



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“ EFECTO DE LA PERSISTENCIA DEL  
RSV EN LA ACTIVIDAD BACTERICIDA  
DEL MACROFAGO ”**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A :  
**GERARDO ARREVILLAGA BONI**

**DIRECTOR DE TESIS: DRA. BEATRIZ GOMEZ GARCIA**



**FACULTAD DE CIENCIA  
UNAM**

**2004**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR**

---

---



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

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"EFECTO DE LA PERSISTENCIA DEL RSV EN LA ACTIVIDAD  
BACTERICIDA DEL MACROFAGO"

realizado por ARREVILLAGA BONI GERARDO

con número de cuenta 09635430-4 , quien cubrió los créditos de la carrera de:

BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

DRA. BEATRIZ GOMEZ GARCIA

Propietario

M en C. MIRZA GABRIELA ROMERO VALDOVINOS

Propietario

DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA

Suplente

DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA

Suplente

DR. EMILIO JOAQUIN CORDOVA ALARCON

Consejo Departamental de BIOLOGIA FACULTAD DE CIENCIAS

M en C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHAVEZ.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGIA

**JURADO**

**DIRECTOR DE TESIS**

**PROPIETARIO DRA. BEATRIZ GÓMEZ GARCÍA**

**PROPIETARIO M en C. MIRZA GABRIELA ROMERO VALDOVINOS**

**PROPIETARIO DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA**

**SUPLENTE DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA**

**SUPLENTE DR. EMILIO JOAQUÍN CÓRDOVA ALARCÓN**

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE VIROLOGÍA DE LA UNAM DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM**

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ CON EL APAYO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT) MEDIANTE EL PROYECTO 42867/A-1**

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ CON EL APAYO DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO (DGAPA) MEDIANTE EL PROYECTO IN203303**

*A mi Mamá a quien dedico y agradezco todos mis momentos*

*A mis Abuelos María de Lourdes † y Alfredo † .....*

.....A mi familia Tíos, primos, sobrinas y agregados

Hay maestros que enseñan más que toda una carrera.....

Dra. Beatriz Gómez García por aceptarme en su laboratorio, por su invaluable dirección, apoyo y comprensión.

Dra. Antonieta Guerrero Plata con toda mi admiración, por inducirme a esta ciencia, por su paciencia y amistad.

Dra. Mirza Gabriela Romero Valdovinos Por su dirección y toda la confianza que depositó en mí,

Biol. Ana María Palazón Mayoral Por indicarme el camino de la biología.

Madre Lidia por inculcarme el amor al estudio

Lulú por mostrarme el valor de las primeras notas

Dr. Víctor Plata Pérez por los inolvidables recuerdos, por su amistad y enseñanzas.

Agradezco especialmente a

Víctor Rosales por su disposición y apoyo invaluable con la citometría .

Guadalupe Viveros por su generosidad y apoyo invaluable a este proyecto.

Angélica Olivo por disposición y apoyo durante mi estancia en su laboratorio.

A mis Amigos y compañeros de laboratorio

Nancy, Claudia, Laura, Carlos, Gustavo, Ariadna, Rafa, Sandra, Angélica, Maritza y Luque.

Así como a Rosa Elena y Rocío por su apoyo, consejos, confianza y amistad.

A Chelo y Jesús por facilitar y hacer agradable el trabajo del laboratorio.

A Alex<sup>†</sup>

A los miembros del jurado por sus oportunos señalamientos

**EFECTO DE LA PERSISTENCIA DEL  
VIRUS SINCITIAL RESPIRATORIO  
EN LA ACTIVIDAD BACTERICIDA  
DEL MACRÓFAGO**

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
1. Aspectos generales del virus sincitial respiratorio.....	2
2. Inmunidad e inmunopatogénesis .....	5
3. Macrófagos y su papel microbicida.....	5
4. Actividad microbicida de los NOIs... ..	7
5. Persistencia de RSV.....	8
6. Coinfección entre virus respiratorios y bacterias .....	9
7. Coinfección entre rsv- <i>Haemophilus influenzae</i> (HI) .....	10
8. Activación de NF- $\kappa$ B por <i>Haemophilus influenzae</i> – no tipificada (NTHi) .....	12
9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
MATERIAL Y MÉTODOS... ..	14
1. Virus.....	14
1.1 RSV cepa Long (ATCC VR-26) . .....	14
2. Líneas celulares. ....	14
2.1 M $\phi$ N .....	14
2.2 M $\phi$ P.....	14
2.3 M $\phi$ A .....	15
2.4 VERO (ATCC CCL 81) . .....	15
2.5 Hep-2 (ATCC, CCL 23).....	15
3 Cuantificación y viabilidad celular.....	16
4 Titulación de virus .....	16
4.1 TCID <sub>50</sub> .....	16
4.2 Titulación por ensayo de placa .....	18
5. Bacteria .....	18
5.1 <i>Haemophilus influenzae</i> NT (ATCC 49766).....	18
5.2 Marcaje de bacteria con bromuro de etidio.....	19
5.3 Unión de Bacteria .....	19
5.4 Ingestión de bacteria .....	21
5.5 Sobre vivencia intracelular de bacteria .....	21
6. NO.....	23
6.1 NO <sub>2</sub> en M $\phi$ .....	23
6.2 Determinación de concentración de nitrito.....	23
6.2.1 Reacción de Griess .....	23
7 ANÁLISIS DE DATOS.....	24
HIPÓTESIS .....	25
Objetivo General .....	26
Objetivos particulares.....	27
RESULTADOS .....	28
Confirmación de la persistencia de la línea celular P388D1.....	28
Cinética de adhesión.....	28
Efecto de la infección aguda y	

persistente del RSV en la adhesión e ingestión de NTHi.....	33
Sobrevivencia intracelular de la bacteria... ..	38
Producción de óxido nítrico .....	38
Discusión .....	41
Conclusiones.....	44
Apéndice.....	45
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>48</b>

## RESUMEN

En este trabajo se evaluó comparativamente la actividad bactericida de una línea celular de origen murino similar a macrófagos, infectada con el virus sincitial respiratorio (VSR), en forma aguda (M.O.I. de 2.5 por 2 horas de adsorción; M $\phi$ A), persistente (M $\phi$ P) y células testigo (M $\phi$ N), a través de determinar la adhesión, ingestión y sobrevivencia de *Hemophilus influenzae* no tipificable (NTHi; ATCC49776). Se seleccionó NTHi debido a que esta bacteria se aísla de pacientes con infección por VSR y que presentan exacerbaciones de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La capacidad bactericida se determinó por sobrevivencia de bacterias ingeridas (intracelulares), eliminando previamente las bacterias no ingeridas (extracelulares) con gentamicina. La adhesión e ingestión de NTHi se hizo con bacteria marcada con bromuro de etidio y se expresaron por índice de adhesión o ingestión respectivamente (intensidad media de fluorescencia X % de células con bacteria). El número de bacterias adheridas a M $\phi$ A fue significativamente mayor que las adheridas en los M $\phi$ P y M $\phi$ N. En cambio M $\phi$ N ingirieron más bacterias que M $\phi$ P y M $\phi$ N. La sobrevivencia de NTHi en M $\phi$ P también fue mayor que en M $\phi$ A y M $\phi$ N, y se asoció a la concentración de oxido nítrico producida por los macrófagos.

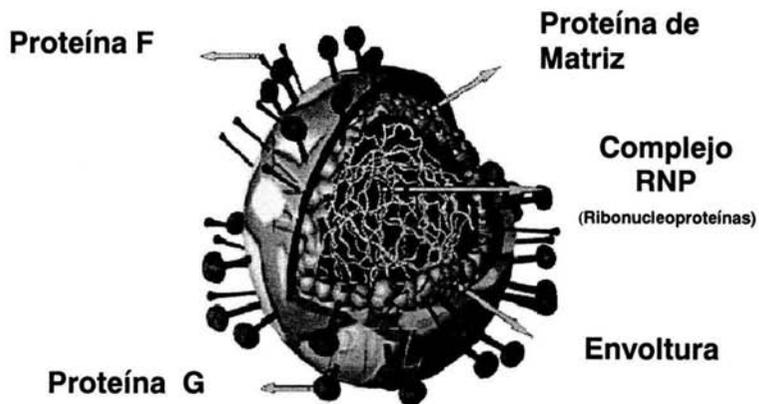
## INTRODUCCIÓN

### 1. ASPECTOS GENERALES DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO

El virus sincicial respiratorio (VSR) es el patógeno más importante a nivel mundial en infecciones virales del tracto respiratorio bajo, principalmente en lactantes durante los primeros seis meses de vida (Tercier J. 1983; Kaneko M. et al. 2002), así como en niños inmunosuprimidos (Hall C. et al. 1986; Chanock, R. 1992) y adultos mayores (Falsey A. et al. 1998), el patrón epidemiológico indica que el pico de incidencia en países templados se presenta durante los meses invernales y en los tropicales durante la época de lluvias (Nwankwo M. et al. 1988; Kaneko M. 2002).

El VSR está clasificado en el orden de los *Mononegavirales* dentro del género *Pneumovirus* de la familia *Paramyxoviridae*, el genoma viral consta de una cadena de RNA de polaridad negativa con 15,222 nucleótidos que sirve de templatado para la transcripción de 10 RNAm subgenómicos, que codifican 11 proteínas, 9 estructurales ( N, P, L F, G, SH, M, M2-1 y M2-2) y 2 no estructurales (NS1 y NS2) (Collins P. et al 2001; Lamb RA 1993). El virión consiste de una nucleocápside contenida dentro de una bicapa lipídica, que proviene de la membrana plasmática de la célula hospedera, en la cual se integran las glicoproteínas F o de fusión 70 (Kda/574 a.a.), G (90 kDa/298 a.a.) proteína de unión y la SH o hidrofóbica (7.5-40 kDa/64 a.a.) cuya función es incierta; la nucleocápside está formada por el material genómico, la polimerasa L (250 kDa ), la nucleoproteína N (43.4

kDa/391a.a.) y la fosfoproteína P (27.1 kDa /241 a.a.). La matriz se encuentra constituida por la proteína M o de matriz (28.7 kDa/ 256 a.a.) y las proteínas M2-1(22.1kDa/ 256 a.a.) o factor antiterminador y M2-2 (11 kDa/90 a.a.) ambas codificadas por el gene M2 el cual contiene dos marcos abiertos de lectura (ORFs). Al microscopio electrónico el virión aparece como una partícula pleomórfica con un tamaño que varía entre 150 y 300nm (Lambert D. et al. 1980; Collins P. et al. 2001; Lamb R. 2001). (Figura i)



**Figura i.** Esquema de la estructura del virión del VSR

La infección viral se inicia en el tracto respiratorio superior, con la unión de la glicoproteína G a los glicosaminoglicanos (GAGs) sulfato de heparina y sulfato de condroitina b (Martinez I. & Melero J. 2000); sin embargo éstas no son las únicas moléculas que funcionan como receptor, pues también se ha observado la unión de la proteína G a receptores de la quimiocina fractalcina CX<sub>3</sub>CL1, es decir, al receptor CX<sub>3</sub>CR1 (Tripp R. et al. 2001). Se ha reportado también, la unión de la proteína F o de fusión se ha observado uniéndose a moléculas de superficie celular como la heparina (Feldman S. et al. 2000), TLR4 y CD14 (Kurt-Jones E. et al. 2000), así como a la GTPasa celular RhoA. Esta última interacción facilita la fusión de la membrana plasmática de la célula hospedera con el virus así como la formación de sincitios. (Pастey M. et al. 1999; Pастey M. et al. 2000). Después de la unión del virus a un receptor celular, la nucleocápside es liberada al citoplasma donde se lleva a cabo el ciclo replicativo viral (Collins P. et al. 2001; Hancking D & Hull J. 2002). El comienzo de la transcripción inicia con la asociación de la polimerasa viral con el RNA, sintetizando un genoma de secuencia positiva que sigue un mecanismo progresivo guiado por las señales de inicio y paro dispuestas entre los genes. La transcripción corre en orden 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2/1-2/-L-5'. Durante la replicación, la polimerasa ignora las señales de inicio y término para formar al RNAm o antigenoma, este sirve como templado para formar las progenies genómicas virales, las cuales se asocian con la proteína N formando una estructura helicoidal que se une a el complejo P-L y a M2-1 mientras las proteínas F, G y SH migran a la membrana citoplasmática; finalmente la proteína M coordina el ensamble de las proteínas de superficie con las de la nucleocápside y el virión es liberado por gemación. (Collins P. et al. 2001; Lamb A. et al. 2001; Hancking D. & Hull J. 2002). Las proteínas no estructurales NS1 y NS2 se expresan en la célula hospedera y

aunque se les atribuyen funciones antagonistas del sistema de interferón su función es básicamente desconocida. (Collins P. et al. 2001).

