C., Reed, R. R., Snyder, S. H. (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 351(6329), 714-8.
- Brinton, M. A. (1982). Characterization of west Nile virus persistent infections in genetically resistant and susceptible mouse cells I. Generation of defective nonplaquing virus particles. *Virology*, 116(1), 84-98.
- Bukreyev, A., Yang, L., Fricke, J., Cheng, L., Ward, J. M., Murphy, B. R., Collins, P. L. (2008). The secreted form of respiratory syncytial virus G glycoprotein helps the virus evade antibody-mediated restriction of replication by acting as an antigen decoy and through effects on Fc receptor-bearing leukocytes. *Journal of Virology*, 82(24), 12191-204.
- Cartee, T. L., Megaw, A. G., Oomens, A. G. P., Wertz, G. W. (2003). Identification of a Single Amino Acid Change in the Human Respiratory Syncytial Virus L Protein That Affects Transcriptional Termination. *Journal of Virology*, 77(13), 7352-60.
- Carter, S. D., Dent, K. C., Atkins, E., Foster, T. L., Verow, M., Gorny, P., Harris, M., Hiscox, J. A., Ranson, N. A., Griffin, S., Barr, J. N. (2010). Direct visualization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus reveals the structural basis for membrane permeability. *FEBS Letters*, 584(13), 2786-90.
- Castagne, N., Barbier, A., Bernard, J., Rezaei, H., Huet, J. C., Henry, C., Da Costa, B., Elouet, J. F. (2004). Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain. *Journal of General Virology*, 85(6), 1643-53.
- Chang, Y. C., Borja, M., Scholthof, H. B., Jackson, A. O., Morris, T. J. (1995). Host effects and sequences essential for accumulation of defective interfering RNAs of cucumber necrosis and tomato bushy stunt tobamoviruses. *Virology*, 210(1), 41-53.

- Chanock, R. M., Roizman, B., Myers, R. (1957). Recovery from infants with respiratory illness of a virus related coryza agent. I. Isolation, properties and characterization. *American Journal of Hygiene*, 66(3),281-290.
- Chanock, R. M., Finberg, L. (1957). Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiological aspects of infection in infants and Young children. *American Journal of Hygiene*, 66(3), 291-300.
- Chavan, S. J., Bornmann, W. G., Flexner, C., Prohaska, H. (1995). Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by oltipraz: Evidence for the formation of a stable adduct. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 324(1), 143-52.
- Chen, P. F., Tsai, A. L., Berka, V., Wu, K. K. (1996). Endothelial nitric-oxide synthase—Evidence for bidomain structure and successful reconstitution of catalytic activity from two separate domains generated by a baculovirus expression system. *Journal of Biological Chemistry*, 271(24), 14631–5.
- Chesrown, S. E., Monnier, J., Visner, G., Nick, H. S. (1994). Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by LPS, INF- γ , TGF- β , and IL-10 in murine macrophage cell lines and rat peritoneal macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 200(1), 126-134.
- Chevallier-Greco, A., Manet, E., Chavrier, P., Mosnier, C., Daillie, J., Sergeant, A. (1986). Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *EMBO Journal*, 5(12), 3243-9.
- Chini, B. A., Fiedler, M. A., Milligan, L., Hopkins, T., Stark, J. M. (1998). Essential roles of NF- κ B and C/EBP in the regulation of intercellular adhesion molecule–1 after respiratory syncytial virus infection of human respiratory epithelial cell cultures. *Journal of Virology*, 72(2), 1623–6.
- Cho, H. J., Martin, E., Xie, Q. W., Sassa, S., Nathan, C. (1995). Inducible nitric oxide synthase: Identification of amino acid residues essential for dimerization and binding of tetrahydrobiopterin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(25),11514-8.
- Cirino, N. M., Panuska, J. R., Villani, A., Taraf, H., Rebert, N. A., Merolla, R., Tsvitse, P., Gilbert, I. A. (1993). Restricted replication of respiratory syncytial virus in human alveolar macrophages. *Journal of General Virology*, 74(Pt 8),1527-37.
- Colasanti, M., Persichini, T., Venturini, G., Ascenzi, P. (1999). S-Nitrosylation of viral proteins: Molecular Bases for Antiviral effect of nitric oxide. *IUBMB Life*, 48(1), 25-31.
- Collins, P., Chanock, R., Murphy, B. (2001). Respiratory syncytial virus. Fields Virology. 4ta edición. Fields B. et al. Raven publishers. Filadelfia. Cap.45. Págs. 1443-85.
- Collins, P. L., Graham, B. S. (2008). Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *Journal of Virology*, 82(5), 2040-55.

- Collins, P. L., Fearn, R., Graham, B. S. (2013). Challenges and Opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccines. *Respiratory Syncytial Virus: Virology, Reverse Genetics and Pathogenesis of Disease*. Editorial Springer Cap. 1. Pág. 8.
- Compendio de Anuarios de Morbilidad 1984-2009. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. www.cenavece.salud.gob.mx
- Cowton, V. M., McGivern, D. R., Fearn, R. (2006). Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *Journal of General Virology*, 87(Pt 7), 1805-21.
