



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**“ESTUDIO DEL INCREMENTO EN MACRÓFAGOS DE LA
FAGOCITOSIS MEDIADA POR RECEPTORES Fc γ POR LA
PERSISTENCIA DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO”**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
D O C T O R E N C I E N C I A S
P R E S E N T A
BIÓL. JORGE GAONA BERNAL

TUTOR: DRA. BEATRIZ GÓMEZ GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. YVONNE ROSENSTEIN AZOULAY
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del comité tutorial:

Dra. Beatriz Gómez García, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su apoyo y guía para el desarrollo del presente trabajo.

Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay, por su amplia disponibilidad para discutir el trabajo experimental y por sus consejos para mejorar.

Dr. Enrique Ortega Soto, por su valiosa colaboración en el desarrollo del trabajo experimental y el gran apoyo para la escritura del artículo.

A los miembros del Jurado:

Dra. Emma Isabel Melendro Lozano, Dra. Beatriz Gómez García, Dr. Luis Terán Juárez, Dra. Blanca Lilia Barrón Romero y al Dr. Vianney Ortiz Navarrete, por sus comentarios y críticas, las cuales enriquecieron el trabajo final.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca 203193 otorgada durante el Doctorado

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Rosa Elena, Rocio, Abel, Carla, Gerardo, Yuko, Kenya, Carlos, Evelyn.

A la Dra. Rocio G. Tirado Mendoza , a la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, por los comentarios y apoyo durante el desarrollo del trabajo experimental.

A la Dra. Evelyn Rivera Toledo, al M. en C. Carlos A. Santiago Olivares, al Dr. Gerardo Arrevillaga Boni y al Dr. Oscar del Moral Hernández, por el su valioso durante el desarrollo del trabajo experimental.

A la Dra. Yolanda López Vidal, al Dr. Gónzalo Castillo Rojas, por el apoyo y facilidades proporcionadas para la realización de los ensayos de RT-PCR en tiempo real.

Al Dr. Carlos Rosales Ledezma (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) por recibirme en su laboratorio y toda la disponibilidad para la discusión, comentarios y crítica sobre el trabajo.

Al Dr. Javier Ambrosio Hernández y a la Biól. Olivia Reynoso Ducoing, por la disponibilidad del uso de equipo y asesorías en la realización del Western blot.

A la Dra. Patricia Tato Zaldivar, por la confianza y apoyo para la conclusión del presente trabajo.

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dra. Emma Isabel Melendro Lozano
Secretario:	Dra. Beatriz Gómez García
Vocal:	Dr. Luis Terán Juárez
Vocal:	Dra. Blanca Lilia Barrón Romero
Vocal:	Dr. Vianney Ortiz Navarrete

Este trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Beatriz Gómez García del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) proyecto 78862, y al Programa de Dirección General Asuntos del Personal Académico (DGAPA, PAPIIT) proyecto IN23610-3.

Parte de los resultados obtenidos se publicaron en *Viruses*, (2014), 6, 624-639.
(Se anexa copia del artículo)

**“ESTUDIO DEL INCREMENTO EN MACRÓFAGOS
DE LA FAGOCITOSIS MEDIADA POR RECEPTORES
Fc γ POR LA PERSISTENCIA DEL VIRUS SINCITIAL
RESPIRATORIO”**

INDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

I INTRODUCCIÓN

I.I. Persistencia viral

I.II. Virus sincitial respiratorio humano (HRSV)

I.III. Epidemiología y aspectos clínicos de la infección con HRSV

I.IV. Persistencia con HRSV

I.V. Persistencia del HRSV en modelos *in vivo* e *in vitro*

I.VI. Persistencia del HRSV en bovino

I.VII. Respuesta inmune a la infección por HRSV

I.VIII. Macrófagos y HRSV

I.IX. Receptores Fc γ (Fc γ Rs) y Fagocitosis

I.X. Regulación de la expresión de Fc γ Rs

II ANTECEDENTES

III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

IV HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

V MATERIALES Y MÉTODOS

V.I Líneas celulares y virus

V.I.I. Mantenimiento y propagación

V.II Expresión del HRSV en M ϕ P

V.II.I. Detección del gene N del HRSV por RT-PCR punto final

V.II.II. Detección de antígeno viral en M ϕ P por citometría de flujo

V.III. Actividad fagocítica

V.III.I. No opsonica y opsonica (mediada por FcγRs)

V.IV. Citometría de flujo

V.IV.I. Cuantificación de FcγRIIB/RIII en MφP y MφN en cultivos no permeabilizados (membrana celular) y permeabilizados (membrana celular e intracelular).

V.V. Medio condicionado (MC) de MφP sobre MφN

V.V.I. Cuantificación de FcγRIIB/RIII en MφN estimulados con medio condicionado por citometría de flujo.

V.VI. Endocitosis de FcγRIIB/RIII en MφP y MφN

V.VI.I. Cinética de endocitosis de FcγRIIB/RIII marcados con anticuerpos y evaluado por citometría de flujo.

V.VII. Western blot

V.VII.I. Cuantificación de FcγRI, RIIB y RIII en MφP y MφN.

V.VIII. RT-PCR en tiempo real

V.VIII.I. Cuantificación de mRNA de FcγRI, RIIB, RIII y RIV en MφP y MφN.

V.IX Análisis *in silico*

V.IX.I. Determinación de factores de transcripción involucrados en la expresión del mRNA de los FcγRs.

V.X. Expresión del factor de transcripción PU.1 en MφP y MφN

V.X.I. Cuantificación de PU.1 proteína total, fracción citoplasmática y fracción nuclear por Western blot.

V.XI. Transfección transitoria con siRNA

V.XI.I. Transfección de M ϕ P o M ϕ N con siRNA para apagar la expresión de PU.1 analizado por Western blot y RT-PCR en tiempo real.

V.XI.II. Efecto del apagado de PU.1 sobre los receptores mRNA de Fc γ RI, RIIB, RIII y RIV determinado por RT-PCR en tiempo real en M ϕ P y M ϕ N

V.XII. Vida media de PU.1 en M ϕ P y M ϕ N

V.XII.I. Cuantificación por Western blot de la expresión de PU.1 en presencia del inhibidor de síntesis de proteínas cicloheximida.

V.XIII. Análisis estadístico

VI RESULTADOS

VI.I. El virus persiste en el cultivo de M ϕ .

VI.II. En M ϕ P se incrementó la actividad fagocítica y la expresión de Fc γ RIIB/RIII.

VI.III. El medio condicionado (MC) de M ϕ P no induce la expresión de Fc γ RIIB/RIII en M ϕ N.

VI.IV. La endocitosis de los Fc γ RIIB/RIII no está alterada en los M ϕ P.

VI.V. El contenido total de Fc γ RIIB/RIII esta incrementado en los M ϕ P.

VI.VI. La persistencia del HRSV en el macrófago incrementa la síntesis de la proteína de Fc γ RIIB y Fc γ RIII pero no de Fc γ RI.

VI.VII. La expresión del mRNA de Fc γ RI, Fc γ RIIB y Fc γ RIII se incrementa pero no la de Fc γ RIV.

VI.VIII. El factor de transcripción PU.1 reconoce secuencias cercanas a la región promotora en los genes de las isoformas Fc γ Rs.

VI.IX. La expresión de PU.1 en M ϕ P y M ϕ N es similar.

VI.X. El siRNA específico de PU.1 apaga la expresión en M ϕ N pero no en M ϕ P.

VI.XI. Los mRNA de Fc γ Rs disminuye en los M ϕ N pero no en los M ϕ P.

VI.XII. La expresión del mRNA de PU.1 disminuye en M ϕ P y M ϕ N transfectados con siRNA interferente.

VI.XIII. La vida media de PU.1 esta alterada en M ϕ P.

VII DISCUSIÓN

VIII CONCLUSIONES

IX PERSPECTIVAS

X BIBLIOGRAFÍA

XI ARTÍCULO

ABREVIATURAS

DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
Fab	Fragmento de unión a antígeno de las Ig
Fc	Fragmento cristizable de las Ig
FcγRs	Receptores Fcγ
FcγRI	Receptor Fcγ I
FcγRIIB	Receptor Fcγ IIB
FcγRIII	Receptor Fcγ III
FcγRIV	Receptor Fcγ IV
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GM-SCF	Factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos
HHV-1	Virus herpes humano 1
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
HRSV	Virus sincitial respiratorio humano
IFN-β	Interferón beta
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina G
IL-1β	Interleucina 1beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IMF	Intensidad media de fluorescencia
ITAM	Secuencia de activación basado en tirosinas de inmunoreceptores
ITIM	Secuencia de inhibición basado en tirosinas de inmunoreceptores

MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MeV	Virus del Sarampion
MIP-1 α	Proteína inflamatoria de macrófagos
mRNA	ARN mensajero
M ϕ	Macrófago
M ϕ N	Macrófago no infectado (P388D1)
M ϕ P	Macrófago infectado persistentemente con HRSV
nM	Nanomolar
nm	Nanometros
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
RNA	Ácido Ribonucleico
SFB	Suero fetal bovino
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida
siRNA	RNA interferente pequeño
SRBC	Eritrocitos de carnero/Sheep red blod cell
TARC	Quimiocina activada y regulada en el timo
TNF α	Factor de necrosis tumoral alpha
μ g	Microgramo

RESUMEN

El Virus sincitial respiratorio humano (HRSV) infecta principalmente a niños menores de 2 años, su blanco principal de infección son las células epiteliales del tracto respiratorio superior. Sin embargo, se ha demostrado que puede infectar macrófagos alveolares con la consecuencia de modificar la expresión génica celular. Aunque la persistencia de este virus en humanos no se ha demostrado, se cuenta con evidencias *in vivo* e *in vitro* que sugieren la posible persistencia del virus en el organismo.

En este trabajo estudiamos el mecanismo involucrado en el incremento de la fagocitosis mediada por receptores Fc γ en un modelo *in vitro* de persistencia viral (línea celular murina de macrófagos, P388D1, M ϕ P) infectada con el HRSV.

La persistencia viral del cultivo se confirmó por citometría de flujo durante todos los experimentos y se trabajó con cultivos con 92 - 96 % de células infectadas. Los ensayos de fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados con dos concentraciones subaglutinantes de anticuerpo mostraron un incremento de dos y cinco veces más respectivamente en los M ϕ P comparado con los macrófagos no infectados (M ϕ N). Este incremento en la actividad fagocítica se asoció con el incremento en los receptores Fc γ observado en los M ϕ P evaluado por citometría de flujo y Western blot. Se realizaron ensayos de endocitosis y estimulación de M ϕ N con sobrenadantes de M ϕ N y M ϕ P para saber si factores solubles estaban involucrados en el incremento de los receptores Fc γ , y no se observaron diferencias significativas en ambos ensayos entre los dos cultivos. Al evaluar la expresión del mRNA de los Fc γ Rs por RT-PCR en tiempo real encontramos un incremento en la expresión del Fc γ RI, Fc γ RII y en el Fc γ RIII en los M ϕ P con respecto a los M ϕ N, no encontramos un cambio significativo en el receptor Fc γ RIV en ambos cultivos. Estos resultados sugieren que la persistencia del HRSV en el macrófago altera la expresión los receptores Fc γ a nivel de expresión génica por lo que se realizó un análisis *in silico* para determinar posibles factores de transcripción asociados a este incremento en la expresión de los mRNA de los receptores Fc γ . Encontramos que el factor de transcripción PU.1 reconoce sitios de unión cercanos a la región promotora de los genes de los cuatro Fc γ Rs. Los resultados obtenidos por Western blot en extractos de proteína total así como de proteína en núcleo

y citoplasma, no mostraron cambios significativo en la contenido de PU.1 total o translocado a núcleo en ambos cultivos, lo que sugiere que la expresión y/o activación de PU.1 no está alterada en los M ϕ P con respecto a los M ϕ N. Se realizaron ensayos de transfección con RNA interferente (siRNA) para apagar la expresión de PU.1, y así, evaluar su función sobre los genes de los Fc γ Rs, interesadamente, observamos a 36 horas post-transfección que la proteína de PU.1 en los M ϕ N disminuye con respecto al control, mientras que en los M ϕ P no disminuye. Esta disminución observada en los M ϕ N afectó los niveles de expresión de los mRNA de los receptores Fc γ diferencialmente, mientras que en los M ϕ P donde no hubo una disminución en la proteína de PU.1, tampoco se vieron afectados los niveles de expresión de los mRNA de los Fc γ Rs. Por lo que se realizaron ensayos con cicloheximida para inhibir la síntesis de proteínas y evaluar la estabilidad de PU.1 residual en ambos cultivos. A las 24 post-tratamiento observamos que PU.1 disminuye en los M ϕ N 4 veces más con respecto a los M ϕ P, a las 36 horas post-tratamiento disminuye en ambos cultivos. Este efecto es específico para PU.1 y no para otras proteínas que disminuyen de forma muy similar (GAPDH) en ambos cultivos. Esto sugiere un cambio en la estabilidad de la proteína PU.1 en los M ϕ P con respecto a los M ϕ N, lo que podría estar asociado a un nuevo mecanismo de regulación en la expresión génica en la infección persistente con HRSV.