## **2. INMUNIDAD E INMUNOPATOGENESIS.**

El VSR se multiplica y disemina en las mucosas del tracto respiratorio superior e infecta traquea, bronquios, bronquiolos y alvéolos. El periodo de incubación es 4-5 días (Kapikian AZ et al 1996). La respuesta inmune a la infección por VRS es permanente y participa en la resolución de la infección así como en el proceso inflamatorio; pero su protección es ineficiente, las reinfecciones son comunes, aunque la severidad disminuye a medida que aumenta la frecuencia. (Kimpen JLL. 1996; van Schaik S. 2000). Las células epiteliales y macrófagos son susceptibles a la infección por VSR (Panuska et al. 1990; Merolla R et al. 1995; Raza et al. 2000) e inducen la activación de una red de genes y estirpes celulares que participan en la inflamación como las células Th2 (Anderson I. et al. 1994; Openshaw P. 1995; van Schaik S. 2000; Collins P. et al. 2001).

## **3. MACRÓFAGOS Y SU PAPEL MICROBICIDA**

Los macrófagos alveolares representan alrededor del 95% de las células recuperadas de lavados bronquio alveolares en humanos (Shapiro S. 1999; Gordon S. & Read R 2002). La fagocitosis de patógenos llevada a cabo por esta estirpe celular da inicio a la respuesta inmune innata que a su vez orquesta la respuesta inmune adquirida (Aderem A. & Underhill D 1999). Los macrófagos alveolares se originan a partir de células totipotenciales “stem cells” y se encuentran localizados en sitios estratégicos como el intersticio y los alvéolos donde maduran por influencia de factores locales tales como citocinas, surfactantes y epitelio

bronquial para la defensa del pulmón ante microorganismos, materia particulada y toxinas. (Labro MT. 2000; Laskin D. et al. 2001, Gordon S. & Read R 2002; Becker S. et al. 2003). La identificación de patógenos por parte del macrófago ha sido resuelta a partir de un sistema de receptores especializados en el reconocimiento de dominios conservados característicos de los agentes invasores (Aderem A. & Underhill D 1999; Rojas O. 1997). Entre los principales receptores que participan en la fagocitosis de microorganismos se encuentran los de tipo Fc (FcR) que reconocen inmunoglobulinas, los de complemento (CR), receptores para integrinas como la  $\alpha_5\beta_1$ , los receptores scavenger que reconocen bacterias, lipopolisacáridos (LPS) y ácido lipoteicoico, los receptores de manosa y el CD14. Los tres primeros mecanismos de reconocimiento mencionados funcionan para partículas opsonizadas; sin embargo los receptores no dependientes de opsonización tienen una participación clave en la unión y reconocimiento de agentes extraños. (Auger M. & Ross J. 1992). Hay evidencia que indica diferencias en los mecanismos de internalización de las partículas según el receptor involucrado (Allen L. & Aderem A. 1996). Los receptores tipo-toll (TLR) son moléculas transmembranales que contienen residuos repetidos ricos en leucina en su dominio externo, su estructura se asemeja a la de los receptores de IL-1 e IL-18 y reconocen diversas series de ligandos con un alto nivel de especificidad que finaliza en la activación del factor activador de la transcripción NF- $\kappa$ B (Ozato Keiko et al. 2002). Recientemente se han reconocido en este grupo de receptores una función mediadora crítica para la respuesta inmune innata, algunos estudios sugieren al TLR2 como un receptor señalizador de moléculas de bacterias Gram-positivas como peptidoglicanos y otros de sus componentes así como de hongos. Por otro lado al TLR4 se le ha vinculado

al reconocimiento de moléculas bacterias Gram–negativas como los LPS, e incluso a la respuesta innata contra el VSR (Haynes L. 2001; Wang X et al. 2002; Gordon S & Read R. 2002).

#### **4. Actividad microbicida de los Intermediarios Reactivos del Nitrógeno (NOIs).**

La actividad microbicida del macrófago está regulada por los intermediarios reactivos del oxígeno (ROIs) y del nitrógeno (NOIs) (Bogdan C. 2001). Los NOIs son formados por la acción catalítica de una familia de enzimas, conocidas como óxido nítrico sintasas (NOS), estas enzimas transforman al aminoácido L-arginina y al oxígeno, en L-citrulina y óxido nítrico (NO). La inducción de las NOS depende de la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) de transcripción (Conron M. et al. 2000). Existen tres isoformas de NOS dos de las cuales son constitutivas dependientes de calcio (cNOS) la tipo 1 y tipo 3 (nNOS y eNOS respectivamente) y se expresan en neuronas cerebrales o en células endoteliales (Moncada S. 1997; Bogdan C. 2001; Aktan F. 2004). La iNOS se expresa en macrófagos alveolares como proteína citosólica en respuesta a estímulos inmunológicos como productos bacterianos por ejemplo los LPS, citocinas y mediadores lipídicos (Laroux F. et al. 2001; Li Y. 2002). El NO está implicado en la regulación de muchos procesos fisiológicos e inmunológicos como la regulación de citocinas. (Laroux F. et al 2001). El NO tiene un efecto inhibitorio en la expresión de muchos genes involucrados en enfermedades inflamatorias incluso en la regulación de la expresión genética de la óxido nítrico sintasa-2 al inhibir la unión del NF- $\kappa$ B a la región promotora del gen NOS (Kyu Song et al. 1997).

## **5. PERSISTENCIA DE VSR**

El fenómeno de persistencia viral se refiere a la permanencia dentro del hospedero por periodos largos de tiempo del genoma viral. Para que se establezca la persistencia es necesario que se cumplan dos condiciones: evasión del sistema inmune del huésped y que la replicación viral no origine muerte celular. Las infecciones persistentes no originan efecto citopático o daño excesivo, sin embargo se producen alteraciones en la actividad celular de distinta naturaleza las cuales pueden ser causa de diversas enfermedades. Aunque la persistencia del VSR no ha sido demostrada contundentemente algunas evidencias planteadas a continuación sugieren que la persistencia del virus es un factor etiológico de algunas patologías crónicas como el EPOC y asma (Mikhailchenkova NN. 1987; Krivitskaia V. y Iakovleva N. 1992).

1. Persistencia de linfocitos B con VSR bovino (VSRB) (Valarcher J. et al. 2001)
2. La bronquitis crónica representa uno de los principales cuadros clínicos después de la infección con VSR y es asociado a persistencia (Krivitskaia V. et al 1996)
3. En el modelo de cobayo se encontró que tanto las proteínas como el RNA genómico del VSR persisten en células del pulmón hasta seis meses después de la infección (Hegele R. et al. 1994; Streckert H et al 1996)
4. Presencia de antígenos de VSR en osteoclastos de pacientes con la enfermedad de Paget (enfermedad ósea crónica) (Mills B. et al. 1981; Mills B. et al. 1984; Mills B. et al. 1987)
5. Establecimiento de modelos de persistencia de VSR en líneas celulares en distintas líneas celulares ( Hep-2, HeLa, BS-C1, Balb/C , H358 y P388D1) (Baldrige P. y Senterfit L. 1976; Pringle C. et al. 1978; Fernie B. et al. 1981; Bangham C. y McMichael a 1986, Iankevich O y Dreizin R. 1977; Sarmiento R. et al. 2002; Romero-Valdovinos M. y Gomez B. 2003)

6. Persistencia local de células CD8<sup>+</sup> en pulmón de ratones infectados con VSR señalan a la persistencia viral o del antígeno en tejido alveolar como probable responsable (Ostler T. et al. 2001)

Algunas de las estrategias utilizadas por los virus para asegurar el establecimiento de la persistencia consisten en: la generación de virus incompletos o defectuosos, regulación de la expresión de sus genes, infección de células propias de sitios inmunoprivilegiados o células del sistema inmune tales como macrófagos y linfocitos (Oldstone M. 1989; Oldstone M. 1991, Ahmed R. et al. 1996; De la torre y Oldstone 1996). Por lo que los macrófagos alveolares son candidatos para la persistencia del VSR.

#### 6. COINFECCIÓN ENTRE VIRUS RESPIRATORIOS Y BACTERIAS.

La nasofaringe es un reservorio común de especies bacterianas como *Haemophilus influenzae* y *streptococcus pneumoniae* las cuales se consideran comensales frecuentes. Sin embargo, estas mismas especies en condiciones especiales como la coinfección con virus respiratorios son altamente patogénicas (Hament J. et al. 1999). Diferentes causas propician colonización bacteriana entre ellas se tiene el daño a células respiratorias o como consecuencia de infección viral previa que puede predisponer a una invasión oportunista bacteriana (Hament J.M. et al. 1999). La densidad de la colonización es un factor importante en el desarrollo de enfermedades causadas por bacterias y puede facilitarse como resultado de la infección viral. Durante la infección con el virus de influenza la coinfección bacteriana se considera como la causa más frecuente de mortalidad (Ahemer O. et al. 1999).

En el caso específico del VSR se tienen reportes en modelos *in vitro* y *ex vivo* de coinfección con *Haemophilus influenzae* (Hi) tipo b NTHi (Patel J. et al.1992 Takala et al. 1993, Raza M. et al. 2000), *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bordetella pertussis* y *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxela catarrhalis*, (Mlotkowski M.et al. 1986). La coinfección incrementa la unión bacteriana a células epiteliales y a monocitos y su sobrevivencia. (Raza M. et al. 2000;; El Ahmer O. R. et al. 1988; Patel J et al.1992)

#### **7. COINFECCIÓN ENTRE VSR-*Haemophilus influenzae* (HI)**

NTHi es una bacteria Gram-negativa considerada como causa mayor de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Aunque está reportada como un comensal común del tracto respiratorio superior humano; la NTHi es uno de los agentes causales comunes de otitis media, sinusitis, neumonía, conjuntivitis y en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) afectando tanto el sistema respiratorio alto como el bajo (Foxwell A. et al.1998; Rao V et al. 1999). EL VSR es un agente que predispone a coinfecciones con HI (Korppi M. et al 1989) (tabla a). Tanto NTHi como VSR son aislados frecuentemente durante exacerbaciones agudas de EPOC (Philit F. et al. 1992; Seemungal TA, & Wedzicha JA. 1993). Por otro lado, se ha demostrado en modelos animales que la infección por VSR refuerza la colonización nasofaríngea de NTHi (Jiang Z. et al. 1999; Patel J. et al. 1992). Además un estudio postmortem realizado en México de muestras de tejido pulmonar de niños que murieron por neumonía se reportaron infecciones mixtas entre VSR y neumonía bacteriana (Bustamante-Calvillo ME. et al. 2001).

### Coinfecciones entre VSR y *Haemophilus influenzae*

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

**Tabla a)** Coinfecciones y asociaciones reportadas entre VSR y *Haemophilus influenzae*

### **8. Activación de NF- $\kappa$ B por *Haemophilus influenzae* no tipificada (NTHi)**

El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción dimérico formado por las subunidades p50 (NF- $\kappa$ B1) y la p65 (RelA) entre otras, a su vez el NF- $\kappa$ B está controlado por una subunidad inhibitoria (I $\kappa$ B) la cual está unida al NF- $\kappa$ B en el citoplasma inhibiendo la actividad de NF- $\kappa$ B a través del bloqueo de su traslocación al núcleo, previniendo de esta forma la transcripción (Shuto T. 2001). La activación de una cascada de cinasas regula la degradación de la I $\kappa$ B a partir de su fosforilación en dos residuos de serina amino terminales (Brown K. et al. 1995), la degradación del I $\kappa$ B permite la translocación NF- $\kappa$ B al núcleo donde promueve la transcripción de diversos promotores. Tanto el receptor TLR-2 como el TLR-4 participan en la activación del NF- $\kappa$ B debido a la presencia de NTHi (Shuto T. et al. 2000; Wang X. et al. 2002; Lazou I. et al. 2001). TLR-4 es activado por LPS y utiliza como cofactor a la glicoproteína de superficie. TLR-4 modula una respuesta temprana contra NTHi en pulmones, en la cual están implicados tanto macrófagos alveolares como epitelio de las vías respiratorias (Wang, X et al. 2002). En células epiteliales alveolares la activación de TLR-4 es incrementada por la proteína de unión a LPS (LBP) la cual es producida por hepatocitos y por células epiteliales del sistema respiratorio, sin embargo las señales mediadas por TLR-2 no se incrementan.

## 9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que la EPOC es una causa frecuente de incapacidad y mortalidad, se conoce poco acerca de sus causas; sin embargo su incidencia se ha asociado a infecciones virales, bacterianas y coinfecciones. NTHi y VSR son frecuentemente aislados de la misma muestra o en forma separada durante exacerbaciones de EPOC (Smith C. et al. 1976; Philit F et al. 1992; Seemungal TA, & Wedzicha JA. 1993). Por otro lado el NTHi se presenta frecuentemente en pacientes con antecedentes de infección severa de VSR en los primeros años de vida (Takala et al. 1993). El efecto de la coinfección entre NTHi y VSR se ha estudiado en modelos *in vitro* con infección aguda de VSR (Raza W. et al. 2000); sin embargo no se han reportado estudios de coinfección de NTHi y VSR cuando este se encuentra en forma persistente, aún cuando existen evidencias que sugiere esta asociación. Los macrófagos alveolares son células blanco de la infección natural del VSR en el tracto respiratorio inferior (Panuska J. 1990), además de ser la primera línea de defensa del pulmón contra patógenos, por lo que se puede señalar a esta célula como un candidato en donde el VSR puede generar una infección persistente. En el presente trabajo se determinan las alteraciones en la actividad bactericida del macrófago a causa de la infección persistente del VSR en un modelo de persistencia *in vitro* y se sugiere un probable mecanismo asociado a la alteración de la capacidad bactericida.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. VIRUS

#### 1.1 VSR cepa Long (ATCC VR-26)

Cepa Long (ATCC VR-26). La cepa fue aislada por Chanok de un niño con infección aguda en el tracto respiratorio bajo en el año de 1963 y donado por el Dr. M. Trudel (*Instituto Armand Frappier, Ville de Laval, Canadá*). El virus fue propagado en células Vero y la infectividad viral fue determinada por ensayo de placa y efecto citopático (TCID<sub>50</sub>) en células Vero.