- Cubie, H. A., Duncan, L. A., Marshall, L. A., Smith, N. M. (1997). Detection of respiratory syncytial virus nucleic acid in archival postmortem tissue from infants. *Pediatric Pathology and Laboratory Medicine*, 17(6), 927-38.
- Dakhama, A., Vitalis, T. Z., Hegel, R. G. (1997). Persistence of respiratory syncytial virus (RSV) infection and development of RSV-specific IgG1 response in a guinea-pig model of acute bronchiolitis. *European Respiratory Journal*, 10(1), 20-26.
- Dawe, C. J., Potter, M., (1957). Morphologic and biologic progression of a lymphoid neoplasm of the mouse in vivo and in vitro. *American Journal of Pathology*, 33(1), 603-4.
- Delbridge, L. M., O'Riordan, M. X. (2007). Innate recognition of intracellular bacteria. *Current Opinion in Immunology*, 19(1), 10-6.
- Dembinska-Kiec, A., Dulak, J., Partyka, L., Krzesz, R., Dudek, D., Bartus, S., Polus, M., Guevara, I., Wybranska, I., Krzeminski, T. (1997). Induction of nitric oxide synthase (NOS) and vascular endothelial growth (VEGF) in experimental model of angioplasty and heart ischemia. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 433,163-7.
- Ding W., Hudson, L. G., Liu, K. J. (2005). Inorganic arsenic compounds cause oxidative damage to DNA and protein by inducing ROS and RNS generation in human keratinocytes. *Molecular and cellular biochemistry*, 279(1-2), 105-112.
- Domingo, E., Baranowski, E., Núñez, J. I., Ruiz-Jarabo, C. M., Sierra, S., Molina, N., Sobrino, F. (2000). Cuasiespecies y Evolución molecular de virus. *Revue Scientifique et Technique Office International of Epizoonotics*, 19(1), 55-63.
- Domurat, E., Roberts, N. J., Walsh, E. E., Dagan, R. (1985). RSV infection of human mononuclear leukocytes in vitro and in vivo. *Journal of Infectious Diseases*, 152(5), 895-902.
- Drake, J. W. (1993). Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(9), 4171-5.
- Everard, M. L. (2006). The relationship between respiratory syncytial virus infections and the development of wheezing and asthma in children. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 6(1):56-61.
- Falsey, A. R., Formica, M. A., Hennessey, P. A., Criddle, M. M., Sullender, W. M., Walsh, E. E. (2006). Detection of respiratory syncytial virus in adults with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173(6), 639-43.

- Fearns, R., Collins, P.L. (1999). Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *Journal of Virology*, 73(7), 5852-64.
- Fearns, R., Collins, P. L., Peeples, M. E. (2000). Functional analysis of the genomic and antigenomic promoters of human respiratory syncytial virus. *Journal of Virology*, 74(13), 6006.
- Fernie, B. F., Ford, E. C., Gerin, J. L. (1981). The development of Balb/c cells persistently infected with respiratory syncytial virus: presence of ribonucleoprotein on the cell surface. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*; 167(1), 83-6.
- Finnen, R. L., Rochon, D. M. (1993). Sequence and structure of defective interfering RNAs associated with CNV infections. *Journal of General Virology*, 74(Pt 8), 1715-1720.
- Fix, J., Galloux, M., Blondot, M. L., Eleouet, J. F. (2011). The insertion of fluorescent proteins in a variable region of respiratory syncytial virus L polymerase results in a fluorescent and functional enzymes but with reduced activities. *Open Virology Journal*, 5,103-8.
- Flemmington, E., Speck, S. H. (1990). Autorregulation of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *Journal of Virology*, 64(3),1227-32.
- Förstermann, U., Gath, I., Schwarz, P., Closs, E. I., Kleinert, H. (1995). Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochemical Pharmacology*, 50(9), 1321-32.
- Franchi, L., McDonald, C., Kanneganti, T. D., Amer, A., Nunez, G. (2006). Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptors: Intracellular Pattern Recognition Molecules for Pathogen Detection and Host Defense. *The Journal of Immunology*, 177(6), 3507-13.
- Franke, G., Freihorst, J., Steinmüller, C., Verhagen, W., Hockertz, S., Lohmann-Matthes, M. L. (1994). Interaction of alveolar macrophages and respiratory syncytial virus. *Journal of Immunological Methods*, 174(1-2):173-184.
- Franke-Ullmann, G., Pfortner, C., Walter, P., Steinmuller, C., Lohmann-Matthes, M. L., Kobzik, L., Freihorst, J. (1995). Alteration of pulmonary macrophage function by respiratory syncytial virus infection in vitro. *Journal of Immunology*; 154(1), 268-80.
- Fuentes, S., Tran, K. C., Luthra, P., Teng, M. N., & He, B. (2007). Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *Journal of Virology*, 81(15), 8361-66.
- Gan, S. W., Tan, E., Lin, X., Yu, D., Wang, J., Tan, G. M., Vararattanavech, A., Yeo, C. Y., Soon, C. H., Soong, T. W., Pervushin, K., Torres, J. (2012). The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. *Journal of Biological Chemistry*, 287(29), 24671-89.