ABSTRACT

Viruses can persist in differentiated cells (*i.e.*, macrophages) over long periods of time, altering cellular functions but not inducing their death. Human respiratory syncytial virus (HRSV) infects respiratory epithelial cells and alveolar macrophages modifying gene expression. The persistence of HRSV has not been demonstrated in humans, but there are *in vivo* and *in vitro* evidence suggesting the persistence of the virus in its host. In this work, we studied the mechanisms involved in the enhancement of phagocytosis Fc γ Rs-mediated in macrophages persistently infected with HRSV (M ϕ P). Persistence was confirmed in all experiments. The increase in phagocytosis Fc γ Rs-mediated in M ϕ P relative to mock-infected macrophages (M ϕ N) was associated with increased expression of Fc γ Rs that is not mediated by the supernatant of M ϕ P. Analysis of mRNA expression for Fc γ Rs, showed increased mRNA for Fc γ RI, RIIb and RIII isoform in M ϕ P compared to M ϕ N. Through an *in silico* analysis, it was found that the transcription factor PU.1 recognizes sites near the promoter region of Fc γ Rs genes, so their participation in the mRNA expression for Fc γ Rs was evaluated. No difference was found between M ϕ N and M ϕ P in the PU.1 protein expression in whole or nuclear cellular extract, suggesting that the expression and activation of PU.1 is not affected by infection. By inhibition of the expression of PU.1 with a siRNA it was observed that at 36 hours post-transfection PU.1 protein level decreases in M ϕ N, but not in M ϕ P. That decrease of PU.1 protein affected the expression level of mRNA for Fc γ Rs in M ϕ N but not in M ϕ P. Stability of PU.1 protein was assessed at 24 and 36 hours of treatment with cycloheximide. A decrease of PU.1 protein was observed after 24 hours in the M ϕ N compared to M ϕ P, suggesting an increase in PU.1 protein stability in M ϕ P which could be associated with a new mechanism of regulation in the expression gene during persistent infection with HRSV

I INTRODUCCIÓN

I.I. Persistencia viral

Los virus han desarrollado diversas estrategias que le permiten persistir en la célula infectada y por lo tanto en el organismo hospedero, se han documentado infecciones virales persistentes con virus de DNA (HHV-1) [1], de RNA (MeV) [2] y Retrovirus (HIV) [3].

Una estrategia que permite el establecimiento exitoso de la persistencia viral, es la infección de células diferenciadas de vida prolongada como las células del sistema nervioso central (neuronas) [4], y células del sistema inmune (células B, macrófagos) [5,6]. La presencia y expresión continua del virus en la célula ocasiona modificaciones (incremento o disminución) en la expresión génica a nivel de mRNA, así como modificaciones postranscripcionales que alteran la expresión de proteínas celulares, las cuales pueden sufrir a su vez cambios postraduccionales y contribuir a la regulación de la replicación viral sin comprometer la viabilidad de la célula y permitiendo la evasión de la respuesta inmune, lo que favorece la permanencia y continuidad viral (persistencia viral). Las modificaciones a nivel de proteína por efecto de la persistencia viral influyen directamente en diferentes patologías [7].

La persistencia viral puede alterar diversas actividades y funciones celulares no vitales en la célula infectada, como la capacidad de las neuronas para expresar neurotransmisores, la inhibición de células del sistema endocrino para expresar hormonas o la activación de células del sistema inmune que inducen la producción de citocinas. El resultado es una alteración en la homeostasis del hospedero, que puede originar enfermedades.

I.II. Virus sincitial respiratorio humano (HRSV)

El Virus sincitial respiratorio humano (HRSV) es un virus envuelto de RNA de una sola cadena de polaridad negativa no segmentada de 15225 nucleótidos. Los viriones presentan espículas embebidas en la envoltura lipídica con una longitud de 10 a 12 nm, son pleomórficos con un diámetro de 150 a 300 nm [8,9] Figura 1.

Clasificación

Orden	<i>Mononegavirales</i>
Familia	<i>Paramyxoviridae</i>
Subfamilia	<i>Pneumovirinae</i>
Género	<i>Pneumovirus</i>
Especie	Virus sincitial respiratorio humano

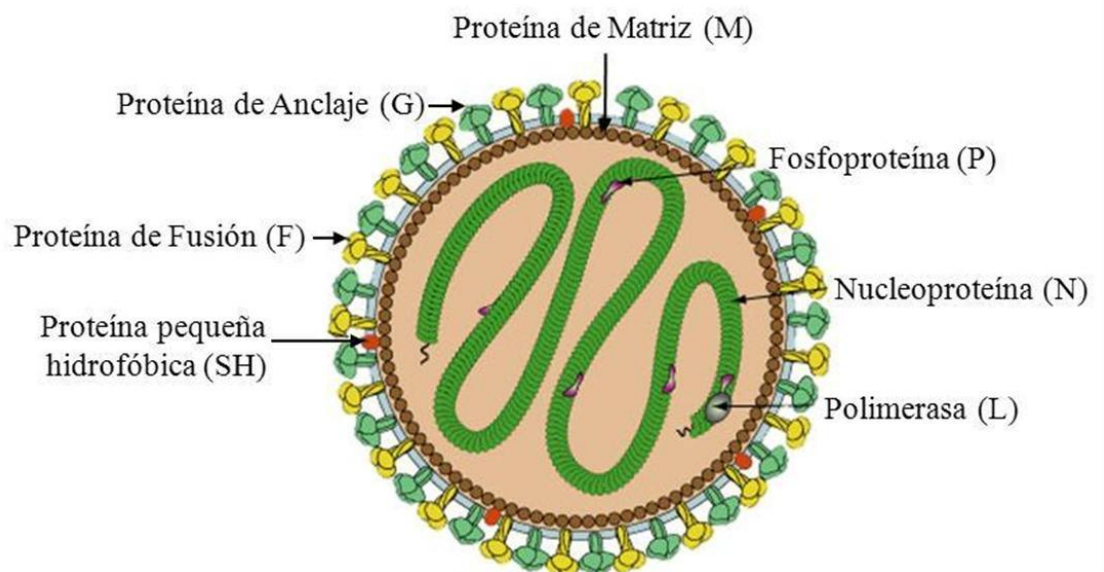


Figura 1. Estructura del HRSV. (Modificado del original obtenido en "Viral Zone" Swiss Institute of Bioinformatics, www.viralzone.expasy.org).

El genoma del HRSV es una cadena lineal sencilla de RNA de polaridad negativa que posee regiones no codificantes (leader, intergénicas y trailer), contiene un solo promotor localizado en la región 3' (leader, 44 nucleótidos) seguido de los genes virales en el orden: 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5' y termina en una secuencia no codificante (trailer) de 155 nucleótidos (Figura 2). Las regiones intergénicas son variables en tamaño y secuencia, van de 1 a 52 nucleótidos. Los genes individuales de HRSV comienzan con una secuencia de inicio semiconservada de nueve nucleótidos (3'-CCCC/UGUUUA/U) y terminan en una secuencia semiconservada de 12 a 13 nucleótidos (3'-UCAA/UUNA/UA/UA/UUUU). Los 10 genes codifican para 11 proteínas (2 no estructurales y 9 estructurales) [10], cada uno de los genes tiene un marco de lectura abierto excepto M2 el cual contiene dos marcos de lectura, uno codifica para la proteína M2-1 y el otro para M2-2.

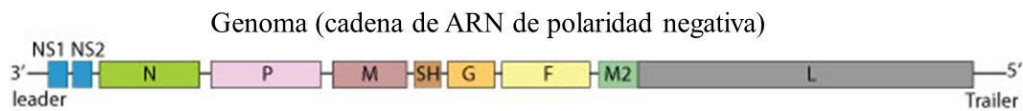


Figura 2. Representación gráfica del genoma HRSV. (Modificado del original obtenido en “Viral Zone” Swiss Institute of Bioinformatics, www.viralzone.expasy.org).

El HRSV tiene: 3 proteínas asociadas a nucleocápside (L, N y P), que junto con el RNA viral forman el complejo ribonucleoproteico; 3 glicoproteínas de membrana (G, F y SH); 2 proteínas asociadas a membrana no glicosiladas (M y M2-1); 2 proteínas no estructurales (NS1 y NS2) y 1 proteína menor que inicia en un segundo marco de lectura en el gen M2-2 [10].

El genoma se encapsida por múltiples copias de la proteína N formando un complejo ribonucleoproteico helicoidal (diámetro de 12 a 15 nm) al que se le denomina nucleocápside. La proteína N media la interacción entre el RNA genómico y la RNA polimerasa dependiente de RNA, la cual está compuesta por las proteínas P, L y M2-1. La proteína M forma una capa entre la nucleocápside y la envoltura, la cual se deriva de la membrana plasmática de la célula hospedera y contiene a las proteínas F, G y SH del virus [11]. Las proteínas M2-2, NS1 y NS2 se encuentran en cantidades mínimas dentro del virión [12].

Se han definido dos subgrupos antigénicos de HRSV; A y B, los cuales se distinguen por su reactividad diferencial con anticuerpos monoclonales; estos subgrupos también se diferencian a nivel de secuencias de aminoácidos de la proteína G, los cuales tienen un 53% de identidad [13].

I.III. Epidemiología y aspectos clínicos de la infección con HRSV

El HRSV es considerado a nivel mundial como el principal agente causal de infecciones severas del tracto respiratorio inferior en niños hospitalizados y son la principal causa de morbilidad y mortalidad en infantes menores de 2 años [14].

La OMS estima que anualmente en el mundo ocurren 64 millones de infecciones con el HRSV de los cuales 160,000 mueren. En México, los datos epidemiológicos reportan a las infecciones respiratorias entre las tres primeras causas de muerte infantil a

nivel nacional. En Estados Unidos de Norte América ocasiona anualmente entre 75 000 y 125 000 infecciones severas que requieren hospitalización de las cuales aproximadamente 5 000 mueren.

La infección con el HRSV tiene una incidencia más alta en niños entre los 6 y los nueve meses de edad y se estima que hacia los 2 años de vida aproximadamente el 95 % de los niños a nivel mundial han sido infectados [15,16].

La infección por HRSV se inicia en la nasofaringe, por lo general se controla a ese nivel, no obstante en una gran parte de los infantes (entre el 25 y 40 %) el virus pasa al tracto respiratorio inferior e infecta los bronquiolos y los alvéolos donde se presenta una respuesta inflamatoria asociada con la patología y sintomatología de la enfermedad [17]. Los síntomas que se presentan en el tracto respiratorio superior son: flujo nasal, estornudo, faringitis y malestar general. En el tracto respiratorio inferior se desarrollan las enfermedades severas; bronquitis, bronquiolitis y neumonía [18].

Se considera que las infecciones severas en la infancia son un factor de riesgo para el desarrollo posterior de padecimientos crónicos de las vías respiratorias en adultos. Estudios epidemiológicos indican que la frecuencia y severidad del asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y sibilancias en adultos, están asociadas con antecedentes de enfermedad respiratoria con HRSV durante la infancia. En diversos estudios de neumonías en adultos con padecimientos de crónicos se encontró el HRSV en el 50 % de los casos [17].

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 neumonías en estos casos puede ser muy alta (aproximadamente 85 %) [19].

I.IV. Persistencia con HRSV

La persistencia en humanos del HRSV se ha sugerido basado en varias observaciones como: 1) El virus se ha aislado de la nasofaringe de niños aparentemente sanos. 2) Se ha detectado el antígeno viral en osteoclastos y en células de pacientes con la enfermedad de Paget [20,21]. 3) Se ha encontrado el mRNA viral en tejido de pulmón

de niños post-mortem durante los meses en los cuales no es posible aislar al virus [22]. 4) La persistencia del virus en pacientes con inmunodeficiencias como enfermos de SIDA y en niños con inmunodeficiencias congénitas [18]. 5) Evidencia *in vivo* de infección persistente por el HRSV en linfocitos de pacientes infantiles que adquirieron al HRSV en forma natural [23].

La persistencia por el HRSV en humanos es un área de interés importante debido a que sugiere la participación de este virus en procesos de hiperreactividad crónica. Padecimientos como EPOC se han asociado con cuadros clínicos durante la infancia de bronquiolitis ocasionados por infección con HRSV [24].

I.V. Persistencia del HRSV en modelos *in vivo* e *in vitro*

Existen estudios de persistencia viral a nivel experimental por el HRSV.