### 2. LINEAS CELULARES

#### 2.1 Células testigo (MφN)

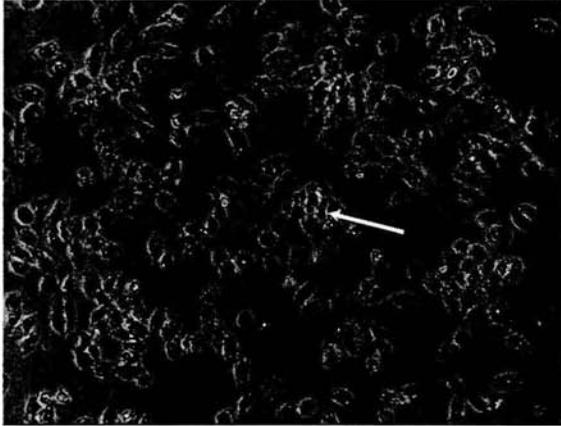
P388D1 (ATCC TIB 63). Obtenida por Dwe y Potter, derivada de un neoplasma linfoide (P388) inducido en ratón DBA/2 (H-2<sup>d</sup>) con metilclorantreno. Presenta características morfológicas y funcionales similares a las del macrófago. Esta línea fue donada a nuestro laboratorio por el Dr. A. Tingle (*Universidad de Columbia Británica Vancouver Canadá*) y utilizada para establecer el cultivo persistente (MφP).

#### 2.2 Células infectadas en forma Persistente (MφP).

Línea de macrófagos persistentemente infectados con VSR cepa Long. El cultivo fue previamente establecido y caracterizado nuestro laboratorio (Sarmiento R. et al. 2002). El cultivo se obtuvo por infección de MφN a m.o.i.=1 con VSRLong, las células que sobrevivieron se propagaron en medio RPMI al 10% de suero fetal bovino (SFB), las células de este cultivo se han mantenido a través de su propagación 2 veces por semana. La presencia del virus se monitoreó en forma rutinaria por medio de la detección de proteínas virales con inmunofluorescencia indirecta, así como de la amplificación del gen que codifica para la proteína N del virus a través de la transcripción reversa reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y por determinación de antígeno viral por medio de citometría de flujo.

### 2.3 Células infectadas en forma Aguda (MφA)

Línea de macrófagos infectados de forma aguda con VSR cepa Long propagado en el laboratorio a una m.o.i.=2.5 “o” =3. Los cultivos fueron infectados 2 horas antes de iniciar los ensayos. Figura ii)



**Figura ii).** Sincitio característico de la infección por VSR Pase 64 (MφA) (40X)

### 2.4 VERO (ATCC CCL 81)

Línea celular de fibroblastos de riñón de mono verde. Estas células fueron propagadas en medio D-MEM al 5% de SFB, al alcanzar confluencia celular la monocapa fue lavada tres veces con PBS y disociada con 0.1% de tripsina.

### 2.5 Hep-2 (ATCC, CCL 23)

Establecida por Moore, Sabachewsky y Toolan después de inducir la propagación de células de carcinoma epidermoide de laringe en ratas inmunosuprimidas. Las células fueron propagadas en medio RPMI/10 para subcultivar, cuando la confluencia fue alcanzada la monocapa fue lavada tres veces con PBS y disociada con tripsina/0.1%.

### 3. CUANTIFICACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular fue medida por exclusión de azul tripano. La exclusión del colorante es característica de las células cuya membrana se conserva intacta, las células que presentan daño en la membrana ingresan el colorante tornándose azules, a estas células se les considera no viables (Payment P. & Trudel M., 1993). Para efectuar el conteo se adquirieron 20 µl de la suspensión celular y se le agregaron 20 µl del colorante azul tripano, obteniéndose una concentración 1:2 Con la mezcla se llenó la cámara de Neubauer y se contaron los cuadrantes centrales de la cámara.

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

### 4. TITULACIÓN DE VIRUS

#### 4.1 Dosis infectiva 50 (TCID<sub>50</sub>)

Para cuantificar el daño celular se dispusieron de monocapas de células VERO en placas de 96 pozos cubiertas con medio D-MEM al 5% de SFB. Los pozos se infectaron con 25 µl de cada una de las diluciones seriadas 1:4 de la suspensión viral en mediodo infección D-MEM al 2% por cuadruplicado, el inóculo fue absorbido por 2 horas a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>. Las placas fueron incubadas de 6-7 días al producirse el efecto citopático. El título viral se expresó en TCID<sub>50</sub>/ml y se determinó utilizando la fórmula de Kärber (Payment P. & Trudel M. 1993)

$$\text{TCID}_{50} = -\Delta - \delta (\Sigma - 0.5)$$

Donde:

$\Delta = \log_{10}$  de la última dilución con el 100% de pozos + (pozos con efecto citopático)

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

$\Sigma$  = suma de las fracciones que representan los pozos donde se observa efecto citopático en la placa tomando en cuenta a partir de la última dilución que presenta el total de pozos con efecto citopático hasta la primera dilución en donde no se encuentra ningún pozo con efecto.

	$1/1$	$1/4$	$1/16$	$1/64$	$1/256$	$1/1024$	$1/4096$	$1/16384$	$1/65536$	$1/262144$	Ctrl
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
B	+	+	+	+	+	+	+	+			
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

Con efecto citopático

Sin efecto citopático

Usando los valores del esquema anterior, tenemos que:

$$\Delta = -4.2144$$

$$\delta = \log_{10} 4 = 0.602059$$

$\Sigma = 1.5$  o la suma de:

$$1/16384 : 4/4 = 1.000$$

$$1/65536 : 3/4 = 0.750$$

$$1/262144 : 0/4 = 0.000$$

$$= 1.750$$

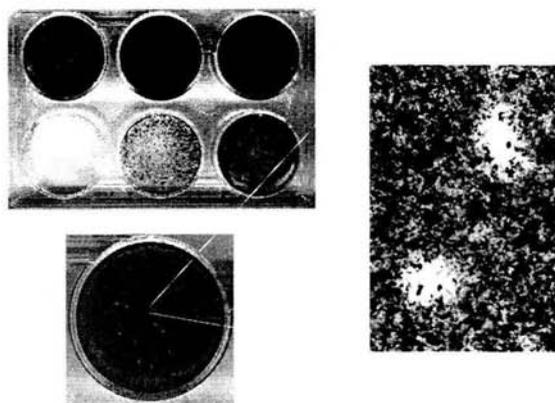
Remplazando los valores en la ecuación:

$$\begin{aligned} \text{TCID}_{50} &= \Delta - \delta (\Sigma - 0.5) \\ &= -4.2144 - (0.602059) (1.75 - 0.5) \\ &= -4.2144 - 0.7525 \\ &= -4.9669 \\ &= 10^{-4.9669} / 25 \mu\text{l} \\ &= 10^{4.9669} / 0.025 \text{ml} \end{aligned}$$

$$\text{TCID}_{50} = 3.7 \times 10^6 (0.7) = 2.59 \times 10^6 \text{ partículas virales/ml.}$$

#### 4.2 Titulación por ensayo de placa

El virus infeccioso fue cuantificado en monocapas de células VERO en placas de 6 pozos. Se hacen diluciones seriadas de VSR en 500  $\mu$ l de RPMI 1640 sin suero, las diluciones fueron absorbidas por las monocapas durante 1 hora a 37°C, posteriormente se retiró el inóculo y se agregaron 3 ml de RPMI 1640/agar indubiosa A-37 0.3% y 2.5% de SFB. Pasados 6-7 días de incubación en agitación constante a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>, las células fueron fijadas en formaldehído al 10 % en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos fueron lavados con agua de grifo y el agar fue retirado y finalmente los pozos fueron teñidos con 700  $\mu$ l de una solución de cristal violeta al 2% en 20% de Metanol. (Figura iii).  
UFP/ml= (#de placas) (factor de dilución) (20).



**Figura iii.** Se muestra un acercamiento de dos placas

## 5. BACTERIA

### 5.1 *Haemophilus influenzae* NT (ATCC 49766)

Obtenida por Lehmann & Neumann de un paciente de 57 años que presentaba daño pulmonar. Propagada en agar chocolate con polienriquecimiento (ACHP) a 37° C en

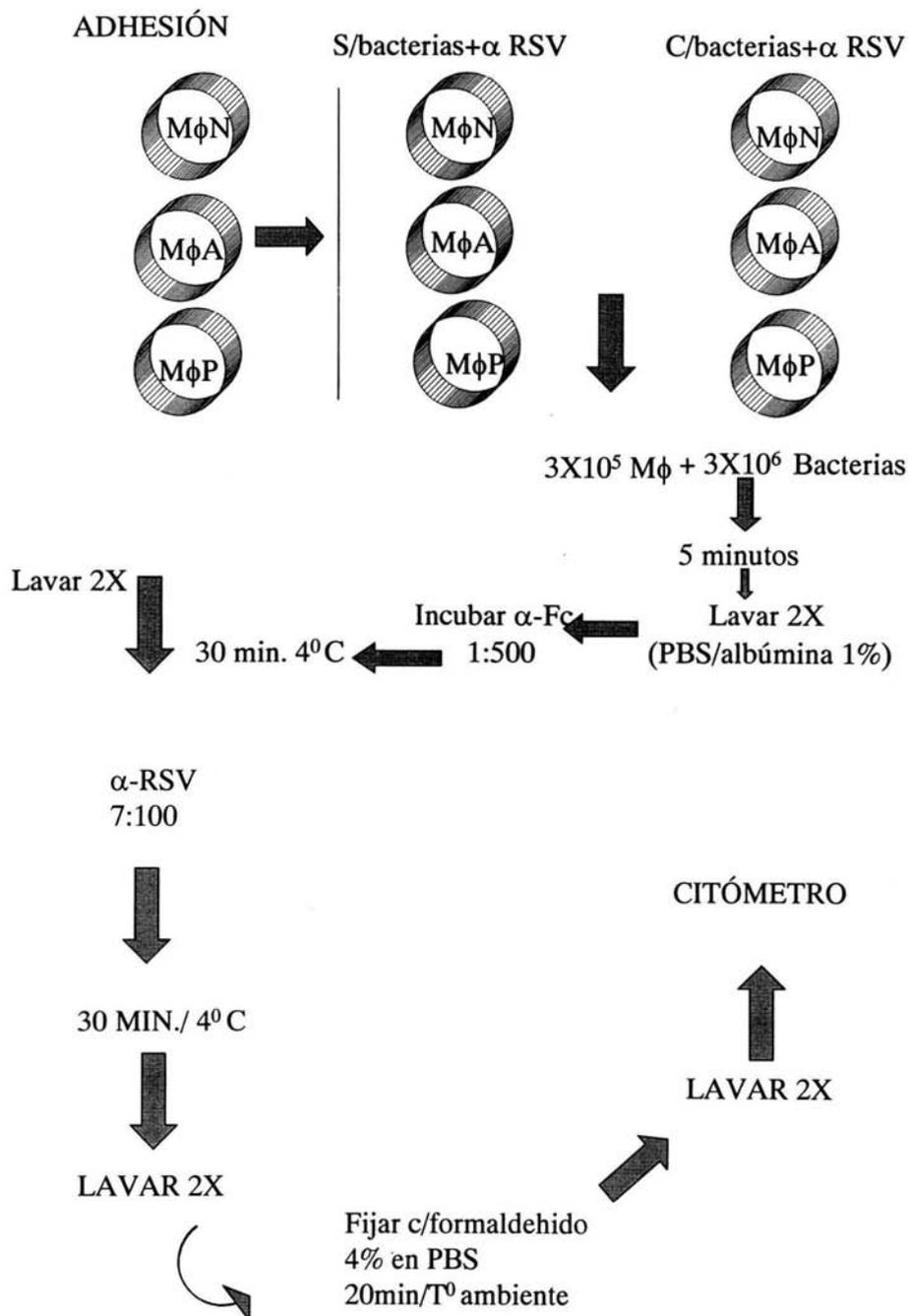
atmósfera de CO<sub>2</sub> 5% Donada por la QBP. M. G. Viveros (Instituto de Diagnóstico Epidemiológico SSA.) para fines prácticos el texto se referirá a esta bacteria como NTHi.

### 5.2 Marcaje de bacteria con bromuro de etidio

Brevemente, se obtuvo cultivo joven (24 hrs. de crecimiento) de bacteria NTHi y fue puesta en suspensión, se lavó con PBS y se fijó con paraformaldehído/1% por 30 minutos en baño de agua a 37° C se lavó con PBS dos veces y fue incubada con bromuro de etidio 50 µg/ml durante 20 minutos La bacteria fue lavada y el conteo se realizó por microscopía directa en dilución 1:100 totalizando  $5.1 \times 10^8$  /ml, la bacteria fue dispuesta en pequeñas cantidades y congelada -20°C (Raza M.W. et al. 2000).