- Gern, J. E., Brooks, G. D., Meyer, P., Chang, A., Shen, K., Evans, M. D., Tisler, C., DaSilva, D., Roberg, K. A., Mikus, L. D., Rosenthal, L. A., Kirk, C. J., Shult, P. A., Bhattacharya, A., Li, Z., Gangnon, R. L., Robert, F. Jr. (1995). Bidirectional interactions between viral respiratory

- illnesses and cytokine responses in the first year of life. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(1), 72-8.
- Ghildyal, R., Ho, A., Jans, D. A. (2006). Central role of the respiratory syncytial virus matrix protein in infection. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(5), 692-705.
- Ghosh, D. K., Abusoud, H. M., Stuehr, D. J. (1996). Domains of macrophage NO synthase have divergent roles in forming and stabilizing the active dimeric enzyme. *Biochemistry*, 35(5), 1444-9.
- Ghosh, S., May, M., Kopp, E., (1998). NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of Immunology*, 16: 225- 60.
- Gilbert, D. L., Colton, C. A. (2002). *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*. Kluwer Academic Publishers. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow. eBook ISBN: 0-306-46806-9. Cap. 9 págs: 224 y 227.
- Goldring, C. E., Reveneau, S., Algarté, M., Jeannin, J. F. (1996) *In vivo* footprinting of the mouse inducible nitric oxide synthase gene: inducible protein occupation of numerous sites including Oct and NF-IL6. *Nucleic acids research*; 24(9), 1682-7.
- Gould, P. S., Easton, A. J. (2007). Coupled translation of the second open reading frame of M2 mRNA is sequence dependent and differs significantly within the subfamily Pneumovirinae. *Journal of Virology*, 81(16), 8488-96.
- Groskreutz, D. J., Babor, E. C., Monick, M. M., Varga, S. M., Hunninghake, G. W. (2010). Respiratory syncytial virus limits alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2alpha) phosphorylation to maintain translation and viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, 285(31), 24023-31.
- Guerrero-Plata, A., Ortega, E., Gómez, B. (2001). Persistence of respiratory syncytial virus in macrophages alters phagocytosis and pro-inflammatory cytokine production. *Viral Immunology*, 14(1), 19-30.
- Guy, B., Geist, M., Dott, K., Spehner, D., Kieny, M. P., Lecocq, J. P. (1991). A specific inhibitor of cysteine proteases impairs a *vif*-dependent modification of human immunodeficiency virus type 1 Env protein. *Journal of Virology*, 65(3), 1325-31.
- Haeberle, H., Takizawa, R., Casola, A., Brasier, A., Dieterich, H., Van Rooijen, N., Gatalica, Z., Garofalo, R. (2002). Respiratory syncytial virus-induced activation of nuclear factor- κ B in the lung involves alveolar macrophages and toll-like receptor 4-dependent pathways. *Journal of Infectious Diseases*, 186(9), 1199-206.
- Hall, C. B., Weinberg, G. A., Iwane, M. K., Blumin, A. K., Edwards, K. M., Staat, M. A., Auinger, P., Griffin, M. R., Poehling, K. A., Erdman, D., Grijalva, C. G., Zhu, Y., Szilagyi, P. (2009). The burden of respiratory syncytial virus infection in Young children. *The New England Journal of Medicine*, 360(6), 588-98.

- Han, L. L., Alexander, J. P., Anderson, L. J. (1999). Respiratory syncytial virus pneumonia among the elderly: an assessment of disease burde. *Journal of Infectious Diseases*, 179(1), 25-30.
- Hansberg, W., T. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. Mensaje Bioquímico, Vol XXVI Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina. UNAM.
- Harding, C. V., Ramachandra, L., Wick, M. J. (2003). Interaction of bacteria with antigen presenting cells: influences on antigen presentation and antibacterial immunity. *Current Opinion in Immunology*, 15(1), 112–119.
- Havelda, Z., Burgyán, J. (1995). 3' Terminal putative stem-loop structure required for te accumulation of Cymbidium ringspot viral RNA. *Virology*, 214(1), 269-72.
- Haynes, L. M., Moore, D. D., Kurt-Jones, E. A., Finberg, R. W., Anderson, L. J., Tripp, R. A. (2001). Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *Journal of Virology*, 75(22), 10730-7.
- Hegele, R. G., Hayashi, S., Bramley, A. M., Hogg, J. C. (1994). Persistence of respiratory syncytial virus genome and protein after acute bronchiolitis in guinea pigs. *Chest*, 105(6),1848-1854.
- Hensley, K., Williamson, K. S., Floyd, R. A. (2000). Measurement of 3-nitrotyrosine and 5-nitro-γ-tocopherol by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(4), 520-8.
- Hobson, L., Everard, M. L. (2008). Persistent of respiratory syncytial virus in human dendritic cells and influence of nitric oxide. *Clinical and Experimental Immunology*, 151(2), 359-66.
- Huang, A.S., Baltimore, D. (1970). Defective viral particles and viral disease processes. *Nature*, 226(5243), 325–327.
- Iankevich, O.D., Drežin, R.S. (1977). Chronic infection of HeLa cells with respiratory syncytial virus. *Voprosy Virusologii*, 2,142-7.