In vivo: 1) En el modelo animal de cobayo se ha documentado que durante la infección por el HRSV, es posible detectar la presencia del genoma y proteínas del virus en pulmón aún después de que el cuadro agudo desapareció [25]. 2) Otros reportes señalan que es posible detectar la presencia del genoma del HRSV hasta 6 meses después de la infección y recuperar virus infeccioso en presencia de altos títulos de anticuerpos [26,27]. 3) Se ha reportado la generación de un modelo murino de infección persistente [28].

In vitro: 1) En infecciones persistentes de células HEp-2, BSC1 y linfocitos B se reportó una disminución en la producción de virus extracelular con respecto a una infección aguda, no se observó muerte celular en estos cultivos y por inmunocitoquímica se detectó la presencia de antígenos virales en las células infectadas [29-31]. 2) En una línea celular de fibroblastos de ratón (Balb/c) infectada persistentemente se reportó un alto porcentaje de células que expresaron antígeno viral y una baja producción de virus infeccioso extracelular [32]. 3) Se ha reportado la persistencia del HRSV en una línea celular de origen linfoide (células B de linfoma de ratón) [30].

I.VI. Persistencia del RSV bovino (BRSV)

Se ha reportado la persistencia del BRSV en su hospedero natural, el BRSV y el HRSV están altamente relacionados, ya que presenta reacción cruzada con anticuerpo [33] y existe alta similitud en la secuencia de las proteínas NS1 y NS2 (69 y 84 % respectivamente) entre ambos virus [34].

I.VII. Respuesta inmune a la infección por HRSV

La respuesta inmune originada por la infección con HRSV es permanente pero no protectora, ya que las reinfecciones son frecuentes aún en presencia de altos títulos de anticuerpos neutralizantes. El papel de la respuesta inmune en la protección contra la infección por el HRSV aún no es claro [9,13,18]. Se sabe que la respuesta inmune celular juega un papel importante en la recuperación de la infección por el HRSV; sin embargo, ésta se ha asociado con la exacerbación de la enfermedad.

El HRSV es considerado un potente estimulador de la expresión y/o secreción de mediadores proinflamatorios e inmunomoduladores, lo cual se ha demostrado ampliamente en células epiteliales del tracto respiratorio (sitio principal de replicación del virus) y otros tipos celulares como: monocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos. *In vitro*, en células epiteliales y macrófagos, se ha demostrado que el HRSV induce la expresión de IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, MIP-1 α , MCP-1, TARC, IFN- β , RANTES entre otros [35]. El TNF α se ha asociado a procesos inmunopatológicos ya que tiene un papel importante en el reclutamiento de neutrófilos y eosinófilos. La inducción de IL-13 también se ha asociado a la inmunopatología viral, ya que parece estar incrementada en respuestas alérgicas y en procesos inflamatorios. Finalmente la producción de MIP-1 α e IL-8 se han visto asociadas con cuadros severos de inflamación y daño pulmonar asociadas con en el reclutamiento celular [18,36-38].

El mecanismo por el cual se induce la reacción inflamatoria no está claro; sin embargo, es probable que citocinas producidas por las células infectadas (epiteliales, macrófagos y linfocitos) en respuesta a la infección viral, participen en la patología. En apoyo a esta interpretación se tienen observaciones *in vitro* y *ex vivo* que demuestran

que dichas estirpes celulares son permisivas al HRSV y su infección induce la producción de citocinas proinflamatorias [39].

La capacidad de los virus para infectar linfocitos y macrófagos tiene implicaciones considerables en la patogenia de la enfermedad de las vías respiratorias y probablemente juega un papel importante en la diseminación de la infección.

I.VIII. Macrófagos y HRSV

Los macrófagos alveolares están estratégicamente localizados para funcionar como el primer sistema de defensa del pulmón contra microorganismos y toxinas del medio ambiente. Esta estirpe celular representa una población importante en los alveolos pulmonares ya que de las células recuperadas en los lavados bronquioalveolares, los macrófagos representan un porcentaje del 95 al 98 %. Durante el curso natural de la infección por el HRSV, el macrófago es una célula permisiva y blanco para la infección [40,41], por lo que existe una interacción directa entre el HRSV y los macrófagos.

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. Se ha reportado que los macrófagos alveolares y periféricos son susceptibles a la infección por el HRSV *in vitro* y producen virus infeccioso por más de 25 días [41].

Los macrófagos poseen tres funciones inmunes generales: la actividad fagocítica (inespecífica y específica), la secreción de citocinas y la presentación de antígeno. En este trabajo se evaluó la actividad fagocítica mediada por Fc γ Rs.

I.IX. Receptores Fc γ (Fc γ Rs) y Fagocitosis

En organismos superiores, las células responsables de la fagocitosis incluyen a los polimorfonucleares, granulocitos, células dendríticas y células involucradas en el sistema fagocítico mononuclear como los monocitos/macrófagos, los monocitos son

precursores de macrófagos, y también poseen actividad fagocítica aunque con menor capacidad.

Los macrófagos son conocidos como células fagocíticas profesionales debido a que cuentan con un repertorio de receptores que reconocen de manera inespecífica y específica a los microorganismos. La fagocitosis mediada por receptores es un proceso complejo que inicia, a través del reconocimiento, internalización y posterior destrucción de la partícula o material extracelular (mayor a 1µm de tamaño) [42]. La actividad fagocítica mediada por receptor puede ser por complemento (inespecífica) o mediada por anticuerpos (específica).

Para la fagocitosis específica mediada por receptor, los macrófagos poseen receptores Fc (FcRs) en la superficie celular, responsables del reconocimiento de los patógenos, estos receptores se unen a la porción constante (porción Fc) de las inmunoglobulinas (Ig). Las Ig son opsoninas que reconocen de forma específica la superficie de los patógenos y forman los inmunocomplejos que se unen a los receptores Fc. Las Ig contienen una región Fab para la unión al patógeno y una región Fc que específicamente es reconocida por receptores Fc y es esta región Fc parcialmente es responsable de la determinación de la función efectora inmune [43].

Los inmunocomplejos inducen la actividad fagocítica vía un ligando que incrementa la afinidad entre el microorganismo y la célula fagocítica, en este caso el macrófago. Esta respuesta está determinada por la clase de receptor. La vía de señalización que se activa depende del reconocimiento de la clase de Ig específica presente en el inmunocomplejo [44].

En general, el reconocimiento del inmunocomplejo por los FcRs resulta en la liberación de citocinas proinflamatorias, estallido respiratorio, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la fagocitosis. Figura 3.

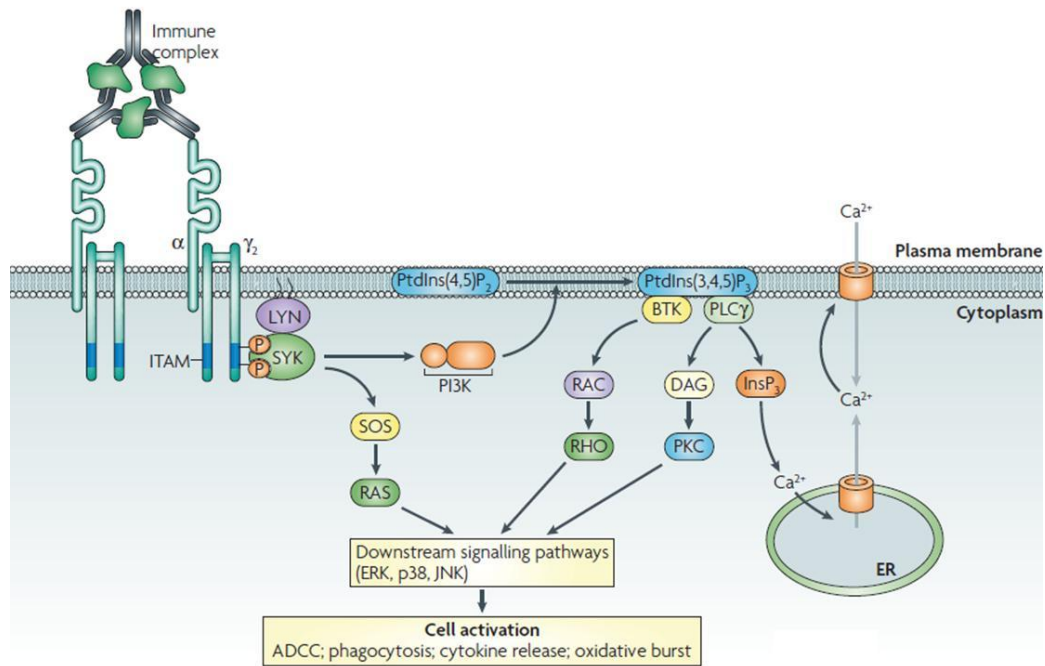


Figura 3. Reconocimiento de inmunocomplejos por receptores Fc. Tomado de [45]

La principal Ig involucrada en el reconocimiento de patógenos es la IgG la cual se une a receptores Fc gamma (FcγRs) en la superficie del macrófago. A través del entrecruzamiento de estos FcγRs se activa la fagocitosis, y los inmunocomplejos son eliminados [46].

Los macrófagos murinos expresan tres receptores activadores, uno de alta afinidad (FcγRI, CD64), y dos de baja afinidad (FcγRIII, CD16 y FcγRIV) y un receptor inhibidor (FcγRIIB, CD32B) que se expresan en la superficie celular en proporciones distintas [47]. Los FcγRs presentan una región extracelular, una región transmembranal y una región intracelular. La activación de los FcγRI, FcγIII y FcγIV requiere de su asociación con una cadena γ, la cual contiene una región de activación denominada ITAM (Immunoreceptor Tyrosine Activation Motif). El receptor inhibidor FcγRIIB no se asocia a la cadena γ, la región intracelular de este receptor contiene una región inhibitoria denominada ITIM (Immunoreceptor Tyrosine Inhibition Motif) [48]. Cada uno de los FcγRs tiene distinta afinidad por diferentes isotipos de IgGs, lo que se traduce en una respuesta diferenciada dependiente del isotipo de IgG asociado al inmunocomplejo. En la Figura 4 se muestran los diferentes receptores.

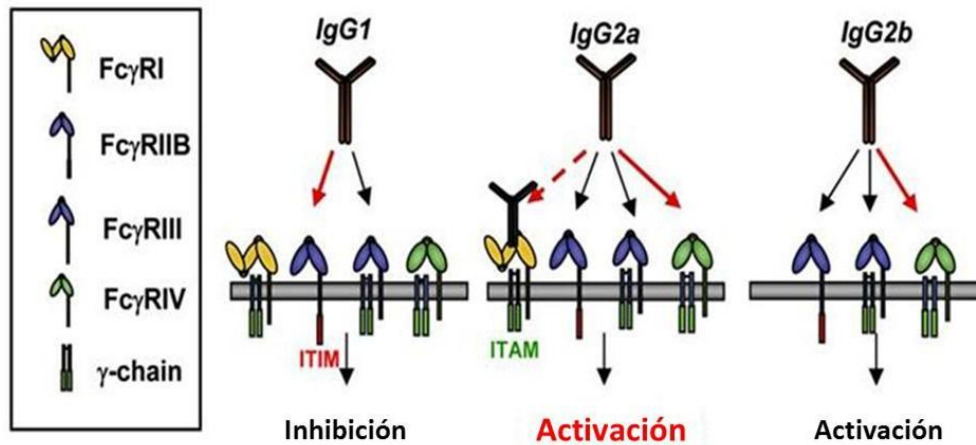


Figura 4. FcγRs presentes en los macrófagos murinos. Tomado de Nimmerjahn [47]

La fagocitosis mediada por FcγRs inicia cuando se unen la porción Fc de las IgG en los inmunocomplejos a los receptores activadores lo que induce la fosforilación de residuos específicos de tirosina en la región ITAM de la cadena γ por tirosina cinasas de la familia Src. Una vez que la región ITAM es fosforilada, se lleva a cabo el proceso de fagocitosis que resulta en la internalización dependiente de la polimerización de actina. Una vez que los inmunocomplejos son internalizados en un fagosoma, migran a través del macrófago para fusionarse con los lisosomas, convirtiéndose en un fagolisosoma y posteriormente los patógenos son destruidos por mecanismos oxidativos y no oxidativos, incluyendo la producción de aniones superóxido [48].

I.X. Regulación de la expresión de FcγRs

Se ha documentado la participación de varios factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de los FcγRs, entre ellos se ha encontrado que el factor de transcripción PU.1 participa en la expresión de los FcγRI, FcγRIIB y FcγRIII en macrófagos como respuesta a estimulación del factor estimulador de colonias granulocitos macrófagos (GM-SCF) [49].

PU.1 es un factor de transcripción de la familia E26 transformation-specific (ETS) que se une al DNA en una secuencia consenso GGAA/T, se expresa específicamente en linfocitos T [50], células B y monocitos/macrófagos [51]. En monocitos participa en el proceso de diferenciación a macrófagos. En el macrófago PU.1 además de participar en la expresión de los FcγRs participa en la expresión otros

receptores de membrana como el receptor Scavenger A1 [52], las integrinas CD18 [53] y CD11b [54].