### 5.3 Unión de Bacteria

Se dispuso de  $3 \times 10^5$  células de los cultivos MφN, MφA y MφP en tubos ependorf estos se inocularon con diez bacterias marcadas con bromuro de etidio, se incubó entre 30 segundos y 30 minutos en movimiento constante para efectuar la cinética, a partir de está se determinó incubar por 5 minutos. En ensayos posteriores. A continuación los Mφ fueron lavados tres veces con PBS/albúmina 1% y se agregó anti-fc a una dilución de 1:500 por 30 minutos a 4°C, se lavó tres veces y se agregó anti-VSR fluoresceinado (DAKO #K6102) a una dilución 7:100 por 30 minutos a 4°C, se lavó tres veces con PBS y se fijó en PBS/paraformaldehído al 4%, las muestras fueron lavadas dos veces y resuspendidas en un mililitro en tubos de poliestireno hasta por 48 horas para efectuar el análisis por citometría de flujo (figura 2).



**Figura iv.** Diagrama de flujo de adhesión

#### 5.4 Ingestión de bacteria

Se dispuso de  $3 \times 10^5$  células de los cultivos M $\phi$ N, M $\phi$ A y M $\phi$ P en placas de 6 pozos, se procedió a inocular con la bacteria marcada ajustando a diez bacterias por célula y se incubó entre 30 y 90 minutos, en movimiento constante, con estos tiempos realizó la cinética, (figuras 4 y 5) y se determinó incubar por 90 minutos, y se procedió de manera similar al punto anterior. Después de realizar la primera lectura por citometría de flujo se agregaron 20  $\mu$ l de cristal violeta 0.05 en 0.15N de cloruro de sodio este paso provoca “apagado” sobre la lectura de la bacteria marcada mayor al 90 % (Raza MW. et al. 2000) por lo que se realizó la lectura de las muestras a una DO<sub>595</sub> lo que permite obtener una lectura de la bacteria marcada en el interior de los M $\phi$ .

#### 5.5 Sobre vivencia intracelular de bacteria.

Se dispuso de  $3 \times 10^5$  células de los cultivos M $\phi$ N, M $\phi$ A y M $\phi$ P en placas de 12 pozos, se agregaron bacterias NTHi de un cultivo joven (24 hrs.) a una multiplicidad de infección de 1:100 disueltas en RPMI se cultivaron 105 minutos en atmósfera de CO<sub>2</sub> a 37<sup>0</sup> C, se lavó dos veces con PBS y se agregó 40 mg/ml de gentamicina por 20 minutos, se lavó dos veces con PBS se disgregaron las células por pipeteo fueron cuantificadas por exclusión de azul tripano, se centrifugó y resuspendió en 50  $\mu$ l de PBS/SDS 0.05% para lisar los M $\phi$ , e inmediatamente se procedió a plaquear en agar chocolate con polienriquecimiento (AHP), incubando de 24 a 36 hrs. para conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC)

## SOBREVIDA INTRACELULAR

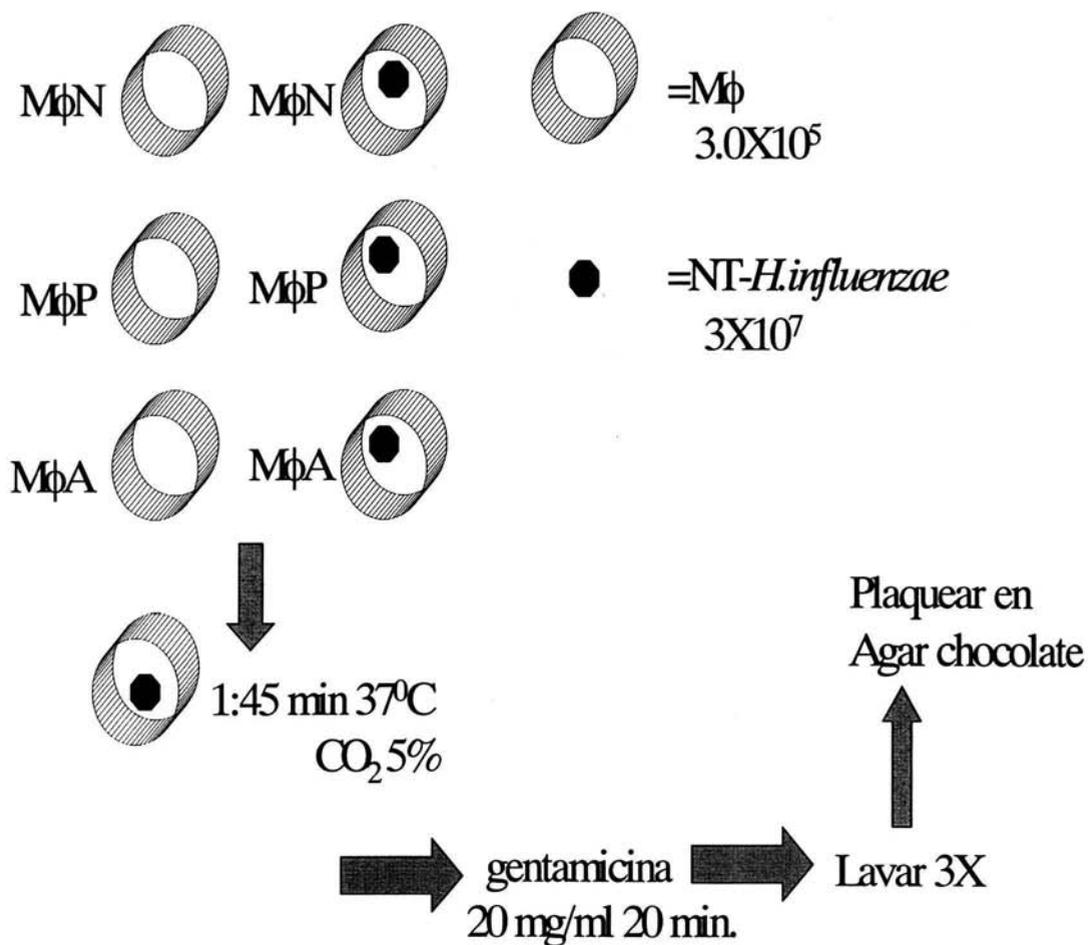


Figura v. Diagrama de flujo de sobrevivencia

## 6. NO

### 6.1 NO<sub>2</sub> en Mφ

Se dispuso de  $1 \times 10^5$  células de los cultivos MφN, MφA y MφP en placas de 96 pozos se cultivaron en CO<sub>2</sub> 5% a 37° C por 24 horas después 2 veces con RPMI y se cubrieron con 200 μl de RPMI/10 por 24 hrs. Se obtuvieron el sobre nadante de cada muestra y se cuantificó la concentración de NO<sub>2</sub> que es un producto final estable del NO a través de la reacción de Griess.

### 6.2 Determinación de concentración de nitrito

La determinación se efectuó de acuerdo a las instrucciones del Griess Reagent System (Promega G2930). Brevemente, para realizar la curva estándar de referenciase prepara 1 ml 100 μM de solución de nitrito a partir de la dilución 1:1000 de nitrito estándar en RPMI (matriz experimental), a continuación se designaron tres columnas (A, B y C 24 pozos) y se les cubrió con 50 μl de RPMI en la placa de 96, a excepción de los pozos A1, B1 y C1 donde se dispusieron 100 μl de la solución 100 μM a partir de los cuales se realizaron diluciones seriales de 50 μl (100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.13 μM) el último pozo funcionó como blanco por lo que no se añadió solución de nitrito a la última hilera que correspondía a la concentración 1.56 μM.

#### 6.2.1 Reacción de Griess

Se agregaron 50 μl de cada muestra por triplicado, todas las muestras se cubrieron con 50 μl de solución de sulfanilamida incluyendo las diluciones de la curva de referencia de NO<sub>2</sub>, las muestras fueron incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente en un recipiente oscuro evitando entrada de luz, posteriormente las muestras fueron recubiertas con 50 μl de solución NED, e incubadas por 10 minuto a temperatura ambiente en un recipiente oscuro, finalmente se midió la absorbancia en un lector de placa con un filtro de 550 nm, hasta 30 minutos posteriores a la reacción.

## **7. ANÁLISIS DE DATOS**

Las muestras de los ensayos de adhesión e ingestión fueron adquiridas por citometría de flujo y los datos fueron analizados utilizando el software WinMDI (**Windows Multiple Document Interface**) versión 2.8 desarrollado por The Scripps Research Institute. El análisis estadístico de las diferencias entre los cultivos MφN, MφA y MφP con bacterias y sin bacterias fue realizado aplicando una t de Student para poblaciones que no presentan una distribución Normal

La diferencia entre los valores fue considerada significativa cuando  $p < 0.05$

## **HIPÓTESIS**

La persistencia del VSR en los macrófagos altera su capacidad bactericida.

## **Objetivo General**

Determinar la capacidad bactericida del macrófago en un modelo *in vitro* de persistencia de VSR.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1- Confirmar la persistencia del VSR en la línea celular P388D1. Modelo de persistencia establecido y caracterizado en el laboratorio de virología (*Sarmiento R. et al. 2001*)

2. Utilizar como patógeno blanco una cepa de *Haemophilus influenzae* para determinar la capacidad del macrófago persistentemente infectado con VSR para:

- a) Adherir bacterias
- b) Ingerir bacterias
- c) Destruir de bacterias
- d) Producir oxido nítrico

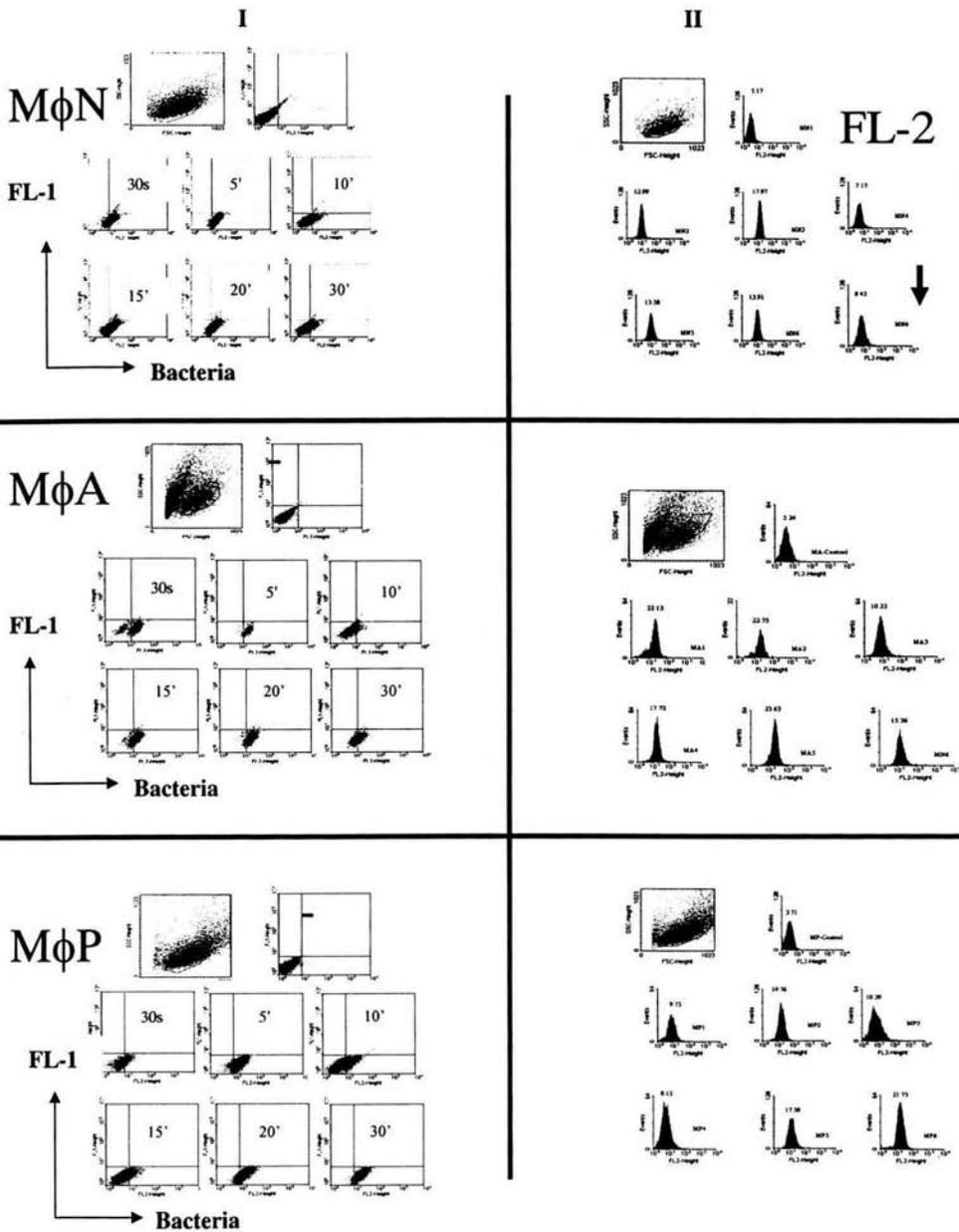
## **RESULTADOS:**

### **1. CONFIRMACIÓN DE LA PERSISTENCIA DE LA LÍNEA CELULAR P388D1.**

La presencia del VSR en los M $\phi$ P fue monitoreada tanto por citometría de flujo, como por inmunofluorescencia directa, se utilizó una mezcla de anticuerpos monoclonales murinos anti-VSR fluoresceinados (DAKO #K6102) a una dilución 7:100, los resultados reflejan la presencia del virus en alrededor del 80% de los M $\phi$ P.(figura 5).