- Ignarro, L. J., Lipton, H., Edwards, J. C., Baricos, W. H., Hyman, A. L., Kadowitz, P. J., Gruetter, C. A. (1981). Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 218(3), 739–9.
- Inove-Nagata, A. K., Kormelink, R., Sgro, J. Y., Nagata, T., Kitajima, E. W., Goldabach, R., Peters, D. (1998). Molecular characterization of tomato spotted wilt virus defective interfering RNAs and detection of truncated L proteins. *Virology*, 248(2), 342-356.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. Lista maestra de especies 2013. <http://talk.ictvonline.org/default.aspx>
- Isaia, G., Teodosiu, O., Athsnssiu, P., Sternberg, I., Dimitriu, Z. (1985). Persistence of viruses in the nasopharynx of apparently healthy children aged 0-5. Results of investigations performed in 1982-83. *Virologie*; 36(3):175-9.
- Jeffree, C. E., Rixon, H. W. M. L., Brown, G., Aitken, J., Sugrue, R. J. (2003). Distribution of the attachment (G) glycoprotein and GM1 within the envelope of mature respiratory syncytial

- virus filaments revealed using field emission scanning electron microscopy. *Virology*, 306(2), 254-67.
- Johnson, T. R., McLellan, J. S., Graham, B. S. (2012). Respiratory syncytial virus glycoprotein G interacts with DC-SIGN and L-SIGN to activate ERK1 and ERK2. *Journal of Virology*, 86(3), 1339-47.
- Jung, K., Gurnani, A., Renukaradhya, G. J., Saif, L. J. (2010). Nitric oxide is elicited and inhibits viral replication in pigs infected with porcine respiratory coronavirus but not porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 136(3-4), 335-9.
- Kameoka, M., Okada, Y., Tobiume, M., Kimura, T., Ikuta, K. (1996). Intracellular glutathione as a possible direct blocker of HIV type I reverse transcription. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 12(17), 1635-8.
- Karupiah, G., Xie, Q. W., Buller, R. M., Nathan, C., Duarte, C., MacMicking, J. D. (1993). Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science*; 261(5127),1445-8.
- Kenneth, K. (2001). Nitric oxide: synthesis and action. *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley & Sons. Publicado en línea: 19 Abr 2001. DOI: 10.1038/npg.els.0000634.
- Killip, M. J., Young, D. F., Gatherer, D., Ross, C. S., Short, J. A., Davison, A. J., Goodbourn, S., Randall, R. E. (2013). Deep sequencing analysis of defective genomes of parainfluenza virus 5 and their role in interferon induction. *Journal of Virology*, 87(9), 4798-4807.
- Klatt, P., Pfeiffer, S., List, B. M., Lehner, D., Glatter, O., Bachinger, H. P., Werner, E. R., Schmidt, K., Mayer, B. (1996). Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *Journal of Biological Chemistry*, 271(13), 7336–42.
- Klingström, J., Akerström, S., Hardestam, J., Stoltz, M., Simon, M., Falk, K. I., Mirazimi A., Rottenberg, M., Lundkvist, A. (2006). Nitric oxide and peroxynitrite have different antiviral effects against hantavirus replication and free mature virions. *European Journal of Immunology*, 36(10), 2649-57.
- Knorr, D. A., Mullin, R. H., Hearne, P. Q., Morris, T. J. (1991). De novo generation of defective interfering RNAs of tomato bushy stunt virus by high multiplicity passage. *Virology*, 181(1), 193-202.
- Konorev, E. A., Joseph, J., Tarpey, M. M., Kalyanaraman, B. (1996). The mechanism of cardioprotection by S-nitrosoglutathione monoethyl ester in rat isolated heart during cardioplegic ischaemic arrest. *British Journal of Pharmacology*, 119(3), 511–8.
- Koren, H. S., Handwerker, B. S., Wunderlich, J. R. (1975). Identification of macrophage-like characteristics in a cultured murine tumor line. *Journal of Immunology*, 114(2 pt 2), 894-7.

- Krivitskaia, V. Z., Iakovleva, N. V. (1992). The characteristics of the humoral response to respiratory syncytial viral infection in adult patients with different forms of bronchitis. *Voprosy Virusologii*, 37(3), 146-9.
- Krivitskaia, V. Z., Iakovleva, N. V., Aleksandrova, N. I. (1996). Characteristics of anti-respiratory syncytial humoral immunity during persistence of respiratory syncytial virus antigens in adult patients with chronic obstructive bronchitis. *Voprosy Virusologii*, 41(5), 234-7.
- Kurt-Jones, E., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L., Jones, L., Tripp, R., Walsh, E., Freeman, M., Golenbock, D., Anderson, L., Finberg, R. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature Immunology*, 1(5), 398-401.
- Lai, M. C. M. (1992). RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiological Reviews*, 56(1), 61-79.
- Langedijk, J. P. M., de Groot, B. L., Berendsen, H. J. C., van Oirschot, J. T. (1998). Structural homology of the central conserved region of the attachment protein G of Respiratory Syncytial Virus with the fourth subdomain of 55-kDa Tumor Necrosis Factor Receptor. *Virology*, 243(2), 293-302.