La exacta y apropiada regulación de PU.1 es esencial para el correcto proceso de hematopoyesis. Durante la mielopoyesis se requieren de una alta expresión de PU.1, mientras que en el desarrollo de las células B se requiere de una baja expresión [51].

II ANTECEDENTES

Los macrófagos son la primera línea de defensa contra patógenos. Sin embargo, éstos son susceptibles a infectarse con patógenos, lo que puede modificar las actividades de respuesta como: expresión de citocinas, presentación de antígeno y la actividad fagocítica. Se han documentado infecciones virales persistentes en macrófagos en los cuales se han encontrado alteraciones en las actividades de las células.

Se ha observado en infecciones persistentes con citomegalovirus alteraciones en la presentación de antígeno al disminuir o suprimirse la expresión de las moléculas involucradas en el procesamiento y presentación de antígeno [55]. En infecciones con HIV se ha observado alteraciones en la actividad fagocítica del macrófago al disminuir la expresión de la cadena γ asociada a los Fc γ Rs activadores [56,57].

En el laboratorio de la Dra. Gómez se estableció un modelo de infección persistente de HRSV en una línea celular de ratón similar a macrófagos (P388D1) [58], en esta línea celular persistentemente infectada (M ϕ P) se han estudiado la interacción virus-célula a través de analizar funciones celulares como: expresión de citocinas, presentación de antígeno y la actividad fagocítica.

III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los macrófagos son importantes en la inmunidad innata y adquirida, la activación del macrófago a través de los Fc γ Rs tiene un impacto importante en la respuesta inmune y la desregulación de estos se ha asociado a diferentes patologías relacionadas a la respuesta inmune inflamatoria como en Lupus sistémico eritematoso [59,60].

En el cultivo de M ϕ P se demostró que la actividad fagocítica de eritrocitos de carnero IgG-opsonizados se incrementa en comparación con los macrófagos no infectados (M ϕ N), Además, se observó un incremento en la expresión de los Fc γ RIIB/RIII en la membrana del macrófago [61]. Sin embargo, el mecanismo por el cual se da este incremento no se ha estudiado.

En este trabajo estudiamos los mecanismos moleculares que expliquen el incremento en la actividad fagocítica mediada por Fc γ Rs así como el incremento en la expresión de los Fc γ Rs.

IV HIPÓTESIS

El incremento en la expresión de los FcγRs en un cultivo de macrófagos murinos persistentemente infectados con el virus sincitial respiratorio humano se asocia con la actividad de un factor de transcripción

OBJETIVO GENERAL

Investigar el mecanismo involucrado en el incremento en la expresión de FcγRs

Objetivos particulares

Analizar la participación de la actividad endocítica y de factores solubles y/o productos virales en el incremento en la expresión de FcγRs

Realizar el análisis *in silico* de factores de transcripción de macrófagos involucrados en la expresión de los FcγRs

Determinar la expresión de PU.1 en los cultivos de macrófagos

Analizar el efecto de apagar la expresión de PU.1 sobre la expresión de los FcγRs en los cultivos de macrófagos

Analizar el efecto de inhibición de síntesis de la proteína PU.1 en la estabilidad del factor de transcripción

Metas

Confirmar las características del cultivo persistente; expresión de antígeno y genoma viral, así como, la actividad fagocítica y el incremento en la expresión de los Fc γ Rs

Evaluar la endocitosis de los Fc γ Rs en los macrófagos y el efecto del sobrenadante de macrófagos persistentemente infectados sobre macrófagos testigo (mock-infected)

Cuantificar la proteína alfa de los Fc γ Rs intracelular y en membrana

Cuantificar la expresión de mRNA de los Fc γ Rs

Seleccionar un factor de transcripción de macrófagos probablemente involucrado en la expresión de Fc γ Rs

Determinar la localización celular y cuantificar la expresión del factor de transcripción PU.1

Apagar la expresión del factor de transcripción PU.1 con RNA interferente

Evaluar el efecto de apagar el factor de transcripción en la expresión de Fc γ Rs

Inhibir con cicloheximida la síntesis del factor de transcripción y evaluar la estabilidad de la proteína PU.1

V MATERIALES Y MÉTODOS

V.I. Líneas celulares y virus

V.I.I. Mantenimiento y propagación

La línea celular tipo macrófago P388D1 (M ϕ) fue obtenida del ATCC, TIB 63 (Rockville, Maryland) y se utilizó como cultivo testigo (M ϕ N), una subclona fue infectada persistentemente (M ϕ P) con el HRSV de la cepa Long, a una multiplicidad de infección de 1, se obtuvieron y cultivaron las células sobrevivientes infectadas persistentemente (Sarmiento RE). En este estudio se utilizaron los pases 72, 83 y 87 de M ϕ P. Ambos cultivos fueron mantenidos y propagados en medio RPMI1640 (GIBCO/BRL, Grand Island, NY) suplementado con 0.2 % NaHCO₃, 10 mM HEPES, y 1×10^{-6} M de 2-mercaptoethanol y 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Biowest, México) inactivado por calor (56 °C 30 minutos)

V.II. Expresión del HRSV en M ϕ P

V.II.I. Detección del gen N del HRSV por RT-PCR punto final

Se amplificó el mRNA del gen N por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en punto final, utilizando un par de oligonucleótidos para amplificar un segmento de 1,187 pares de bases (pb) entre los nucleótidos 1,140–2,327: Sentido 5'-ATGGCTCTTAGCAAAGTC-3', Antisentido 5'-TTTTTGTTAAGTCAAGCTCTACATC-3'. Un segmento de 260 pb de GAPDH fue amplificado como control utilizando los oligonucleótidos: Sentido 5'-ATTCTACCCACGGTAAGTTCAATGG-3', Antisentido 5'-AGGGGCGCAGATGATGACCC-3'.

Se utilizaron 1×10^6 células de M ϕ P para extraer RNA total por columnas utilizando el kit RNeasy Mini (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las especificaciones del fabricante. El RNA obtenido se disolvió en agua-dietilpirocarbonato (agua-DEPC). Se sintetizó DNA complementario a partir de 2 μ g de RNA total de M ϕ P o M ϕ N bajo las siguientes condiciones: En un tubo para microcentrífuga de 1.5mL se adicionaron 1 μ L de oligo dT₁₂₋₁₈ (500 μ g/mL), 1 μ L de dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 2

μg de RNA total, (10 mM), se llevó a un volumen total de 13 μL con agua-DEPC, la mezcla se calentó en un termoblock a $65\text{ }^{\circ}\text{C} \times 5$ minutos y se enfrió rápidamente en hielo, se centrifugo brevemente y se procedió a agregar 4 μL de amortiguador First-Strand 5X y 2 μL de DTT (0.1 M) (Invitrogen) se mezcló el contenido suavemente y se incubó en un termoblock a $42\text{ }^{\circ}\text{C} \times 2$ minutos. Se colocó en hielo y se adicionó 1 μL de la enzima Superscript II (Invitrogen), se incubó en un termoblock a $42\text{ }^{\circ}\text{C} \times 50$ minutos, posteriormente para inactivar la reacción se incubó en un termoblock a $70\text{ }^{\circ}\text{C} \times 15$ minutos.

La amplificación del gen N del HRSV se realizó de la siguiente forma. En un tubo para PCR de 0.2 mL se agregó: 5 μL de amortiguador de PCR 10X, 1.5 μL de MgCl_2 (50mM), 1 μL de dNTPs (10 mM), 1 μL de oligonucleótido sentido (10 mM), 1 μL de oligonucleótido antisentido (10 mM), 0.4 μL de Taq DNA polimerasa (5U/ μL) (Invitrogen) y 2 μL de DNA complementario. Se adicionaron 38.1 μL de agua-DEPC para un volumen final de 50 μL por muestra, se mezcló por pipeteo y los tubos se colocaron en el termociclador (GeneAmp, PCR system 2400, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Las condiciones de amplificación fueron: $95\text{ }^{\circ}\text{C} \times 3$ minutos 1 ciclo, $95\text{ }^{\circ}\text{C} \times 30$ segundos, $56\text{ }^{\circ}\text{C} \times 30$ segundos, $72\text{ }^{\circ}\text{C} \times 40$ segundos 40 ciclos, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 minutos 1 ciclo. El producto amplificado fue analizado en un gel de agarosa (2%) teñido con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, MO, USA) y visualizado en un transluminador con luz UV (Bio-Rad, Hércules, CA, USA).

El mismo procedimiento se utilizó para los M ϕ N utilizados como control. El DNA complementario se utilizó para la PCR en punto final así como para la PCR en tiempo real de los experimentos subsecuentes.

V.II.II. Detección del antígeno viral por citometría de flujo

El antígeno viral se detectó en la membrana celular de M ϕ P con el anticuerpo policlonal anti-RSV acoplado a FITC (Oxoid, Hampshire, UK), diluido 1:100 en PBS/0.1 % de albumina sérica bovina (PBSA) por citometría de flujo en el equipo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

Las muestras para el análisis se prepararon de la siguiente manera. Células de M ϕ P (5×10^5) se resuspendieron en 1 mL de PBSA, se centrifugaron a 1200 rpm \times 3 minutos y el botón celular se resuspendió en paraformaldehído al 4%, se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente (TA) en agitación constante, posteriormente se lavó con 1 mL de PBSA y se volvió a centrifugar, las células se resuspendieron en 0.5 mL de solución de bloqueo (2 % de albumina sérica bovina, 50% de suero fetal bovino) y se incubó toda la noche a 4 °C en agitación constante, Se lavó una vez con PBSA y se incubó por 2 horas a TA en agitación constante y protegido de la luz. El botón celular se lavó y resuspendió en 0.3 mL de PBSA. 10,000 células por muestra se adquirieron en el equipo FACScan y los datos fueron analizados en el software WinMDI 2.9 (Scripps Research Institute, CA, USA). Se utilizaron M ϕ N bajo las mismas condiciones como control de inespecificidad del anticuerpo.

V.III. Actividad fagocítica

V.III.I. No opsonica y opsonica (mediada por Fc γ Rs)

Se realizaron ensayos de fagocitosis por el método descrito por Jungi 1985, con algunas modificaciones. Se utilizaron eritrocitos de carnero (SRBC) sin opsonizar y opsonizados con dos concentraciones sub-aglutinantes (1.5 o 2.28 μ g/ml) de anticuerpos anti-DNP (4F8; IgG2b, proporcionado amablemente por el Dr. Enrique Ortega, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México D.F.). Los SRCB fueron marcados con 1 mg/mL de ácido trinitrobenzensulfónico (TNBS, Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) en condiciones alcalinas (3.2 mg de TNBS, 3.5 mL de buffer de baratos pH 8.5) por 30 minutos a TA. Posteriormente se lavaron con amortiguador DGVB²⁺ (Gelatina 0.05%, Barbital 2.5mM, Dextrosa 2.5%, CaCl₂ 0.15mM, MgCl₂ 0.5mM) y se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-DNP IgG (4F8; IgG2b). El título del anticuerpo se determinó por ensayos de hemaglutinación.

M ϕ P o M ϕ N se sembraron en placas de 96 pozos (1×10^5 células en 200 μ L de RPMI por pozo), los SRBC no opsonizados o opsonizados (25 μ L por pozo de una suspensión de 2% de SRBC) fueron adicionados a los pozos e incubados por 60 minutos a 37 °C. Los SRBC no fagocitados fueron lisados con agua destilada y las células fueron lavadas dos veces con PBS. Las células en los pozos fueron lisados con

1% de dodecilsulfato de sodio (SDS) in PBS. La actividad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina ingerida fue determina por ensayo colorimétrico utilizando 3,3'-diaminobenzidina como sustrato.

La densidad óptica fue leída en un espectrofotómetro (Benchmark plus microplate spectrophotometer, Bio-Rad) a 492 nm. Los resultados se expresan como índice fagocítico (Número de células \times Densidad óptica /100). Todos los experimentos de fagocitosis de SRBC opsonizados y no opsonizados fueron realizados por sextuplicados. Se utilizaron seis pozos adicionales con células de M ϕ P o M ϕ N tratados en las mismas condiciones a los cuales no se les agregó SRBC para evaluar la actividad enzimática endógena.