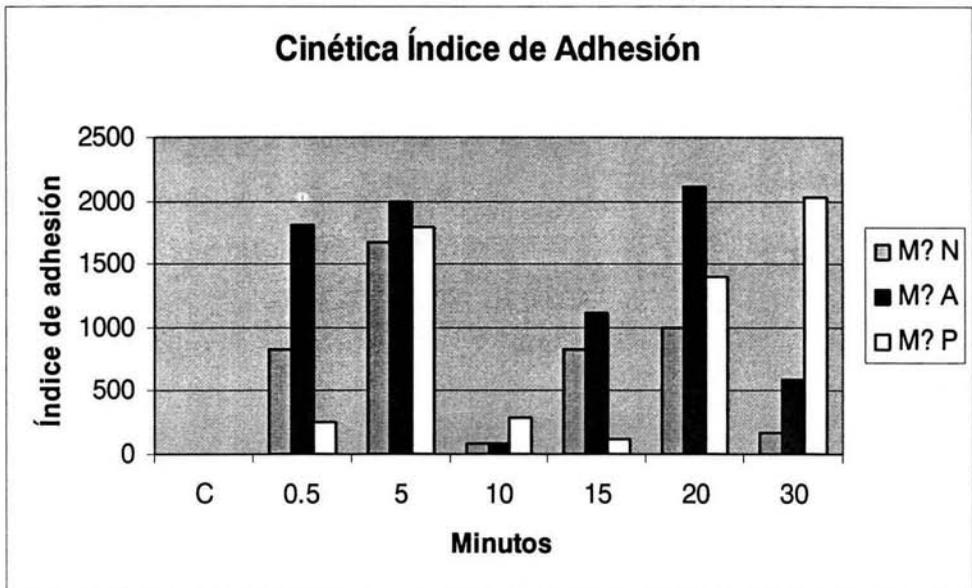
### **2. Cinética de adhesión e ingestión**

Para fijar los tiempos óptimos con el fin de realizar los experimentos de adhesión e ingestión, se llevó acabo una cinética a los 30'', 5', 10', 15', 20' (adhesión)(figura 1) y a los 45', 60' y 90' (ingestión) (figura 3). A partir de esta cinética se determinaron los índices de adhesión e ingestión y se consideró que 5 minutos de adhesión bacteriana y 90 minutos de ingestión bacteriana son convenientes para llevar acabo la adhesión y la ingestión respectivamente.

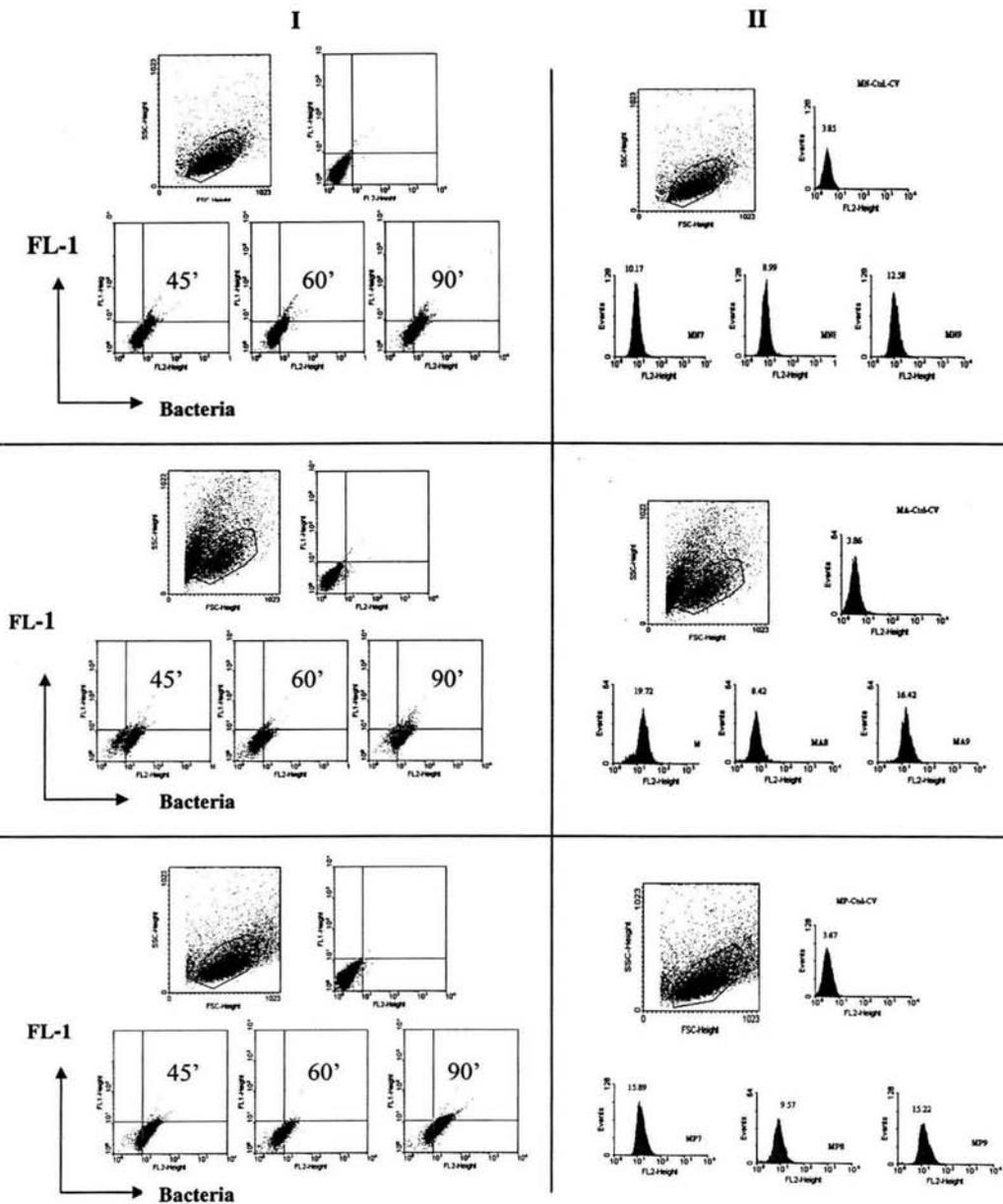


**Figura 1.** Citometría de flujo para la adhesión. La figura muestra la cinética de adhesión con lecturas a los 0, 30", 5', 10', 15', 20' y 30', el panel I corresponde a los Dotplots donde FL-2 (macrófagos con bacteria adherida) corresponde a las células con fluorescencia positiva para bromuro de etidio; contra FL-1 que corresponde a células con fluorescencia negativa para bromuro de etidio. En el panel II se muestran histogramas donde se indica la media de la intensidad de fluorescencia de las bacterias marcadas con bromuro de etidio.

## ÍNDICE DE ADHESIÓN

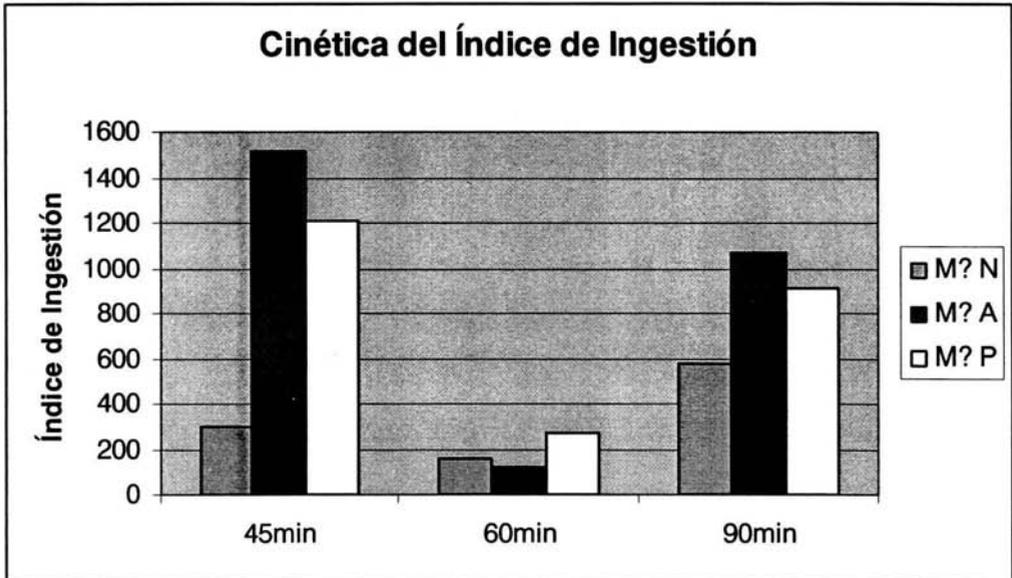


**Figura 2.** Cinética del Índice de Adhesión, se muestran el índice de adhesión obtenido de la multiplicación del porcentaje de células infectadas por la media de la intensidad de fluorescencia de los,  $M\phi P$   $\square$ ,  $M\phi N$   $\blacksquare$  y  $M\phi A$   $\blacksquare$ ; a los 0, 0.5, 5, 10, 15, 20 y 30 minutos.



**Figura 3.** Citometría de flujo para la ingestión. La figura muestra la cinética de ingestión con lecturas a los 45', 60', 90' y control, el panel I corresponde a los Dotplots donde FL-2 (bacteria) corresponde a las células con fluorescencia positiva para bromuro de etidio, es decir, con bacteria; contra FL-1 que corresponde a células con fluorescencia negativa para bromuro de etidio. En el panel II se muestran histogramas donde se indica la media de la intensidad de fluorescencia de las células positivas para la bacteria marcada con bromuro de etidio.

## ÍNDICE DE INGESTIÓN

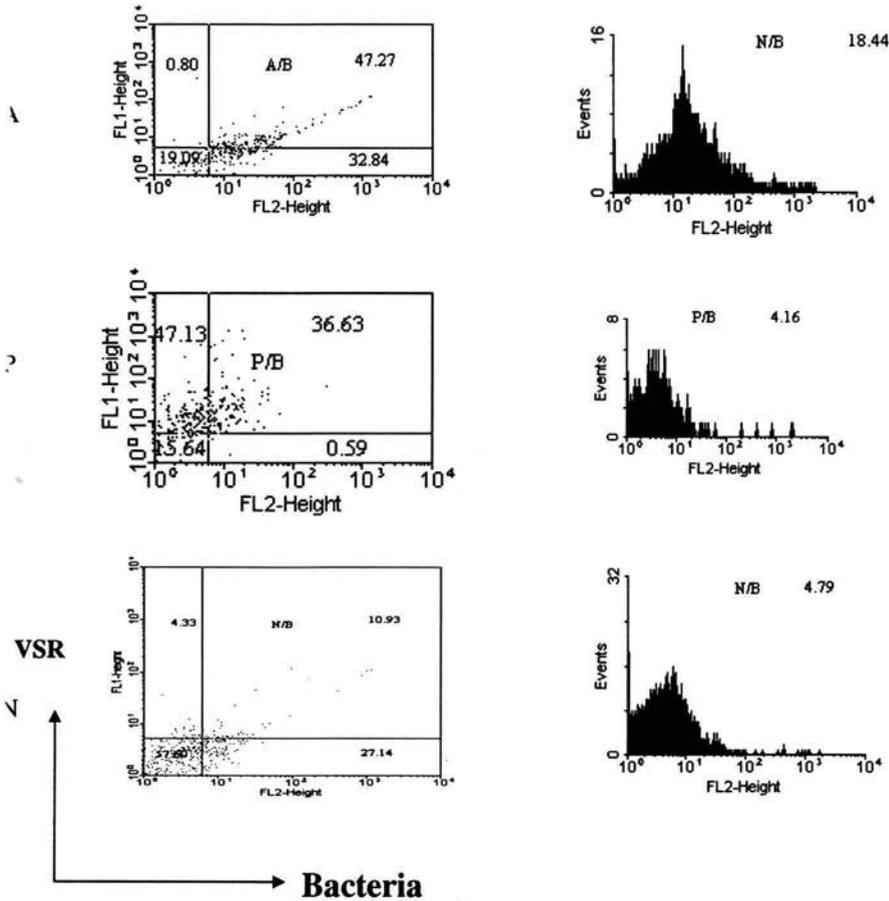


**Figura 4.** Cinética del Índice de Ingestión, se muestran el índice de ingestión obtenido de la multiplicación del porcentaje de células infectadas por la media de la intensidad de fluorescencia de los,  $M\phi P$  □,  $M\phi N$  ▒ y  $M\phi A$  ■, a los 45, 60 y 90 minutos.