- Lazzarini, R. A., Kenne, J. K., & Schubert, M. (1981). The origins of defective interfering particles of the negative-strand RNA viruses. *Cell*, 26(2 pt 2), 145-54.
- Liao, C. L., Lin, Y. L., Shen, S. C., Shen, J. Y., Su, H. L., Huang, Y. L., Ma, S. H., Sun, Y. C., Chen, K. P., Chen, L. K. (1998). Antiapoptotic but not antiviral function of human bcl-2 assists establishment of Japanese encephalitis virus persistence in cultured cells. *Journal of Virology*, 72(12), 9844-54.
- Lin, Y. L., Huang, Y. L., Ma, S. H., Yeh, C. T., Chiou, S. Y., Chen, L. K., Liao, C. L. (1997). Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by nitric oxide: antiviral effect of nitric oxide on RNA virus replication. *Journal of Virology*, 71(7), 5227-35.
- Liu, P., Jamaluddin, M., Li, K., Garofalo, R. P., Casola, A., Brasier, A. R. (2007). Retinoic acid-inducible gene I mediates early antiviral response and Toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells. *Journal of Virology*, 81(3), 1401-11.
- Liu, T., Castro, S., Brasier, A. R., Jamaluddin, M., Garofalo, R. P., Casola, A. (2004). Reactive oxygen species mediate virus-induced STAT activation: role of tyrosine phosphatases. *Journal of Biological Chemistry*, 279(4), 2461-69.
- Liuzzi, M., Mason, S. W., Cartier, M., Lawetz, C., McCollum, R. S., Dansereau, N., Bolger, G., Lapeyre, N., Gaudette, Y., Lagace, L., Massariol, M. J., Do, F., Whitehead, P., Lamarre, L., Scouten, E., Bordeleau, J., Landry, S., Rancourt, J., Fazal, G., Simoneau, B. (2005). Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscriptional mRNA guanylation by viral RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of Virology*, 79(20), 13105-15.

- Lowe, P. N., Smith, D., Stammers, D. K., Riverosmoreno, V., Moncada S., Charles, I., Boyhan, A. (1996). Identification of the domains of neuronal nitric oxide synthase by limited proteolysis. *Biochemical Journal*; 314(Pt 1), 55–62.
- Lowenstein, C., Alley E., Raval, P., Snowman, A., Snyder, S., Russell, S., Murphy, W. (1993). Macrophage nitric oxide synthase gene- two upstream regions mediate induction by interferon-g and lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 90(20), 9730– 9734.
- Loya, S., Gao, H. Q., Avidan, O., Boyer, P. L., Hughes, S. H., Hizi, A. (1997) Subunit-specific mutagenesis of the cysteine 280 residue of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1: Effects on sensitivity to a specific inhibitor of the RNase H activity. *Journal of Virology*, 71(7), 5668-72.
- Lu, Q., Jour'd'Heuil, F. L., Jour'd'Heuil, D. (2007). Redox control of G(1)/S cell cycle regulators during nitric oxide-mediated cell cycle arrest. *Journal of Cellular Physiology*, 212(3), 827-39.
- Lukacs, N. W., Smith, J., Lindell, D., Schaller, M. (2007). Respiratory syncytial virus-induced pulmonary disease and exacerbation of allergic asthma. *Contributions to Microbiology*, 14, 68-82.
- Ma, X. Y., Sova, P., Chao, W., Volsky, D. J. (1994). Cysteine residues in the *vif* protein of human immunodeficiency virus type 1 are essential for viral infectivity. *Journal of Virology*, 68(3), 1714-1720.
- Makino, S., Shies, C., Soe, L. H., Baker, S. C., Lai, M. M. (1988). Primary structure and translation of a defective interfering RNA of murine coronavirus. *Virology*, 166(2), 550-60.
- Marks-Konczalik, J., Chu, S. C., Moss, J. (1998). Cytokine-mediated Transcriptional Induction of the Human Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Requires Both Activator Protein 1 and Nuclear Factor B-binding Sites. *Journal of Biological Chemistry*, 273(35), 22201-8.
- Marletta, M. A. (1994). Nitric oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, 78(6), 927-930.
- Martinon, F., Tschopp, J. (2007). Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ*, 14(1), 10-22.
- Mastrorarde, J. G., Monick, M. M., Hunninghake, G. W. (1995). Oxidant tone regulates IL-8 production in epithelium infected with respiratory syncytial virus. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 13(2), 237–44.
- Mawassi, M., Karasev, A. V., Mietkiewska, E., Gafny, R., Lee, R. F., Dawson, W. O., Bar-Joseph, M. (1995). Defective RNA molecules associated with Citrus Tisteza Virus. *Virology*, 208(1), 383-7.
- Mejías, A., Chávez-Bueno S., Ríos, A. M., Fonseca-Aten, M., Gómez, A. M., Jafri, H. S., Ramilo, O. (2004). Asthma and respiratory syncytial virus. *New Opportunities for Therapeutic Intervention An Pediatr (Barc)*, 61(3), 252-60.

- Mejías, A., Chávez-Bueno, S., Ramilo, O. (2005). Respiratory syncytial virus pneumonia: mechanisms of inflammation and prolonged airway hyperresponsiveness. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 18(3):199-204.