V.IV. Citometría de flujo

V.IV.I. Cuantificación de Fc γ RIIB/RIII en cultivos de M ϕ P y M ϕ N no permeabilizados (membrana celular) y permeabilizados (membrana celular e intracelular)

Los cultivos celulares de M ϕ P y M ϕ N (5×10^5) se resuspendieron en PBSA, se lavaron y centrifugaron a 1200 rpm y el botón celular se resuspendió en paraformaldehído al 4% para fijar las células. Se incubó a TA durante 20 minutos en agitación constante. Posteriormente se lavaron dos veces con PBSA y fueron incubados durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante con el anticuerpo de rata anti-Fc γ RIIB/III (2.4G2, que reconoce a los Fc γ RIIB/RIII) posteriormente se lavaron 2 veces y se incubó por una hora a temperatura ambiente protegido de la luz con el F(ab')₂-FITC cabra anti-rata como segundo anticuerpo, (Ambos anticuerpos de Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Después las células se lavaron, centrifugaron y se resuspendieron en 300 μ L de PBSA, 10,000 células fueron adquiridas por citometría de flujo en el equipo FACScan. Los datos fueron analizados en el software WinMDI 2.9.

Para fijar y permeabilizar las células, se utilizó una mezcla de Metanol-Acetona (1:1) enfriado previamente a 4 $^{\circ}$ C, las células se incubaron durante 30 segundos y posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm durante 1 minuto, Se lavó con PBSA y se realizó el procedimiento de tinción descrito arriba.

V.V. Medio condicionado de MφP sobre MφN

V.V.I. Cuantificación de FcγRIIB/RIII en MφN estimulados con medio condicionado por citometría de flujo

Cultivos de MφP o MφN (5×10^6 células) en monocapa sub-confluyente se lavaron con PBS 2 veces y se les adicionó 7 mL de medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de SFB. Después de 12 o 24 horas de incubación a 37 °C se colectaron los sobrenadantes (medio condicionado) y se centrifugó a 1200 rpm para retirar los restos celulares. Se sembraron 1×10^6 células de MφN y se dejaron 12 horas a 37 °C con 5 % de CO₂ para que se adhirieran a la placa de cultivo. Se lavaron las células dos veces con PBS y se le adicionó 2 mL de medio condicionado de 12 o 24 horas y se incubó por 24 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. Se utilizó la bacteria *Haemophilus influenzae* no tipificable (HiNT, cepa 2019, proporcionada amablemente por el Dr. Michael Apicella del Departamento de Microbiología, de la escuela de Medicina, Universidad de Iowa) inactivada por calor como control positivo de estimulación de MφN a una m.o.i. de 100. La bacteria se inactivó 60 minutos a 70 °C en baño María, se lavó dos veces con PBS y se centrifugó a 7000 rpm a 4 °C y se resuspendió en PBS a una concentración final de 1×10^{10} bacterias/mL. La expresión de los FcγRIIB/RIII se determinó por citometría de flujo como se describió anteriormente.

V.VI. Endocitosis de FcγRIIB/RIII en MφN y MφP

V.VI.I. Cinética de endocitosis de FcγRIIB/RIII marcados con anticuerpos y evaluados por citometría de flujo

La endocitosis en la membrana celular de los FcγRIIB/RIII se determinó monitoreando con el anticuerpo monoclonal 2.4G2 la presencia en la membrana de los receptores.

Se sembraron 5×10^5 células de MφP o MφN y se incubaron a 37 °C durante 12 horas para que se adhirieran a placas de cultivo. Se lavaron dos veces con PBS y se les agregó 1 mL de medio de cultivo RPMI sin SFB enfriado previamente a 4 °C conteniendo 20 µg/mL de anticuerpo 2.4G2, se incubó durante 30 minutos a 4 °C, posteriormente se lavó con medio de cultivo RPMI sin SFB frío. Para iniciar la

endocitosis se agregó medio de cultivo RPMI suplementado con 10 % SFB a 37 °C y los cultivos se incubaron a 37 °C en 5 % de CO₂. Las células se cosecharon a diferentes tiempos (0, 30, 60 y 120 minutos de incubación) y se lavaron con PBS frío, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a TA, se lavaron y se agregó el F(ab')₂-FITC cabra anti-rata como segundo anticuerpo. La intensidad media de fluorescencia se determinó por citometría de flujo con el equipo FACScan como se describió anteriormente.

V.VII. Western blot

V.VII.I. Cuantificación de FcγRI, RIIB y RIII en MφP y MφN

3 × 10⁶ células de MφP o MφN se lisaron para extraer proteína total utilizando 100 μL de buffer de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, Desoxicolato de sodio 0.5%, Dodecilsulfato sódico SDS 0.1%) con 1X de inhibidor de proteasas (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Las células se agitaron en un vortex por 1 minuto y se incubaron en hielo por 10 minutos, los lisados celulares fueron centrifugados a 13000 rpm por 20 minutos a 4°C para remover material insoluble. Se colectó el sobrenadante y la concentración de proteínas se determinó utilizando el kit DC protein assay de Bio-Rad.

Se tomaron 20 μg de proteína de cada muestra diluida en buffer de lisis, se adicionó 5 μL de 4X SDS sample buffer, se aforó a 17 μL de volumen total y se desnaturalizó por calor a 90 °C por 10 minutos. Las proteínas desnaturalizadas se cargaron en el sistema de geles Novex Bis-Tris Mini Gels NuPAGE (Invitrogen) y se corrieron a 200 volts durante 55 minutos, posteriormente fueron transferidas a membranas de PVDF (Amersham, Piscataway, NJ, USA), en cámara húmeda a 30 volts durante 60 minutos. Después de ese tiempo las membranas fueron incubadas con solución de bloqueo de sitios inespecíficos (TBS, Tween-20 0.1% y leche descremada 5%) durante 1 hora a TA en agitación constante. Se lavó tres veces con TBS/Tween-20 0.1% y se incubaron toda la noche a 4°C en agitación constante con el anticuerpo primario diluido en TBS/Tween-20 0.1% con leche descremada 5%. La dilución de los anticuerpos primarios estuvo en función del anticuerpo mismo, los anticuerpos primarios utilizados fueron: anticuerpo de cabra policlonal anti-FcγRI (N-19) diluido

1:500, anticuerpo de conejo policlonal anti-FcγRIIB (FL-285) diluido 1:500, anticuerpo de ratón monoclonal anti-FcγRIII (ASH1975) diluido 1:250, y anticuerpo de cabra policlonal anti-GAPDH, todos los anticuerpos de Santa Cruz Biotechnology. Posteriormente a la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron 3 veces con TBS/Tween-20 0.1% y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa apropiado para cada anticuerpo primario durante 1 hora a TA en agitación constante. Se lavó 3 veces con TBS y las proteínas fueron detectadas utilizando un sustrato quimioluminescente (Super Signal West Dura Extended Duration substrate, Pierce Thermo Scientific, IL, USA). La intensidad de las bandas fueron normalizadas respecto a GAPDH y el análisis densitométrico se realizó adquiriendo las imágenes en el equipo Chemidox XRS y analizado con el programa Quantity one de BioRad.

Se utilizó la misma membrana despegando los anticuerpos con 25 mL de buffer de despegue (SDS 2%, Tris 62.5mM, β-Mercaptoetanol 175 μL, pH 6.8) a 55 °C durante 15 minutos en agitación constante, posteriormente se lavó 3 veces con TBS/Tween-20 0.1%, se incubo con buffer de bloqueo durante 1 hora a TA en agitación constante y se incubo con el siguiente anticuerpo primario como se describió anteriormente.

V.VIII. RT-PCR en tiempo real

V.VIII.I. Cuantificación de mRNA de FcγRI, RIIB, RIII y RIV en MφP y MφN

Se extrajo el RNA total de 1×10^6 células de MφP o MφN y la extracción de RNA y la reverso-transcripción a DNA complementario se realizó de acuerdo a las especificaciones arriba mencionadas.

El PCR en tiempo real se realizó utilizando oligonucleótidos (assay on demand 20X mix) para amplificar los genes de los FcγRs y de GAPDH como control endógeno y se utilizaron reactivos Master Mix, ambos de TaqMan (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA). Se utilizaron 80 ng de DNA complementario para amplificar los genes FcγRs y GAPDH en el termociclador en tiempo real 7500 de Applied (Applied Biosystems) utilizando los parámetros de amplificación del proveedor. Las muestras se amplificaron

por triplicado y los datos obtenidos se analizaron en el programa Microsoft Excel, con el método comparativo CT (ΔT). La cantidad de mRNA de cada gen fue obtenida por normalización respecto al gen endógeno (GAPDH) utilizando el método $2^{-\Delta CT}$.

V.IX. Análisis *in silico*

V.IX.I. Determinación de factores de transcripción involucrados en la expresión de los mRNA de los Fc γ Rs

El análisis *in silico* se realizó utilizando las secuencias de los promotores de cada uno de los Fc γ Rs y la predicción de los factores de transcripción se realizó con base en la secuencia consenso de reconocimiento que presentan en el DNA.

Las secuencias promotoras se obtuvieron de la base de datos **Ensembl** (www.ensembl.org/index.html), con una longitud de 1500 pb río arriba y 10000 pb río abajo del sitio ATG para cada uno de los Fc γ Rs. La identificación de sitios de unión de factores de transcripción sobre la región promotora se realizó con el programa **Patch** que se encuentra integrada a la base de datos **TRANSFAC** (www.gene-regulation.com/pub/databases.html) la cual contiene información de organismos eucariontes vertebrados (ratón).

La identificación/predicción *in silico* se genera a partir del emparejamiento de secuencias de reconocimiento (pattern matching). La puntuación o valor asignado a la predicción corresponde al grado de predicción de emparejamiento hacia cualquier secuencia de longitud definida a través de matrices de peso (position weight matrix, PWM). Entre las especificaciones para restringir la búsqueda, se considera: la longitud de la secuencia consenso a buscar, el número máximo de nucleótidos no emparejados (mismatching nucleotides) así como la penalización. La información de predicción incluye: posición, sentido de los sitios de unión, número de sitios de unión (si hay más de uno), número de nucleótidos no emparejados, puntuación del emparejamiento (matching site) donde 100 significa 100% de identidad y los factores que se pueden unir a la secuencia de reconocimiento.

Las predicciones obtenidas de los factores de transcripción se incluyen en la Tabla 1 en la sección de RESULTADOS.

V.X. Expresión del factor de transcripción PU.1 en M ϕ P y M ϕ N

V.X.I. Cuantificación de PU.1 en proteína total, fracción citoplasmática y fracción nuclear por Western blot

Se utilizaron 2×10^6 células de M ϕ P o M ϕ N para extraer proteína total con el buffer de lisis RIPA siguiendo el protocolo mencionado anteriormente y para extraer la proteína en fracción citoplasmática y fracción nuclear se utilizó el kit ProteoJET Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction (Fermentas, Life Sciences, MD, USA) siguiendo las especificaciones del proveedor.

El Western blot se realizó con el protocolo arriba mencionado, utilizando los anticuerpos primarios: anticuerpo de conejo anti-PU.1 (9G7 de Cell Signaling, Danvers, MA, USA) diluido 1:500, anticuerpo anti-Lamina B (M-20) diluido 1:250, anticuerpo anti- β -Tubulina (H-235) diluido 1:500 y el anticuerpo anti-GAPDH (V-18) diluido 1:500, los 3 últimos anticuerpos de Santa Cruz Biotechnology. Se utilizó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa apropiado para cada anticuerpo primario. Las proteínas se detectaron y analizaron con el procedimiento mencionado anteriormente.

β -Tubulina y Lamina B se utilizaron como control de pureza de las fracciones celulares, citoplasma y núcleo respectivamente, GAPDH se utilizó para normalizar la concentración de PU.1 en proteína total.

V.XI. Transfección transitoria con siRNA

V.XI.I Transfección de M ϕ P y M ϕ N con siRNA para apagar la expresión de PU.1 analizado por Western blot y RT-PCR en tiempo real

Para los ensayos de transfección se utilizó el sistema de Santa Cruz Biotechnology (siRNA Reagent System, sc-45064) el cual incluye: un control irrelevante (Control siRNA-A, sc-37007), un control de transfección (Control siRNA conjugado con fluoresceína-A, sc-36869), reactivo de transfección (siRNA Transfection

Reagent, sc-29528), medio de transfección (siRNA Transfection Medium,sc-36868) y buffer de dilución (siRNA Dilution Buffer, sc-29527). Para apagar el mRNA de PU.1 se utilizó un siRNA específico (siRNA, sc-36331).

La transfección de M ϕ P o M ϕ N con siRNA específico para PU.1 se realizó utilizando 8×10^5 células, los cultivos se sembraron en placas individuales y se incubaron con medio de cultivo RPMI suplementado con 2% de SFB durante 12 horas a 37 °C con 5% de CO₂ para su adherencia a la placa de cultivo, posteriormente se lavaron dos veces con RPMI sin SFB. La transfección se realizó siguiendo el protocolo del proveedor (siRNA Transfection Protocol, Santa Cruz Biotechnology). Los cultivos se incubaron por 36 horas con los diferentes siRNAs y posteriormente se colectaron para extraer proteína total y el RNA.