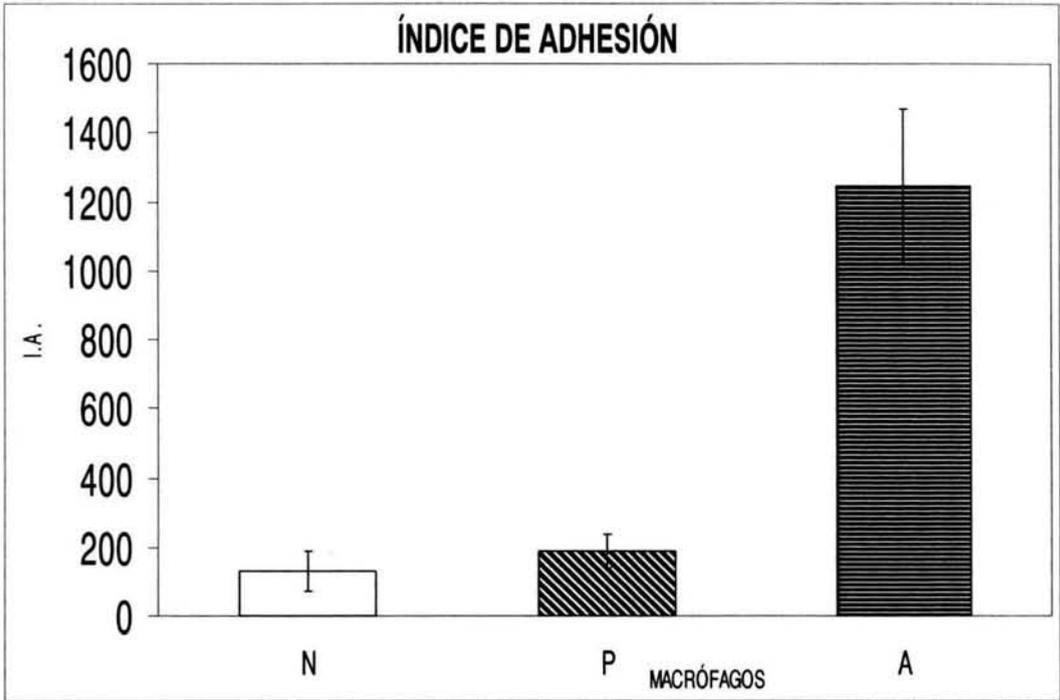
### **Efecto de la infección aguda y persistente del VSR en la adhesión e ingestión de NTHi.**

En la figura 5 se muestran ensayos representativos de la adhesión de la bacteria NTHi a macrófagos murinos de la línea P388D1 infectados en forma aguda, persistente y no infectados, los cuadrantes revelan el porcentaje de células infectadas con bacteria (FL-2), con virus (FL-1), y coinfectadas (cuadrante superior derecho), los macrófagos M $\phi$ A y M $\phi$ P presentaron un porcentaje superior de células con bacterias adheridas significativamente superior que los M $\phi$ N así mismo la media de la intensidad de fluorescencia de la bacteria fue significativamente superior en el caso de los macrófagos M $\phi$ A, a partir de estos resultados se obtuvo un índice arbitrario de adhesión (IA) (Figura 6) propuesto por Raza y cols. (Raza W et al. 2000), obtenido de la multiplicación del porcentaje de células infectadas por la media de la intensidad de fluorescencia alcanzada en los histogramas. El IA obtenido fue superior para los M $\phi$ A al alcanzado por los M $\phi$ P y M $\phi$ N. El porcentaje de ingestión de la bacteria NTHi fue determinado por “apagado” a través de cristal violeta de la fluorescencia emitida por la bacteria extracelular y se vio disminuido en los M $\phi$ A y M $\phi$ P con respecto a los M $\phi$ N (figura 7), Del mismo modo que en el caso de la adhesión se determinó un índice arbitrario para determinar el índice de ingestión (Figura 8), el cual muestra disminución de la fagocitosis de los M $\phi$ A y M $\phi$ P con respecto a los M $\phi$ N en concordancia al porcentaje de células ingeridas

## ADHESIÓN

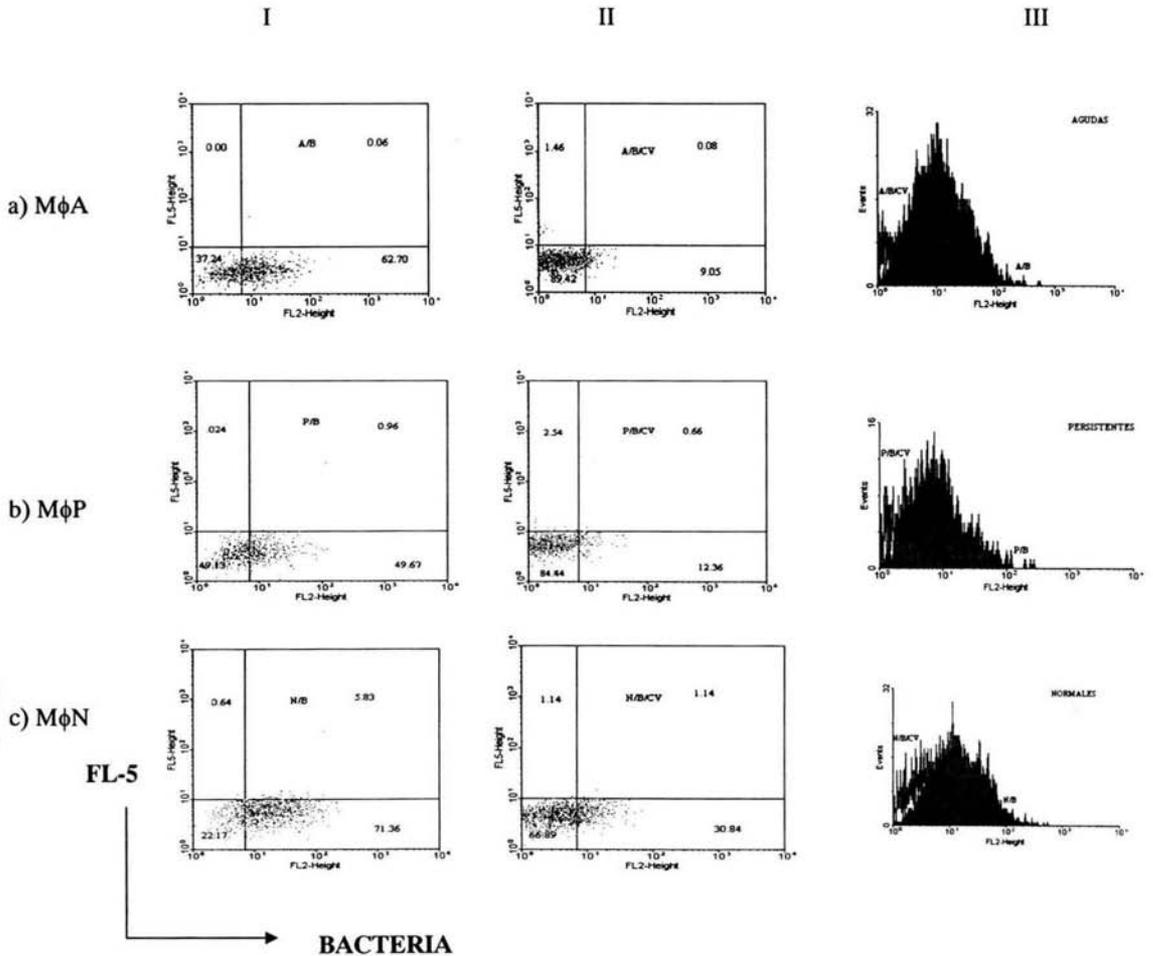


**Figura 5.** Cuadro representativo de los ensayos de adhesión. La columna de la izquierda (Dotplot's) muestra la población celular positiva para FITC VSR<sup>2</sup> (FL-1) vs. la población positiva para bromuro de etidio; Bacteria (FL-2) y la columna derecha (histograma) muestra la intensidad de fluorescencia del bromuro de etidio. a) MφA con bacterias. b) MφP con bacterias. c) MφN con bacteria

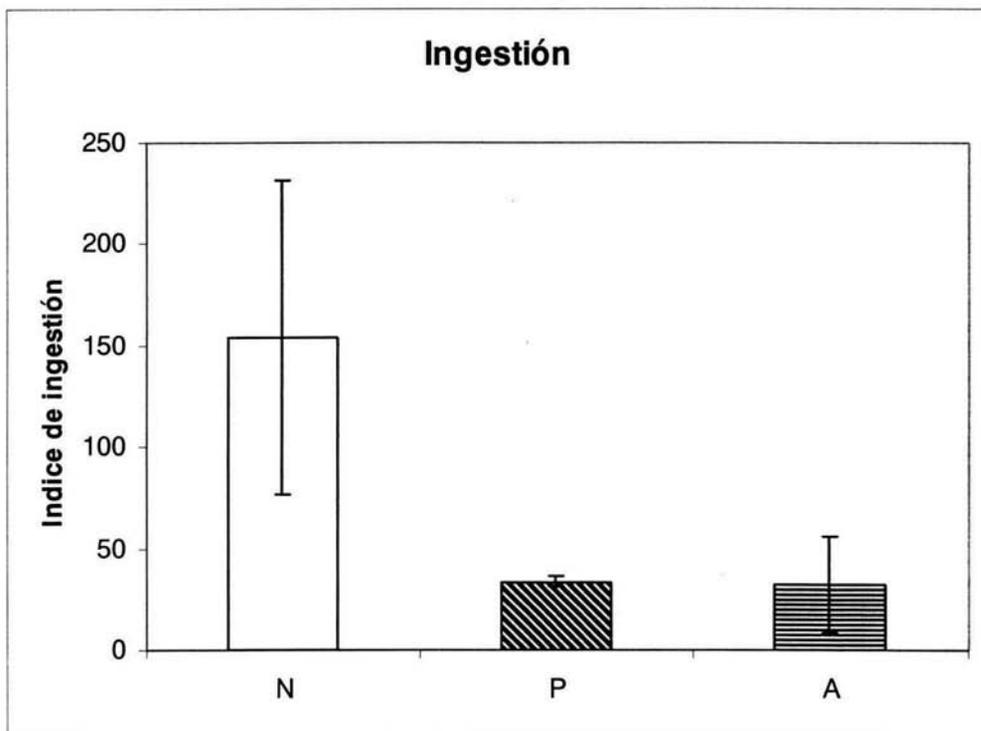


**Figura 6.** Índice de adhesión se muestra el resultado de 3 experimentos individuales Representando la media y la desviación estándar de los tres \* $P < 0.001$  entre los macrófagos agudos (A) y normales (N) o agudos y persistentes (P).

# INGESTIÓN



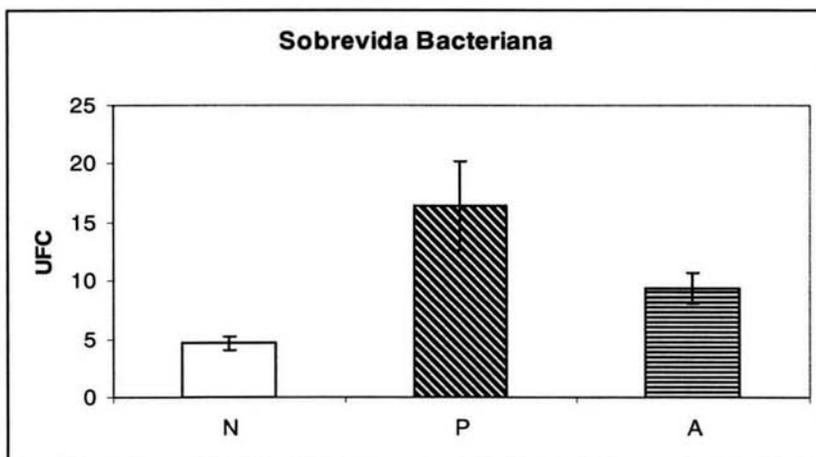
**Figura 7.** Se muestra un ensayo representativo de ingestión. FL-5 es la fluorescencia negativa para bromuro de etidio y FL-2 es la fluorescencia positiva para bromuro de etidio; a) MφA con bacteria. b) MφP con bacterias. c) MφN con bacteria. Panel I bacteria total (intracelular y extracelular). Panel II bacteria intracelular (con cristal violeta). III (Histograma) intensidad de fluorescencia de bacteria intracelular (con cristal violeta) vs. Intracelular y extracelular (sin cristal violeta).



**Figura 8:** Índice de ingestión se muestra el resultado de 3 experimentos individuales. Representando la media y la desviación estándar de los tres \* $P < 0.001$  entre los macrófagos Normales (N), agudos (A) y persistentes (P).

### Sobrevivencia intracelular de la bacteria

La capacidad bactericida de los M $\phi$ N es superior a la exhibida por los M $\phi$ A mientras que los M $\phi$ P ostentaron el mayor número de UFC, es decir, tienen una capacidad bactericida disminuida con respecto a los M $\phi$ N y M $\phi$ A (Figura 9).