- Mejías, A., Chavez-Bueno, S., Gomez, A. M., Somers, C., Estripeaut, D., Torres, J. P., Jafri, H. S., Ramilo O. (2008). Respiratory syncytial virus persistence: evidence in the mouse model. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 27(10 Suppl), S60-62.
- Meyer, B. J., Southern, P. J. (1997). A novel type of defective viral genome suggests a unique strategy to establish and maintain persistent lymphocytic choriomeningitis virus infections. *Journal of Virology*, 71(9), 6757–64.
- Midulla, F., Villani, A., Panuska, J. R., Dab, I., Kolls, J. K., Merolla, R., Ronchetti, R. (1993). Respiratory syncytial virus lung infection in infants: immunoregulatory role of infected alveolar macrophages. *Journal of Infectious Diseases*, 168(6), 1515-19.
- Mills, B., Singer, F., Weiner, L., Holst, P. (1981). Immunopathological demonstration of respiratory syncytial virus antigens in Paget's disease of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 78(2), 1209-13.
- Mills, B., Weiner, L., Suffin, S., Stabile, E., Holst, P. (1984). Evidence for both respiratory syncytial virus and measles virus antigens in osteoclasts of patients with Paget's disease of bone. *Clinical Orthopaedics and related research*, 183, 303-11.
- Mills, B., Singer, F. (1987). Critical evaluation of viral antigen data in patients with Paget's disease of bone. *Clinical Orthopaedics and related research*, 21, 16-25.
- Mitchell, H. H., Shonle, H. A., Grindley, H. S. (1916). The origin of nitrate in the urine. *Journal of Biological Chemistry*, 24, 461-90.
- Mizgerd, J.P. (2008). Acute lower respiratory tract infection. *New England Journal of Medicine*, 358(7), 716-27.
- Moncada, S., Palmer, R. M. J., Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 43(2), 109–142.
- Morin, C., Fessi, H., Devissaguet, J. P., Puisieux F., Barratt, G. (1994). Factors influencing macrophage activation by muramyl peptides: inhibition of NO synthase activity by high levels of NO. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1224(3), 427-432.
- Morris, J. A., Blount, R. E., Savage, R. E. (1956). Recovery of cytopathic agent from chimpanzees with coryza. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 92(3), 544-9.
- Moustafa, M. H., Sharma, R. K., Thornton, J., Mascha, E., Abdel-Hafez, M. A., Thomas, A. J. Jr, Agarwal, A. (2004). Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction*, 19(1), 129-38.

- Müller, C. F., Fatzer, R. S., Beck, K., Vandeveld, M., Zurbriggen A. (1995). Studies on canine distemper virus persistence in the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 89(5), 438-45.
- Müller-Pebody, B., Edmunds, W. J., Zambon, M. C., Gay, N. J., Crowcroft, N. S. (2002). Contribution of RSV to bronchiolitis and pneumonia-associated hospitalizations in English children, April 1995–March 1998. *Epidemiology and Infection*, 129(01), 99-106.
- Nair, H., Nokes, D. J., Gessner, B. D., Dherani, M., Madhi, S. A., Singleton, R. J., O'Brien, K. L., Roca, A., Wrigth P. F., Bruce, N., Chandran, A., Theodoratou, E., Sutanto, A., Sedyaningsih, E. R., Ngama, M., Munywoki, P. K., Kartasasmita, C., Simoes, E. A., Rudan, I., Weber, M. W., Campbell, H. (2010). Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in Young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 375(9725), 1545-55.
- Nathan, C., Xie, Q. (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 269(19), 13725-28.
- Nathan, C. F. (1987). Secretory products of macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, 79(2), 319-26.
- Nau, G. J., Richmond, J. F., Schlesinger, A., Jennings, E. G., Lander, E. S., Young, R. A. (2002). Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3), 1503-8.
- Ngunjiri, J. M., Lee, C. W., Ali, A., Marcus, P. I. (2012). Influenza virus interferon-inducing particle efficiency is reversed in avian and mammalian cells, and enhanced in cells co-infected with defective-interfering particles. *Journal of Interferon Cytokine Research*, 32(6), 280-5.
- Noah, T. L., Becker, S. (1993). Respiratory syncytial virus–induced cytokine production by a human bronchial epithelial cell line. *American Journal of Physiology*, 265(5 Pt 1), L472–8.
- O'Donnell, D. R., Milligan, L., Stark, J. M. (1999). Induction of CD95 (Fas) and apoptosis in respiratory epithelial cell cultures following respiratory syncytial virus infection. *Virology*, 257(1), 198–207.
- Openshaw, P. J. (1995). Immunopathological mechanisms in respiratory syncytial virus disease. *Springer Seminars in Immunopathology*, 17(2-3), 187-201.
- Openshaw, P. J., Tregoning, J. S. (2005). Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. *Clinical and Microbiological Reviews*, 18(3), 541-55.
- Openshaw, P. J. (2005). Antiviral immune responses and lung inflammation after respiratory syncytial virus infection. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2(2), 121-5.