Se evaluó el efecto del siRNA sobre la proteína y mRNA de PU.1 por Western blot y RT-PCR en tiempo real respectivamente con la metodología descrita anteriormente utilizando el mismo anticuerpo mencionado y para amplificar el DNA complementario de PU.1 se utilizaron sondas TaqMan (assay on demand 20X), GAPDH como control endógeno y reactivos Master Mix de Applied Biosystems.

V.XI.II. Efecto del apagado de PU.1 sobre los receptores Fc γ RI, RIIB, RIII y RIV determinado por RT-PCR en tiempo real en M ϕ P y M ϕ N

Se utilizó el mismo RNA extraído de las muestras transfectadas con siRNA mencionadas arriba para evaluar el efecto de apagar PU.1 sobre los mRNA de los Fc γ Rs por RT-PCR tiempo real descrito anteriormente.

V.XII. Vida media de PU.1 en M ϕ P y M ϕ N

V.XII.I. Cuantificación por Western blot de la expresión de PU.1 en presencia del inhibidor de síntesis de proteínas cicloheximida

Se sembraron 2×10^6 células de M ϕ P o M ϕ N en placas de 6 pozos y se incubaron durante 12 horas a 37 °C con 5 % de CO₂, posteriormente se lavaron 2 veces con RPMI sin SFB y se adicionó 2 mL de medio RPMI suplementado con 10 % de SFB y 10 μ g/mL de cicloheximida, se incubó por 12, 24 y 36 horas a 37 °C con 5 % de CO₂.

Las muestras se colectaron en los tiempos mencionados para extraer proteína y evaluar por Western blot el efecto de la cicloheximida sobre PU.1, se utilizaron los mismos anticuerpos anti-PU.1 y anti-GAPDH bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

V.XIII. Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media del valor obtenido en cada experimento \pm 1 desviación estándar. Las diferencias entre los grupos fueron determinadas por la prueba de *t* de *Student* utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 4.0 (GraphPad, San Diego CA, USA) y se consideró estadísticamente significativo una $p < 0.05$.

VI RESULTADOS

VI.I. El virus persiste en el cultivo de MφP

La confirmación de la persistencia del HRSV se monitoreó a través de la determinación del gen N y por la expresión de antígeno viral en la célula. En la figura 1A se muestra la amplificación del gen N del HRSV en los cultivos de MφP. Se determinó el porcentaje de células que expresan antígeno viral y se encontró que varía entre el 92 y 96 % (Figura 1B) en los diferentes cultivos utilizados. Los experimentos de este estudio se realizaron con los pases 72, 83 y 87 de MφP y con tres pases distintos de MφN.

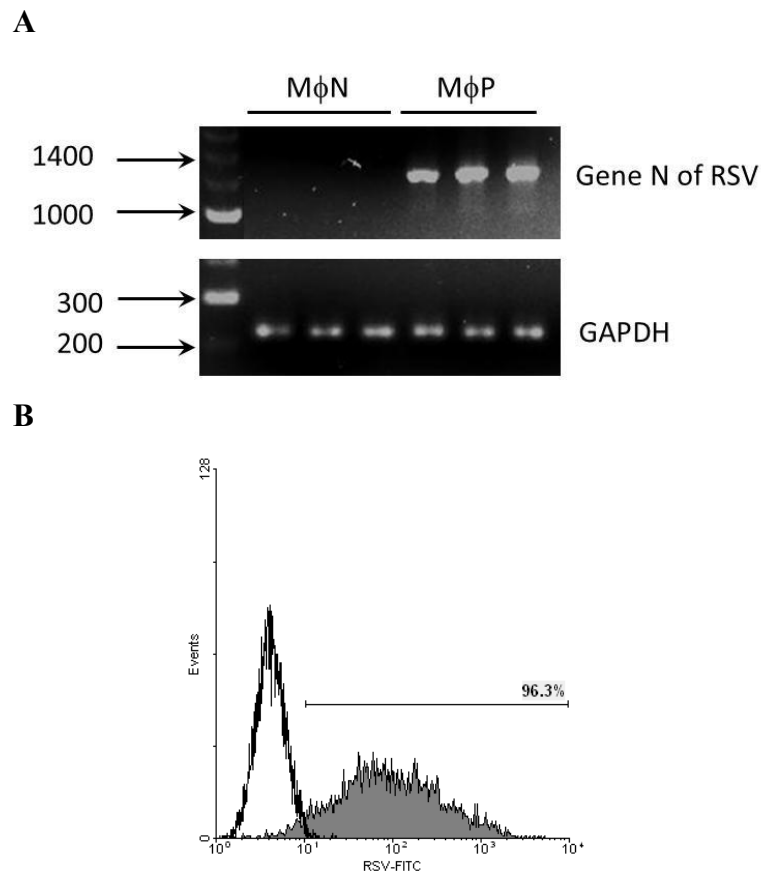


Figura 1. Persistencia del HRSV en macrófagos. **A)** Presencia del mRNA del gen N del HRSV en MφP, un segmento de GAPDH fue amplificado como control; **B)** Expresión de antígeno de HRSV en la membrana de MφP. MφP (histograma gris) y MφN (histograma vacío) teñidos con anticuerpos anti-HRSV marcado con FITC y analizados por citometría de flujo. Histograma representativo de varios experimentos independientes.

VI.II. En M ϕ P se incrementó la actividad fagocítica y la expresión de Fc γ RIIB/RIII

Con los antecedentes mencionados y con la finalidad de evaluar si en M ϕ P se encontraba la actividad fagocítica mediada por Fc γ Rs y la expresión de los Fc γ RIIB/RIII incrementada, se evaluaron esos parámetros. El resultado en la figura 1A muestra que no hay diferencias en la actividad fagocítica de los SRBC no opsonizados (0.0 μ g/mL) entre M ϕ P y M ϕ N, mientras que en los SRBC-IgG opsonizados si hay cambios, se utilizaron dos concentraciones de IgG para opsonizar a los SRBC (1.52 y 2.28 μ g/mL) y observamos que en las dos concentraciones la actividad fagocítica se incrementa en un factor de 2 veces más en M ϕ P comparada con los M ϕ N. Al evaluar la expresión de los receptores en la membrana de los M ϕ P y compararla con los M ϕ N encontramos un incremento entre un 50 a un 70% (Figura 2B). El resultado del incremento en la actividad fagocítica de SRBC-IgG opsonizados con la concentración de 1.52 μ g/mL y el incremento en la expresión de los receptores es similar a lo reportado por Guerrero-Plata A. et al 2001.

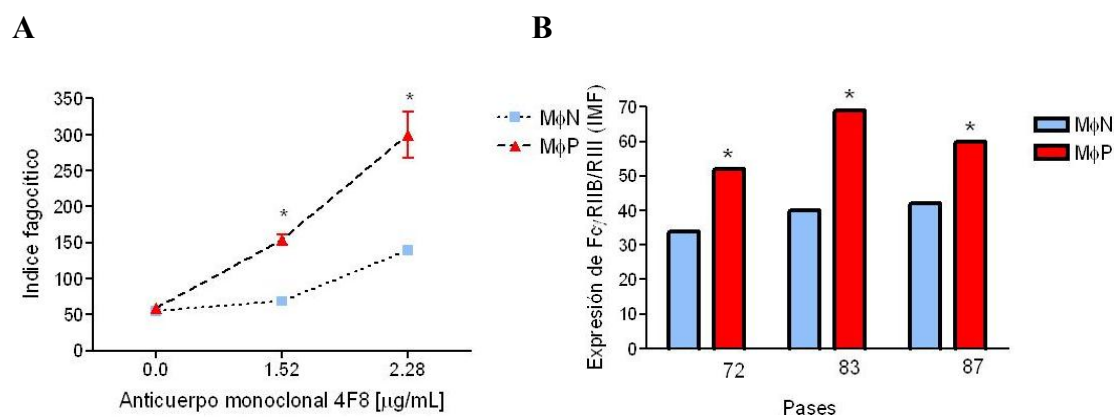


Figura 2. Actividad fagocítica medida por Fc γ Rs y expresión de Fc γ RIIB/RIII en M ϕ P o M ϕ N. **A)** Fagocitosis de eritrocitos de carnero (SRBC) IgG-opsonizados y no opsonizado. Las células fueron incubadas con SRBC-IgG opsonizadas con dos diferentes concentraciones de anticuerpo (IgG, 4F8). Los resultados son expresados como la media \pm 1 DS de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$); **B)** Expresión de Fc γ RIIB/RIII en M ϕ P o M ϕ N marcados con el anticuerpo monoclonal específico 2.4G2, analizado por citometría de flujo. Cada barra individual representa la intensidad media de fluorescencia (IMF) de 10,000 células. Análisis estadístico del promedio de IMF de tres diferentes pases de M ϕ N y M ϕ P (38.67 ± 2.4 vs. 60.33 ± 4.9 , respectivamente) indica una diferencia significativa en la expresión de Fc γ RIIB/RIII (* $p = 0.016$).

VI.III. El medio condicionado (MC) de M ϕ P no induce la expresión de Fc γ RIIB/RIII en M ϕ N

Con la finalidad de determinar si factores solubles presentes en el sobrenadante (medio condicionado, MC) de los cultivos M ϕ P participan en el incremento de la expresión de los Fc γ RIIB/RIII, se incubaron M ϕ N con MC de M ϕ P o M ϕ N por 24 horas. En la figura 3 se muestra que no hubo cambios significativos en la expresión en los M ϕ N incubados con los diferentes MC, la expresión fue similar a lo encontrado en condiciones basales en M ϕ N. Se confirmó la capacidad de respuesta a estímulos de los M ϕ N al tratar el cultivo con la bacteria HiNT inactivada, en la figura 3 podemos observar que los M ϕ N responden al estímulo incrementando significativamente la expresión de los receptores.

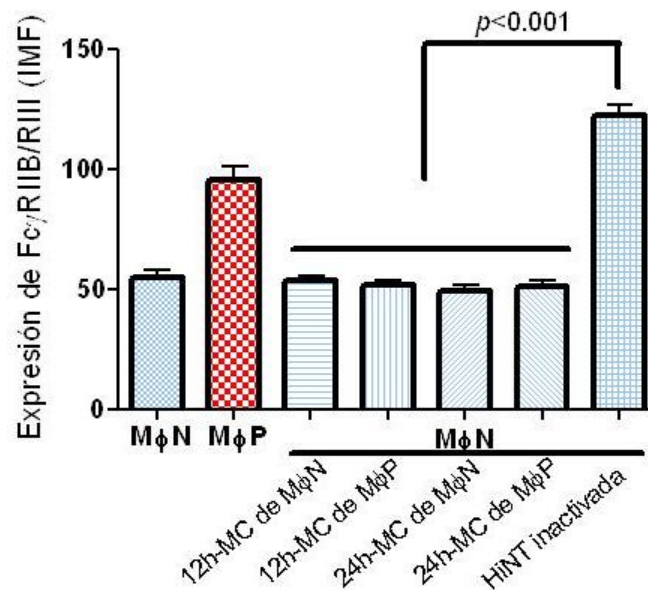


Figura 3. Expresión de Fc γ RIIB/RIII en M ϕ N estimulados con medio condicionado (MC) de M ϕ P o M ϕ N. M ϕ N fueron estimulados con MC de 12 o 24 horas de M ϕ P o M ϕ N, o con HiNT inactivada. Después de 24 horas de estímulo, los Fc γ RIIB/RIII fueron analizados por citometría de flujo. Los resultados son expresados como la media \pm 1 SD de la MFI de tres experimentos independientes.

VI.IV. La internalización de los Fc γ RIIB/RIII es similar en M ϕ N y en los M ϕ P

Para descartar que el incremento observado en la expresión de los Fc γ RIIB/RIII se debiera a una alteración en la actividad endocítica de los receptores, se realizaron ensayos de endocitosis de Fc γ RIIB/RIII. Los resultados mostraron que los M ϕ P tienen una velocidad de internalización diferente a los M ϕ N. Sin embargo, la figura 4 muestra que ambos cultivos internalizan el complejo 2.4G2-Fc γ RIIB/RIII de forma similar.