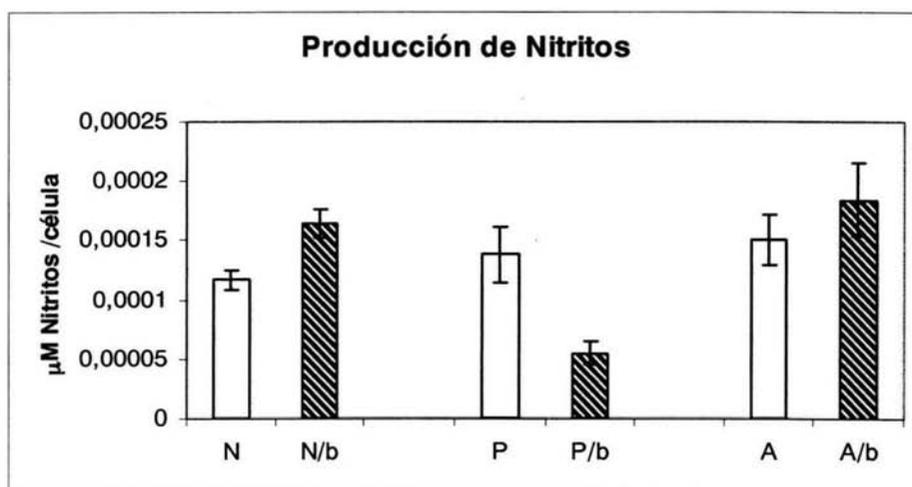


**Figura 9.** Sobrevida bacteriana se muestra el resultado de 3 experimentos individuales por triplicado. Representando la media y la desviación estándar de los tres \* $P < 0.050$  entre los macrófagos normales (N) y los agudos y persistentes (P).

### Producción de óxido nítrico

La producción de nitritos fue cuantificada para los M $\phi$ N, M $\phi$ A y M $\phi$ P *per se* y en presencia de la bacteria, los resultados se muestran en la figura 10 e indican que los M $\phi$ N con bacteria inducen una mayor producción de nitritos que su control M $\phi$ N, así mismo en la infección aguda M $\phi$ A con bacteria se observó una producción superior de NO<sub>2</sub> con respecto

a los MφN, finalmente la producción de nitritos de los MφP fue similar a la de los MφN, sin embargo los MφP con bacterias mostraron una concentración significativamente menor que la presentada por su control (MφP).



**Figura 10.** Producción de nitritos totales de cultivos de macrófagos normales agudos y persistentes solos y con bacterias. Se observa que los macrófagos normales (N) aumentan ligeramente su producción de nitritos al ponerse en contacto con bacterias (N/b) al igual que los agudos (A vs A/b) pero los persistentes disminuyen su producción (P, P/b) de nitritos  $P < 0.01$ .

**TABLA DE DATOS GENERAL**

		M $\phi$ N	M $\phi$ A	M $\phi$ P	M $\phi$ N/b	M $\phi$ A/b	M $\phi$ P/b
<b>ÍNDICE DE ADHESIÓN</b>	% ADHESIÓN	29.5	83.32	42.97			
	Media fluorescencia	4.2	14.99	4.43			
	Índice	<b>123.9</b>	<b>1248.96</b>	<b>190.35</b>			
		+/- 58.16	+/- 245.7	+/- 48.40			
<b>ÍNDICE DE INGESTIÓN</b>	% ADHESIÓN	31.86	11.5	12.07			
	Media fluorescencia	4.63	2.6	2.75			
	Índice	<b>147.31</b>	<b>32</b>	<b>33.2</b>			
		+/- 77.67	+/- 23.60	+/- 2.59			
<b>SOBREVIDA BACTERIA</b>	M $\phi$ /1X10 <sup>5</sup> U.F.C	4.63 +/- 0.60	9.41 +/- 1.28	16.38 +/-3.7			
<b>PRODUCCIÓN DE NITRITOS</b>	$\mu$ M NO <sub>2</sub> /cel.	<b>1.319</b> <b>E-04</b> +/- 0.82418 E-05	<b>1.69</b> <b>E-04</b> +/-2.1517 E-05	<b>1.407</b> <b>E-04</b> +/-2.3563 E-05	<b>1.609</b> <b>E-04</b> +/-1.2115 E-05	<b>1.82</b> <b>E-04</b> +/-3.0727 E-05	<b>.533</b> <b>E-04</b> +/-1.0221 E-05

**Tabla b)** En la tabla se incorporan los datos de los ensayos presentados, adhesión, ingestión, sobrevida y producción de nitritos.

## Discusión

Los resultados presentados en este trabajo muestran la infección aguda y la persistente con el VSR alteran la actividad bactericida del macrófago, sin embargo, los cambios producidos por la infección aguda difirieron de la persistente.

Macrófagos infectados en forma aguda adhirieron más bacterias que los persistentemente infectados y los normales, El mayor índice de adhesión se obtuvo con M $\phi$ A (1244) con M $\phi$ P este valor fue de (188) y con M $\phi$ N (129). Posiblemente el incremento en el índice de adhesión en M $\phi$ A se asocia con aumento en receptores para la bacteria inducidos por la infección viral. Esta interpretación se fundamenta en reportes de sobre expresión de receptores por NTHi como CD14, CD15 y CD-18 en células por infección aguda con VSR La diferencia en los valores del índice de adhesión observado entre M $\phi$ A y M $\phi$ P se puede relacionar a las condiciones de infección de los cultivos.

Los experimentos de infección aguda se hicieron después de adsorber el virus 2 horas evitando así la expresión del genoma, en cambio en el cultivo persistente el genoma se transcribe y traduce, más del 92 % de las células expresan antígeno viral y se tiene producción residual de virus infeccioso (100-200 unidades formadoras de focos/ml ). Además en el cultivo infectado en forma aguda la multiplicidad de infección fue de 3, lo que implica que el 50% de las células interaccionaron con el virión, quizá dicha interacción así como la penetración del virus por fusión con la membrana celular originó cambios exponiendo receptores a NTHi.

En cambio en el cultivo persistente es despreciable el número de células que interaccionan con el virión, en este cultivo la relación macrófagos virus es de  $2 \times 10^2$  virus por cada 108 células de tal forma que no se aumentan los receptores celulares a la bacteria.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en una infección aguda con el VSR en células Hep-2 en donde se observa un incremento en el índice de adhesión (Raza W. et al. 1993), no así en los monocitos humanos THP-1 donde el índice de adhesión disminuye; pero el índice de ingestión y la capacidad bactericida disminuye (Raza W. et al. 2000) coincidiendo con nuestros resultados; sin embargo debemos considerar el tiempo de incubación ya que en lo reportado por Raza la actividad bactericida se determinó a 16 y 20 horas post-infección permitiendo la replicación del virus, mientras que en nuestras condiciones esta no se presenta.

Los índices de ingestión presentados por los cultivos difirieron entre los cultivos, el valor más alto de índice de ingestión lo presentó el cultivo normal (154) en cambio no de observó diferencia entre los valores obtenidos en los cultivos infectados, agudo (33), persistente (32). Estos datos pueden deberse a que productos virales o bien la infección por VSR interfiere con el mecanismo de ingestión del macrófago. Otro factor que probablemente influya es competencia en ingestión por el macrófago entre partículas virales y bacteria

Además otro factor que participa en el aumento en del índice de adhesión y de ingestión observado por M $\phi$ A con respecto a M $\phi$ N y M $\phi$ P se relacione con la presencia de glicoproteínas virales (F y G) en la membrana celular, las cuales pueden actuar como receptores de la bacteria. Este fenómeno a su vez explicaría la reducción de la ingestión bacteriana por células infectadas ya que estas proteínas no son receptores celulares y por lo tanto incapaces de desencadenar el proceso de ingestión.

La infección viral aguda o persistente disminuye la capacidad bactericida del macrófago, en MφN sobrevivieron (5 UFC /ml) en cambio en los cultivos persistente se obtuvieron los siguientes valores, en el agudo (9 UFC /ml) y en el persistente (16 UFC/ml).

La actividad microbicida del macrófago se relaciona con la concentración de intermediarios reactivos de nitrógeno (NOIs) y del oxígeno (ROIs). Así como con la actividad enzimática de la lisozima, catalasa y peroxidasa.

Con la finalidad de estudiar el mecanismo responsable de la sobrevivencia de la bacteria en los cultivos infectados, se determinó la concentración de nitritos en los diferentes cultivos. Los resultados mostraron que la infección viral en macrófagos incrementa la concentración de nitritos con respecto a macrófagos normales, MφA(0.00016981) , MφP (0.00014074), MφN (0.00013196). La infección bacteriana en MφN (.00016098) y MφA (0.00018261) originó aumento en la concentración de nitritos, en contraste dicha concentración se redujo en los MφP (5.333E-05) cultivo persistente, este efecto es congruente con los datos obtenidos en sobrevivencia de la bacteria, en MφP y MφN sin embargo contradice la sobrevivencia de la bacteria en MφA.

En conclusión la actividad bactericida del macrófago se ve afectada diferencialmente entre los dos tipos de infección viral así como por la coinfección con la bacteria.

## CONCLUSIONES

- 1.- La persistencia del VSR altera la capacidad bactericida del macrófago.
- 2.- Los M $\phi$ A agudos presentan el mayor índice de adhesión.
- 3.- La infección por VSR (aguda y persistente) disminuye la ingestión bacteriana
- 4.- La producción de óxido nítrico en M $\phi$ P infectados con bacteria se ve significativamente disminuida con respecto a los M $\phi$ P
- 5.- La capacidad bactericida de los M $\phi$ P es significativamente menor que la presentada por los M $\phi$ A y M $\phi$ N.

# APÉNDICE

## MATERIAL Y REACTIVOS.

### Medios y suplementos para cultivo

D-MEM (GIBCO 12100-046)

RPMI 1640 (GIBCO 23400-021)

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

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

- Medio de cultivo para las células VERO.

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

Medio de cultivo para *Haemophilus influenzae*

Base agar sangre

Infusión cerebro corazón (BIXON 4029069)

- Agregados.

Suero fetal bovino (GIBCO-BRL 10437-028)

Hepes (SIGMA H-0763)

Bicarbonato de sodio (PRODUCTOS QUÍMICOS MONTERREY 1290)

2- Mercaptoetanol (BIO-RAD 161-0710)

L-Glutamina (SIGMA G-1517)

Polienriquecimiento liofilizado (BIXON 211665)

Agar Indubiosa A-37 (Biosepra, UK)

Sangre de carnero desfibrinada

### Reactivos y Soluciones

- NaCl (MERCK 6404)
- NaSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (MERCK 6649)
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (J.T. BAKER 790)
- MgSO<sub>4</sub> (J.T. BAKER 2500)
- NaOH (MERCK 6498)
- NaNO<sub>2</sub> (Productos químicos de Monterrey 44901)
- NED (SIGMA N-9125)
- Cristal violeta (SIGMA C0775)
- SDS
- Bromuro de etidio (sigma 1239-43-8)
- Sulfato de Gentamicina (SON'S 87882)
- Azul Tripano (SIGMA T5526)
- Albúmina Sérica Bovina (SIGMA A-3350)
- Tripsina (SIGMA 1989)
- Paraformaldehído (SIGMA P6148)
- Dimetilsulfóxido (J.T. BAKER 9224)
- PBS

NaCl	8.0 gr
KCl	0.2 gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.96 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 gr

Se afora a 1 litro, se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza por autoclave.
- Solución de Albúmina al 1% en PBS

1 gr de Albúmina Sérica Bovina en 100ml de PBS

### Anticuerpos y conjugados.

- **Kit Anti-RSV conjugado con FITC (DAKO K6102)**
- Anticuerpo monoclonal de ratón 2.4G2 anti-FcγRII/RIII (PHAR MINGEN 553141)

### ***Material Desechable***

- Botella para cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 163371)
- Botellas para cultivo celular de 80 cm<sup>2</sup> (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 144881)
- Botella para cultivo celular de 150 cm<sup>2</sup> (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 147589)
- Cajas petri para cultivo celular 60 cm<sup>2</sup> (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 172931)
- Cajas petri para cultivo celular 100 cm<sup>2</sup> (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 172934)
- Placas de 96 pozos para cultivo celular (NUNC, Roskilde Denmark Cat no. 167008)
- Placas de 6 pozos para cultivo celular (COSTAR, Broadway, Cambridge Cat no. 3590)
- Tubos de poliestireno 12X75 mm para lectura FACS (FALCON, Cat no. 2054)
- Puntas para micropipeta
- 100-1000 µl (COSTAR, Broadway, Cambridge Cat no. 4867)
- 20-250 µl (RAININ Instruments, Cat no. RT-250)

## BIBLIOGRAFÍA:

Aderem A & Underhill D (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages *annurev.immunol* April 1999, Vol. 17, pp. 593-623

El Ahmer OR, Raza MW, Ogilvie MM, Weir DM, Blackwell CC. (1999). Binding of bacteria to HEp-2 cells infected with influenza A virus. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Apr;23(4):331-41

Ahmed R., Morrison L. and Knipe D. (1996). Persistence of viruses. In: *Fundamental Virology*. 3rd Edition, edited by Fields B.N., Knipe D.M. and Howley P.M., et al. Raven publishers, Philadelphia. pp.207-237.