- Organización Mundial de la salud. Datos estadísticos de mortalidad y morbilidad por país. <http://www.who.int/gho/countries/mex.pdf?ua=1>

- Payment, P., Trudel, M. (1993). Methods and techniques in virology. Editorial *Marcel Dekker, New York*; Pág. 33
- Persichini, T., Colasanti, M., Lauro, G. M., & Ascenzi, P. (1998). Cysteine nitrosylation inactivates the HIV-1 protease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 250(3), 575-6.
- Persichini, T., Colasanti, M., Fraziano, M., Colizzi, V., Medana, C., Polticelli, F., Venturini G., Ascenzi, P. (1999). Nitric oxide inhibits the HIV-1 reverse transcriptase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 258(3), 624-7.
- Piedemonte, G. (2002). The association between respiratory syncytial virus infection and reactive airway disease. *Respiratory Medicine*, 96(Suppl B), S25-9.
- Pogany, J., Romero, J., & Bujarski, J. J. (1997). Effect of 5' and 3' terminal sequences, overall length, and coding capacity on the accumulation of defective RNAs associated with broad bean mottle bromovirus in *Planta*. *Virology*, 228(2), 236-243.
- Poidinger, M., Coelen, R. J., Mackenzie, J. S. (1991). Persistent infection of vero cells by the flavivirus murray valley encephalitis virus. *Journal of General Virology*, 72(Pt 3), 573-8.
- Polack, F. P., Irusta, P. M., Hoffman, S. J., Schiatti, M. P., Melendi, G. A., Delgado, M. F., Laham, F. R., Thumar, B., Hendry, R. M., Melero, J. A., Karron, R. A., Collins, P.L., Kleeberger, S. R. (2005). The cysteine-rich region of respiratory syncytial virus attachment protein inhibits innate immunity elicited by the virus and endotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(25), 8996-9001.
- Pribul, P. K., Harker, J., Wang, B., Wang, H., Tregoning, J. S., Schwarze, J., Openshaw, P. J. (2008). Alveolar macrophages are a major determinant of early responses to viral lung infection but do not influence subsequent disease development. *Journal of Virology*, 82(9), 4441-8.
- Ramos-Castañeda, J., González, C., Jiménez, M. A., Duran, J., Hernández-Martínez, S., Rodríguez M. H., Lanz-Mendoza, H. (2008). Effect of nitric oxide on Dengue virus replication in *Aedes aegypti* and *Anopheles albimanus*. *Intervirology*, 51(5):335-41.
- Raza, M., Blackwell, C., Elton, R., Weir, D. (2000). Bactericidal activity of a monocytic cell line (THP-1) against common respiratory tract bacterial pathogens is depressed after infection with respiratory syncytial virus. *Journal of Medical Microbiology*, 49(3), 227-233.
- Resende, R. O., de Haan, P., de Ávila, A. C., Kiiitajima, E. W., Kormelink, R., Goldbach, R., Peters D. (1991). Generation of envelope and defective interfering RNA mutants of tomato spotted wilt virus by mechanical passage. *Journal of General Virology*, 72(Pt 10), 2375-83.
- Ricciardolo, F. L. (2003). Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax*, 58(2), 175-82.
- Rudd, B. D., Burstein, E., Duckett, C. S., Li, X., Lukacs, N. W. (2005). Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression. *Journal of Virology*, 79(6), 3350-57.

- Santiago Olivares Carlos Alberto (2008). Modulación de la producción de óxido nítrico en macrófagos persistentemente infectados con el virus sincitial respiratorio: modelo *in vitro*. Tesis de Maestría.
- Sarmiento, R., Tirado, R., Gómez, B. (2002) Characteristics of respiratory syncytial virus persistently infected macrophage-like culture. *Virus research*, 84(1-2), 45-58.
- Saura, M., Zaragoza, C., McMillan, A., Quick, R. A., Hohenadl, C., Lowenstein, J. M., Lowenstein, C. J. (1999). An antiviral mechanism of nitric oxide: inhibition of a viral protease. *Immunity*, 10(1), 21-8.
- Schmidt, H. H. H. W., Pollock, J. S., Nakane, M., Gorsky, L. D., Förstermann, U., Murad, F. (1991). Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(2), 365-9.
- Sennequier, N., Stuehr, D. J. (1996). Analysis of substrate-induced electronic, catalytic, and structural changes in inducible NO synthase. *Biochemistry*, 35(18), 5883–92.
- Siddhanta, U., Wu, C. Q., Abusoud, H. M., Zhang, J. L., Ghosh, D. K., Stuehr, D. J. (1996). Heme iron reduction and catalysis by a nitric oxide synthase heterodimer containing one reductase and two oxygenase domains. *Journal of Biological Chemistry*, 271(13), 7309–12.
- Singh, R. J., Hogg, N., Joseph, J., & Kalyanaraman, B. (1996). Mechanism of Nitric Oxide Release from S-Nitrosothiols. *Journal of Biological Chemistry*, 271(31), 18596-603.
- Sistema Nacional de Información en Salud. Información tabular de las principales causas de mortalidad infantil (menores de un año). Cuadro 2000-2008. <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>
- Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica. Boletín semanal de la dirección general de epidemiología, SSA. Semana 18-2002.
- Stark, J. M. (2000). The induction of chemokines by viruses in allergic states. Rothenberg ME. Chemokines in allergic disease. *New York: Marcel Dekker*; Págs: 263–87.