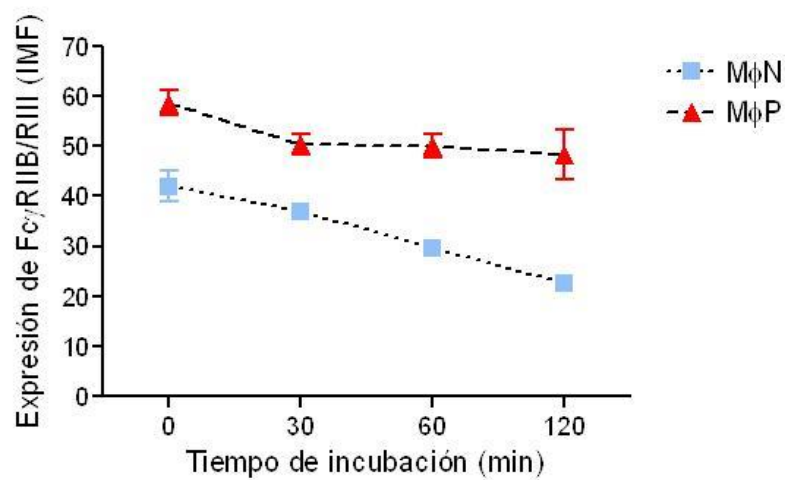


Figura 4. Endocitosis de Fc γ RIIB/RIII en M ϕ P y M ϕ N. Cinética de internalización de complejos anticuerpo 2.4G2-Fc γ RIIB/RIII fueron monitoreados por citometría de flujo durante 120 minutos. Los resultados son expresados como la media \pm 1 SD de tres experimentos independientes.

VI.V. El contenido total de Fc γ RIIB/RIII esta incrementado en los M ϕ P

Se determinó el contenido proteico total en M ϕ P y M ϕ N a través de determinar la concentración de la proteína alfa. En la figura 5 se puede observar que en M ϕ P aumenta su concentración en las células no permeabilizadas (proteína en membrana) y en las permeabilizadas (proteína total) comparada con los M ϕ N. Estos resultados sugieren que la persistencia del virus en la célula induce incremento en la síntesis de los Fc γ RIIB/RIII.

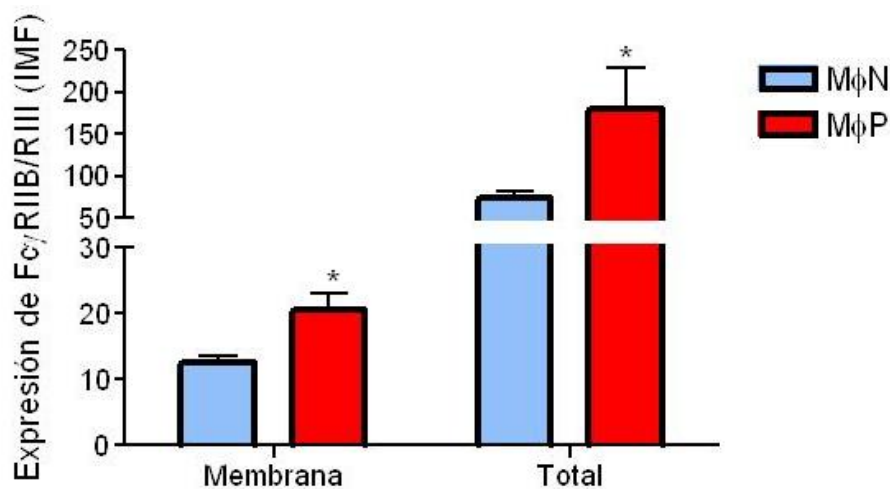


Figura 5. Expresión total de Fc γ RIIB/RIII en M ϕ P o M ϕ N. Los Fc γ RIIB/RIII fueron cuantificados en M ϕ P o M ϕ N en células permeabilizadas y no permeabilizadas. La expresión de los Fc γ RIIB/RIII fue evaluada con el anticuerpo monoclonal 2.4G2 y analizada por citometría de flujo. Los resultados son expresados como la media \pm 1 SD de tres experimentos independientes, utilizando diferentes pases de M ϕ N y M ϕ P. (* indica $p < 0.05$).

VI.VI. La persistencia del HRSV en el macrófago incrementa la síntesis de la proteína de FcγRIIB y FcγRIII pero no de FcγRI.

Los resultados de los experimentos anteriores se obtuvieron analizando a los receptores FcγRIIB y FcγRIII simultáneamente con el anticuerpo 2.4G2 anti-FcγRIIB/RIII, sin embargo, en los resultados descritos a continuación se trabajó con los cuatro receptores en la determinación del mRNA y tres receptores en proteína (no se incluye el FcγRIV por no disponer de un anticuerpo monoclonal comercial específico).

La abundancia relativa en extractos de proteína total de MφP o MφN mostró que los FcγRIIB y FcγRIII están incrementados en los MφP comparados con los MφN, El FcγRIIB se incrementó 1.2 veces y el FcγRIII 0.5 veces, mientras que en el FcγRI no se observó un incremento significativo entre ambos cultivos (Figura 6).

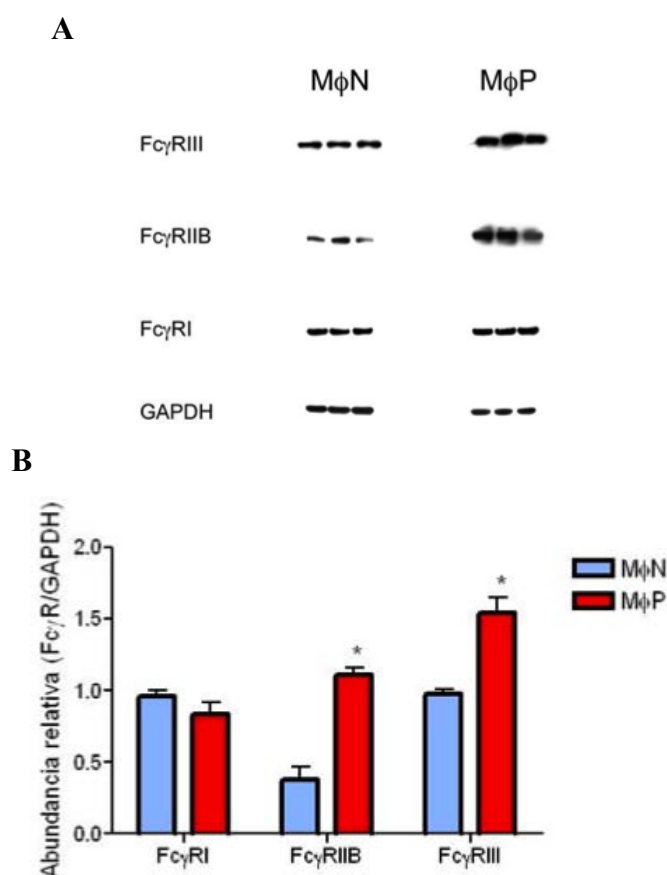


Figura 6. Expresión de FcγRI, RIIB y RIII en MφP y MφN (Proteína total). **A)** Western blot de tres diferentes pases de MφP y MφN; **B)** Densitometría de la abundancia relativa de cada isoforma de FcγR. Se determinó por análisis densitométrico y se normalizó con respecto a la intensidad de GAPDH. Los resultados se expresan como la media \pm 1 SD (* indica $p < 0.05$).

VI.VII. La expresión de los mRNA de FcγRI, FcγRIIB y FcγRIII se incrementa pero no la de FcγRIV

Se evaluaron los niveles de expresión del mRNA de los cuatro FcγRs y se encontró que la persistencia del HRSV, incrementa la expresión del mRNA de FcγRI, FcγRIIB y FcγRIII con respecto a los MφN, mientras que el FcγRIV no se observó un cambio significativo entre ambos cultivos (Figura 7).

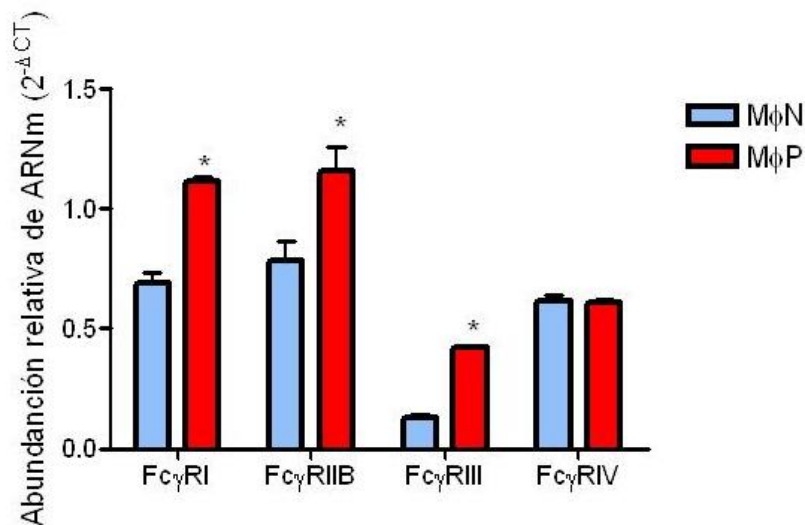


Figura 7. Expresión del mRNA de los FcγRs en MφP o MφN. Los mRNA para FcγRI, RIIB, RIII and RIV fueron cuantificados por PCR tiempo real. Los niveles de transcripción se normalizaron con respecto a la expresión del mRNA de GAPDH. Los datos son expresados como $2^{-\Delta CT}$. Los resultados se muestran como la media \pm 1 SD de tres experimentos independientes utilizando células de los pases 72, 83 and 87 de MφP, * indica $p < 0.05$.

VI.VIII. El factor de transcripción PU.1 reconoce secuencias en los genes de las isoformas FcγRs

El resultado del incremento en la expresión mRNA de FcγRI, FcγRIIB y FcγRIII observado en los MφP sugiere la participación de factores de transcripción. Utilizando el programa Patch de la base de datos TRANSFAC se realizó la búsqueda de factores de transcripción relacionados con la expresión de las isoformas de FcγRs como se describe en materiales y métodos. El criterio de selección del factor de transcripción se basó en que las cuatro isoformas de FcγRs fueran reconocidas por un mismo factor de transcripción.

Los resultados obtenidos del análisis *in silico* mostraron que el factor de transcripción PU.1 reconoce una secuencia de nucleótidos específicas en los cuatro genes de los FcγRs. Para FcγRI, RIII y RIV el factor de transcripción reconoce una sola secuencia en estos receptores, en cambio en el FcγRIIB reconoce la misma secuencia en dos posiciones (Tabla 1). Otros factores de transcripción como AP.1, c-Fos y c-Jun se encontraron en algunas de las isoformas de los FcγRs. Sin embargo, no en las cuatro isoformas de los FcγRs, por lo tanto no se consideraron en este estudio.

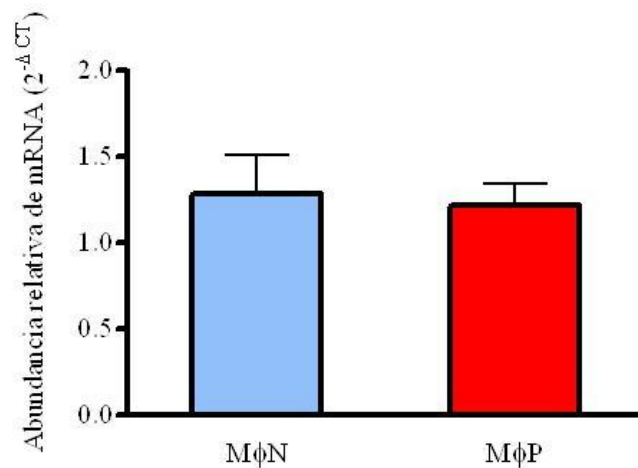
Tabla 1. Factor de transcripción asociado a los genes de FcγRs identificados por análisis *in silico*. Se utilizaron los programas Patch y P-Match de la página de internet www.gene-regulation.com.

Receptor	Factor de transcripción	Secuencia	Posición
FcγRI	PU.1	AGGGAGGAAG	802 (+)
FcγRIIB	PU.1	AGGGAGGAAG	154 (+) 924 (+)
FcγRIII	PU.1	AGGGAGGAAG	756 (+)
FcγRIV	PU.1	AGGGAGGAAG	184 (-)

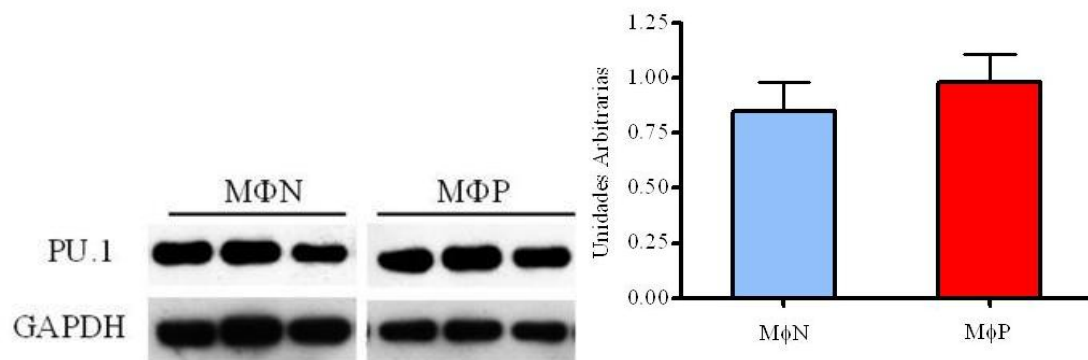
VI.IX. La expresión de PU.1 en MφP y MφN es similar

Seleccionado el factor de transcripción PU.1 como participante en la síntesis de FcγRs, se confirmó su expresión en los MφP y en los MφN (mRNA, proteína total, en el núcleo y el citoplasma). Los resultados mostraron que los niveles de expresión del mRNA de PU.1 no difieren estadísticamente entre ambos cultivos (Figura 8A). La figura 8B muestra que la concentración de la proteína de PU.1 en ambos cultivos es similar. Al hacer el fraccionamiento celular encontramos que no hay diferencias significativas en el contenido PU.1 en el citoplasma ni en el núcleo de MφP y MφN. Además observamos que la mayor cantidad de PU.1 está localizado en el núcleo de las células (Figura 8C). La translocación al núcleo de PU.1 sugiere que está activo.