Allen LA, Aderem A. Mechanisms of phagocytosis. (1996) *Curr Opin Immunol.* Feb;8(1):36-40.

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

Auger M. and Ross J. (1992). The biology of the macrophage. In: *The Natural Immune System. The macrophage*. Chapter 1. Edited by Lewis C. et al. Oxford. IRL Press. pp.1-74.

Aktan F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* Jun 25;75(6):639-53.

Baldrige P. and Senterfit L. (1976). Persistent infection of cells in culture by respiratory syncytial virus. *Proc Soc Exp Biol Med*; 151:684-688.

Bangham C. and McMichael A. (1986). Specific human cytotoxic T cell recognize B-cell lines persistently infected with respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*; 83:9183-9187.

Becker S, Soukup JM, Sioutas C, Cassee FR. (2003) Response of human alveolar macrophages to ultrafine, fine, and coarse urban air pollution particles. *Exp Lung Res.* Jan-Feb;29(1):29-44

Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A.(2000) Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol.* 12(1):64-76

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. (2001) *Nat Immunol.* Oct;2(10):907-16.

Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U. (1995) Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science*; 267: 1485-1488

Bustamante-Calvillo ME, Velazquez FR, Cabrera-Munoz L, Torres J, Gomez-Delgado A, Moreno JA, Munoz-Hernandez O. (2001) Molecular detection of respiratory syncytial virus in postmortem lung tissue samples from Mexican children deceased with pneumonia. *Pediatr Infect Dis J.* May; 20(5):495-501.

Chanock RM, Parrott RH, Connors M, Collins PL, Murphy BR (1992) Serious respiratory tract disease caused by respiratory syncytial virus: prospects for improved therapy and effective immunization. *Pediatrics.* 90:137-43

Collins P., McIntosh K and Chanock (2001). Respiratory Syncytial Virus. In: Fields Virology. 4<sup>th</sup> edition. Edited by: Fields B. et al. Raven Publishers. Philadelphia. Chapter 45. pp. 1443-1485.

Conron M, Andreakos E, Pantelidis P, Smith C, Beynon HL, Dubois RM, Foxwell BM. 2002 Nuclear factor-kappaB activation in alveolar macrophages requires IkappaB kinase-beta, but not nuclear factor-kappaB inducing kinase *Am J Respir Crit Care Med.* Apr 1;165(7):996-1004

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

Feldman SA, Audet S, Beeler JA. (2000) The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate. *J Virol.* Jul;74(14):6442-7.

Fernie B., Ford E. and Gerin J. (1981). The development of BALBI/c cells persistently infected with respiratory syncytial virus: presence of ribonucleoprotein on cell surface. *Proc Soc Exp Biol Med;* 167:83-86.

Foxwell AR, Kyd JM, Cripps AW. (1998) Nontypeable Haemophilus influenzae: pathogenesis and prevention. *Microbiol Mol Biol Rev.* Jun;62(2):294-308.

Gordon SB. Read RC. (2002). Macrophage defenses against respiratory tract infections. *Br. Med. Bull.* 61, 45-61.

Hall CB, Powell KR, MacDonald NE, Gala CL, Menegus ME, Suffin SC, Cohen HJ. (1986) Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. *N Engl J Med.* 10;315(2):77-81

Hament JM. (1999). Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 26, 189-195

Hacking D, Hull J. (2002). Respiratory syncytial virus--viral biology and the host response. *J Infect.* Jul;45(1):18-24.

Haynes LM, Moore DD, Kurt-Jones EA, Finberg RW, Anderson LJ, Tripp RA. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol.* 2001 Nov;75(22):10730-7.

Hegele RG., Hayashi S., Bramley AM. and Hogg JC. (1994). Persistence of respiratory syncytial virus genome and protein after acute bronchiolitis in guinea pigs. *Chest*; 105:1848-54.

Jiang Z, Nagata N, Molina E, Bakaletz LO, Hawkins H, Patel JA. Fimbria-mediated enhanced attachment of nontypeable *Haemophilus influenzae* to respiratory syncytial virus-infected respiratory epithelial cells. *Infect Immun.* 1999 Jan;67(1):187-92.

Kapikian AZ, Bell JA, James RG, Holbrook Z. (1966) Clinical, antigenic and prophylactic effects of an inactivated measles virus vaccine. In: *fundamental Virology*. 3<sup>rd</sup> Edition, edited by Fields B.N., Knipe D.m. and Howley PM., et al. Raven publishers, Philadelphia. Pp. 207-237

Kaneko M, Watanabe J, Kuwahara M, Ueno E, Hida M, Kinoshita A, Sone T. 2002 Impact of respiratory syncytial virus infection as a cause of lower respiratory tract infection in children younger than 3 years of age in Japan. *J Infect.* 44(4):240-3.

Kimpen JL. Respiratory syncytial virus immunology (1996). *Pediatr Allergy Immunol.*;7(9 Suppl):86-90.

Krivitskaia VZ, Iakovleva NV. (1992)The characteristics of the humoral response to respiratory syncytial viral infection in adult patients with different forms of bronchitis. *Vopr Virusol.* 37(3):146-9.

Krivitskai VZ., Iakovleva NV. and Aleksandrova NI. (1996). Characteristics of anti-respiratory syncytial humoral immunity during persistence of respiratory syncytial virus antigens in adult patients with chronic obstructive bronchitis. *Vopr Virusol*; 41:234-237

Korppi M. et al. (1989). Bacterial coinfection in children hospitalized with respiratory syncytial virus infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 8, 687-92

Kurt-Jones E. et al. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature Immunol*; 1:398-401.

Labro MT. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immuno-fairy tales"? (2000). *Clin Microbiol Rev.* Oct;13(4):615-

50.

Lamb R and Kolakofsky D. (2001) Paramyxoviride: The viruses and their replication. In: *Fundamental Virology*. 4TH Edition, edited by Fields B.N. and Hawley P. Lippincott W. & Wilkins Publisher. Philadelphia. pp. 689-724

Lamb RA. Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. (1993) *Virology*. Nov;197(1):1-11.

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

Laroux FS, Pavlick KP, Hines IN, Kawachi S, Harada H, Bharwani S, Hoffman JM, Grisham MB (2001). Role of nitric oxide in inflammation. *Acta Physiol Scand*. Sep;173(1):113-8

Li YH, Yan ZQ, Brauner A, Tullus K. (2002) Activation of macrophage nuclear factor-kappaB and induction of inducible nitric oxide synthase by LPS. *Respir Res.* Sep 5;3(1):23.

Laskin DL, Weinberger B, Laskin JD. (2001) Functional heterogeneity in liver and lung macrophages *J Leukoc Biol.* Aug;70(2):163-70.

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

Merolla R., Rebert NA., Tsiviste T., Hoffmann SP. and Panuska JR. (1995). Respiratory Syncytial virus replication in human lung epithelial cells: inhibition by tumor necrosis factor  $\alpha$  and interferon  $\beta$ . *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152:1358-1366.

Mikalchenkova NN, Kniazeva LD, Slepushkin AN. (1987) Respiratory syncytial virus infection in chronic bronchitis patients *Ter Arkh.* 59: 50-52

Mills BG, Singer FR, Weiner LP, Holst PA. (1981) Immunohistological demonstration of respiratory syncytial virus antigens in Paget disease of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78(2):1209-13

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

Mills BG, Singer FR. (1987) Critical evaluation of viral antigen data in Paget's disease of bone. *Clin Orthop.* (217):16-25

Mikalchenkova NN, Kniazeva LD, Slepushkin AN. (1987) Respiratory syncytial virus infection in chronic bronchitis patients *Ter Arkh.* 59: 50-52

Monobe H, Ishibashi T, Nomura Y, Shinogami M, Yano J. Role of respiratory viruses in children with acute otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2003 Jul;67(7):801-6.

Nwankwo MU, Dym AM, Schuit KE, Offor E, Omene JA. 1988 Seasonal variation in respiratory syncytial virus infections in children in Benin-City, Nigeria. *Trop Geogr Med. Oct;40(4):309-13.*

Oldstone MB. (1989) Viral persistence. *Cell.* Feb 24;56(4):517-20.

Oldstone M. (1991). Molecular anatomy of viral persistence. *J. Virol;* 65(12):6381-6386.

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

Rojas EO. (1997). Bioquímica de la fagocitosis: una breve revisión. *Bioquímica* 22: 1-86

Ostler T., Hussell T., Surh Ch., Openshaw P. and Ehl S. (2001). Long-term persistence and reactivation of T cell memory in the lung of mice infected with Respiratory Syncytial virus. *Eur. J. Immunol.* 31:2574-2582.

Ozato K, Tsujimura H, Tamura T (2002). Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the immune system. *Biotechniques.* Oct;Suppl:66-8, 70, 72 passim

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

Pastey MK, Crowe JE Jr, Graham BS (1999). RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus-induced syncytium formation. *J Virol.* Sep;73(9):7262-70.

Pastey MK, Gower TL, Spearman PW, Crowe JE Jr, Graham BS. (2000). A RhoA-derived peptide inhibits syncytium formation induced by respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3. *Nat Med.* Jan;6(1):35-40.

Patel JA, Faden H, Sharma S, and Ogra PL. (1992). Effect of respiratory syncytial virus on attachment, colonization, and immunity of nontypable *Haemophilus influenzae*: implication in otitis media. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 23:15-23.

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

Philitt F, Etienne J, Calvet A, Mornex JF, Trillet V, Aymard M, Brune J, Cordier JF. (1992) Infectious agents associated with exacerbations of chronic obstructive bronchopneumopathies and asthma attacks *Rev Mal Respir.*;9(2):191-6.

Pringle C. et al. (1978). Initiation and maintenance of persistent infection by respiratory syncytial virus. *J Virol*; 28:199-211.

Rao VK, Krasan GP, Hendrixson DR, Dawid S, St Geme JW 3rd. (1999) Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typable *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol Rev.* Apr;23(2):99-129.

Raza MW, El Ahmer OR, Ogilvie MM, Blackwell CC, Saadi AT, Elton RA, Weir DM. (1999) Infection with respiratory syncytial virus enhances expression of native receptors for non-pilate *Neisseria meningitidis* on HEp-2 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Feb;23(2):115-24.

Raza MW, Blackwell RA and Weir DM (2000). Bacterial activity of monocytic cell line (THP-1) against common respiratory tract bacterial pathogens is depressed after infection with respiratory syncytial virus *J. Med Microbiol.* 49: 227-233

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

Seemungal TA, Wedzicha JA. (2003) Viral infections in obstructive airway diseases. *Curr Opin Pulm Med.* Mar;9(2):111-6.

Streckert H., Philippous S. and Riedel F. (1996). Detection of respiratory syncytial virus (RSV) antigen in the lungs of guinea pigs 6 weeks after experimental infection and despite of the production of neutralizing antibodies. *Arch. Virol*; 141:401-410.

Smith CB, Golden C, Klauber MR, Kanner R, Renzetti A. (1976) Interactions between viruses and bacteria in patients with chronic bronchitis. *J Infect Dis.* Dec;134(6):552-61.

Gordon SB, Read RC. (2002) Macrophage defenses against respiratory tract infections. *Br Med Bull.*;61:45-61.

Shapiro SD (1999). The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* Nov;160(5 Pt 2):S29-32.

Shuto T, Xu H, Wang B, Han J, Kai H, Gu XX, Murphy TF, Lim DJ, Li JD (2001). Activation of NF-kappa B by nontypeable *Haemophilus influenzae* is mediated by toll-like receptor 2-TAK1-dependent NIK-IKK alpha /beta-I kappa B alpha and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 17;98(15):8774-9. Epub Jul 03.

Takala AK, Meurman O, Kleemola M, Kela E, Ronnberg PR, Eskola J, Makela PH. (1993) Preceding respiratory infection predisposing for primary and secondary invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. *Pediatr Infect Dis J*. 12(3):189-95

Tercier j (1983) bronchiolitis: a clinical review. *J. Emerg Med*. 1:119-123

Tripp R., Jones L., Haynes L., Zheng H., Murphy P. And Anderson L. (2001). CX3C chemokine mimicry by Respiratory Syncytial Virus G glycoprotein. *Nat Immunol*. 2:732-738.

van Schaik SM, Obot N, Enhorning G, Hintz K, Gross K, Hancock GE, Stack AM, Welliver RC. (2000) Role of interferon gamma in the pathogenesis of primary respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice *J Med Virol* Oct; 62(2):257-66.

Valarcher JF, Bourhy H, Lavenu A, Bourges-Abella N, Roth M, Androletti O, Ave P, Schelcher F. (2001) Persistent infection of B lymphocytes by bovine respiratory syncytial virus. *Virology*. Dec 5;291(1):55-67.

Valdovinos MR, Gomez B. (2003) Establishment of respiratory syncytial virus persistence in cell lines: association with defective interfering particles. *Intervirology*.;46(3):190-8.

Wang X, Moser C, Louboutin JP, Lysenko ES, Weiner DJ, Weiser JN, Wilson JM. (2002) Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to *Haemophilus influenzae* infection in mouse lung. *J Immunol*. Jan 15;168(2):810-5.

Iankevich OD, Dreizin RS (1977) Chronic infection of HeLa cells with respiratory syncytial virus *Vopr Virusol*. Mar-Apr;(2):142-7