- Stark, J. M., Khan, A. M., Chiappetta, C., Xue, H., Alcorn, J. L., Colasurdo, G. N. (2005) Immune and Functional role of nitric oxide in a mouse model of respiratory syncytial virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, 191(3), 387-395.
- Streckert, H. J., Philippou, S., Riedel, F. (1996). Detection of respiratory syncytial virus (RSV) antigen in the lungs of guinea pigs 6 weeks after experimental infection and despite of the production of neutralizing antibodies. *Archives of Virology*, 141(3-4), 401-410.
- Stuehr, D. J., Griffith, O. W. (1992). Mammalian nitric oxide synthases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 65, 287-346.
- Su Z.Z., Blazing M.A., Fan D., George S.E. (1995) The calmodulin–nitric oxide synthase interaction—Critical role of the calmodulin latch domain in enzyme activation. *Journal of Biological Chemistry*, 270(49), 29117–22.

- Tapia, K., Kim, W. K., Sun, Y., Mercado-Lopez, X., Dunay, E., Wise, M., Adu, M., Lopez, C. B. (2013). Defective viral genomes arising in vivo provide critical danger signals for the triggering of lung antiviral immunity. *PLoS Pathogens*, 9(10), e1003703.
- Taylor, B. S., de Vera, M. E., Ganster, R. W., Wang, Q., Shapiro, R. A., Morris, S. M., Billiar T., Geller, D. A. (1998). Multiple NF- B Enhancer Elements Regulate Cytokine Induction of the Human Inducible Nitric Oxide Synthase Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 273(24), 15148-56.
- Thacore, H., Youngner, J. S., (1969) Cells persistently infected with Newcastle disease virus: Properties of mutants isolated from persistently infected L cells. *Journal of Virology*, 4(3), 244-51.
- Thomas, D. D., Ridnour, L. A., Isenberg, J. S., Flores-Santana, W., Switzer, C. H., Donzelli, S., Hussain, P., Vecoli, C., Paolocci, N., Ambs, S., Colton, C. A., Harris, C. C., Roberts, D. D., Wink, D. A. (2008). The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(1), 18-31.
- Tripp, R. A., Jones, L. P., Haynes, L. M., Zheng, H., Murphy, P. M., Anderson, L. J. (2001). CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nature Immunology*, 2(8):732-8.
- Valarcher, J. F., Bourhy, H., Lavenu, A., Bourges-Abella, N., Roth, M., Andreoletti, O., Ave, P., Schelcher, F. (2001). Persistent infection of B lymphocytes by bovine respiratory syncytial virus. *Virology*; 291(1), 55-67.
- Van Ginderachter, J. A., Movahedi, K., Hassanzadeh Ghassabeh, G., Meerschaut, S., Beschin, A., Raes, G., De Baetselier, P. (2006). Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology*, 211(6-8), 487-501.
- Vila-del Sol, V., Punzon, C., & Fresno, M. (2008). IFN- γ -Induced TNF- α Expression Is Regulated by Interferon Regulatory Factors 1 and 8 in Mouse Macrophages. *Journal of Immunology*, 181(7), 4461-70.
- Virology. Principles and Applications; John B. Carter and Venetia A. Saunders; Wiley; West Essex England 2007 Capitulo: 7
- Vodovotz, Y., Bogdan, C., Paik, J., Xie, Q., Nathan, C., (1993). Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor- β . *Journal of Experimental Medicine*, 178(2), 605-13.
- Wyde, P. R. (1998). Respiratory syncytial virus (RSV) disease and prospects for its control. *Antiviral Research*; 39(2), 63-79.

- Wei, Z. Y., Wang, X. B., Ning, X. D., Wang, Y. B., Zhang, H. Y., Wang, D. F., Chen, H.Y., Cui, B. A. (2009). Nitric Oxide inhibits the replication cycle of porcine parvovirus in vitro. *Archives of Virology*, 154(6), 999-1003.
- Whitehead, S. S., Bukreyev, A., Tneg, M. N., Firestone, C. Y., St Claire, M., Elkins W. R., Collins, P. L., Murphy, B. R. (1999). Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees. *Journal of Virology*, 73(4), 3438-42.
- Wu, F., Cepinskas, G., Wilson, J. X., Tyml, K., (2001). Nitric oxide attenuates but superoxide enhances iNOS expression in endotoxin- and IFN γ -stimulated skeletal muscle endothelial cells. *Microcirculation*, 8(6), 415-25.
- Xie, Q. W., Cho, H. J., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Ding, A., Trosco, T., Nathan, C. (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, 256(5054), 225-8.
- Xie, Q. W., Kashiwabara, Y., Nathan, C. (1994). Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 269(7), 4705-8.
- Xing, Z., Schat, K. A. (2000). Inhibitory effects of nitric oxide and gamma interferon on in vitro and in vivo replication of Marek's disease virus. *Journal of Virology*, 74(8), 3605-12.
- Zweier, J. L., Kuppasamy, P., Lutty, G. A. (1988). Measurement of endothelial cell free radical generation: Evidence for a central mechanism of free radical injury in post ischemic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(11), 4046-50.