A



B



C

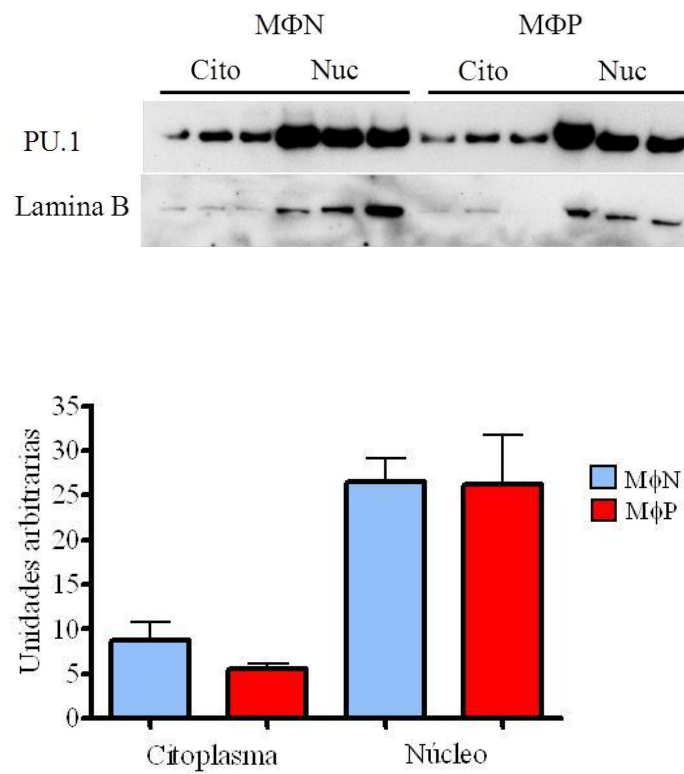


Figura 8. Expresión del factor de transcripción PU.1 en MφP y MφN. **A)** El mRNA de PU.1 fue cuantificado por PCR en tiempo real. Los niveles de transcripción fueron normalizados con respecto a la expresión del mRNA de GAPDH. Los datos son expresados como $2^{-\Delta CT}$. Los resultados se muestran como la media \pm 1 SD de tres experimentos independientes; **B)** Proteína total de PU.1 y GAPDH fueron determinadas por Western blot; La abundancia relativa de PU.1 se determinó por análisis densitométrico y se normalizó con respecto a la intensidad de GAPDH; **C)** Localización del factor de PU.1 (proteína en citoplasmas o núcleo) en MφP o MφN. Las proteínas de PU.1 y Lamina B (control de extracto nuclear) fueron determinadas por Western blot; La abundancia relativa de PU.1 fue determinada por análisis densitométrico.

VI.X. El siRNA específico contra PU.1 apaga su expresión en MφN pero no en MφP

Una vez establecida la presencia de PU.1 en MφP y MφN y no encontrando diferencias en su expresión o localización, decidimos determinar su participación en el incremento de la expresión de los FcγRs a través de ensayos de transfección con RNA interferente específico, y así reducir o apagar su expresión y evaluar su efecto en la expresión de los mRNA de las isoformas de FcγRs.

Los resultados mostraron que la concentración de la proteína de PU.1 en los MφN disminuyó 3.2 veces respecto al control con RNA irrelevante a las 36 horas de transfección, sin embargo, en los MφP la concentración de la proteína PU.1 no se alteró, la expresión de PU.1 en este cultivo transfectado con el RNA interferente específico contra PU.1 o con el siRNA irrelevante fue similar (Figura 9).

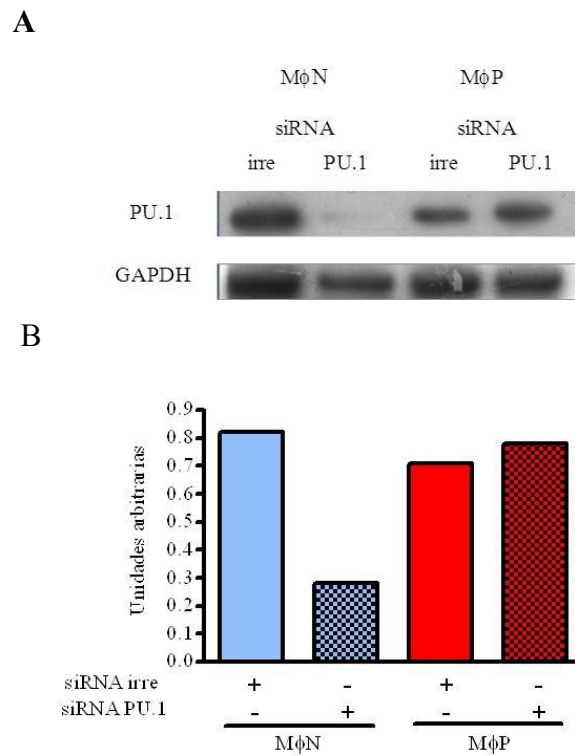


Figura 9. Apagado de la expresión de PU.1 en MφP y MφN por ensayos de transfección con RNA interferente. Cultivos de MφP y MφN transfectados con RNA interferente irrelevante (irre) y específico contra PU.1, las proteínas de PU.1 y GAPDH fueron determinadas después de 36 de transfección por Western blot; La abundancia relativa de PU.1 fue determinada por análisis densitométrico y se normalizó con respecto a GAPDH.

VI.XI. Los mRNA de FcγRs disminuye en los MφN pero no en los MφP

El efecto de apagar PU.1 sobre la expresión de las cuatro isoformas de los FcγRs se determinó evaluando la expresión de los mRNA.

En los MφN transfectados con RNA interferente contra PU.1 observamos una disminución respecto a los valores obtenidos con el siRNA irrelevante en MφN de 1.1 veces para el FcγRIIb y de 2.7 veces para el FcγRIII, mientras que para el FcγRI la disminución no fue estadísticamente significativa. En los MφP transfectados con el RNA interferente contra PU.1, los mRNA de los FcγRs no se observó cambio significativo en los niveles de expresión respecto a los valores mostrados por el control con el RNA interferente irrelevante (Figura 10).

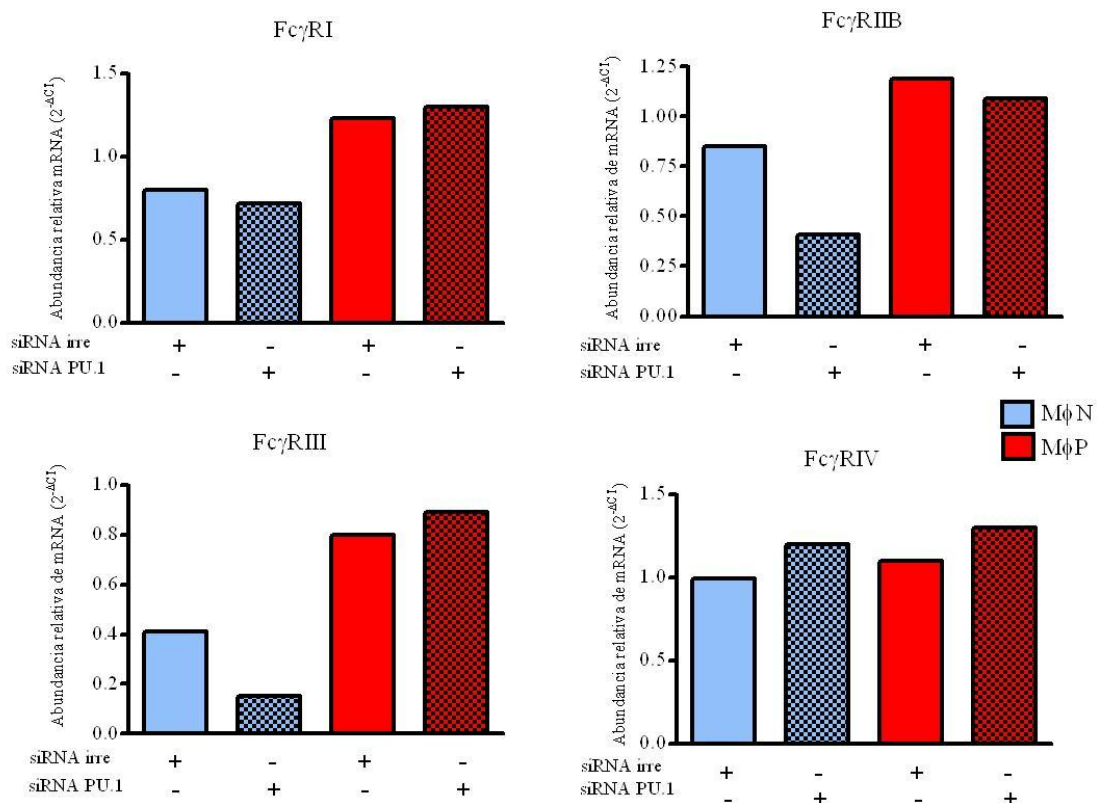


Figura 10. Expresión del mRNA de los FcγRI, FcγRIIB, FcγRIII y FcγRIV en MφP y MφN transfectados con RNA interferente irrelevante (irre) y RNA interferente contra PU.1 por 36 horas. mRNA para FcγRI, FcγRIIB, FcγRIII, FcγRIV y GAPDH fue cuantificado por PCR tiempo real. Los niveles de transcripción fueron normalizados con respecto a la expresión del mRNA de GAPDH. Los datos son expresados como 2^{-ΔCT}.

VI.XII. La expresión del mRNA de PU.1 disminuye en MφP y MφN transfectados con RNA interferente

Comprobamos que el efecto de apagar PU.1 en los niveles de mRNA de PU.1 y observamos que en MφP disminuye

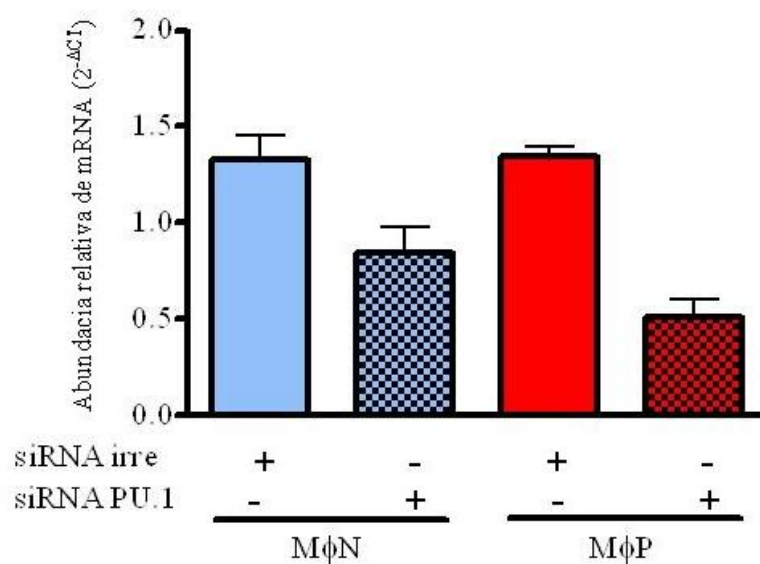


Figura 11. Expresión del mRNA de PU.1 en MφP y MφN transfectados con siRNA por 36 horas. El mRNA de PU.1 y GAPDH se cuantificó por PCR tiempo real. Los niveles de transcripción se normalizaron con respecto a la expresión del mRNA de GAPDH. Los datos son expresados como $2^{-\Delta CT}$

VI.XIII. La vida media de PU.1 esta alterada en MφP

Con la finalidad de evaluar la estabilidad de la proteína PU.1 en MφP y MφN se trataron con cicloheximida por 24 o 36 horas y se determinó la concentración de la proteína PU.1. Observamos que la concentración de PU.1 en MφN a las 24 horas disminuye considerablemente en un factor de 8.7 veces con respecto a los MφP y para las 36 horas en ambos cultivos disminuye PU.1 con respecto a las 24 horas. La proteína GAPDH disminuye de manera similar en ambos cultivos en los 2 tiempos.

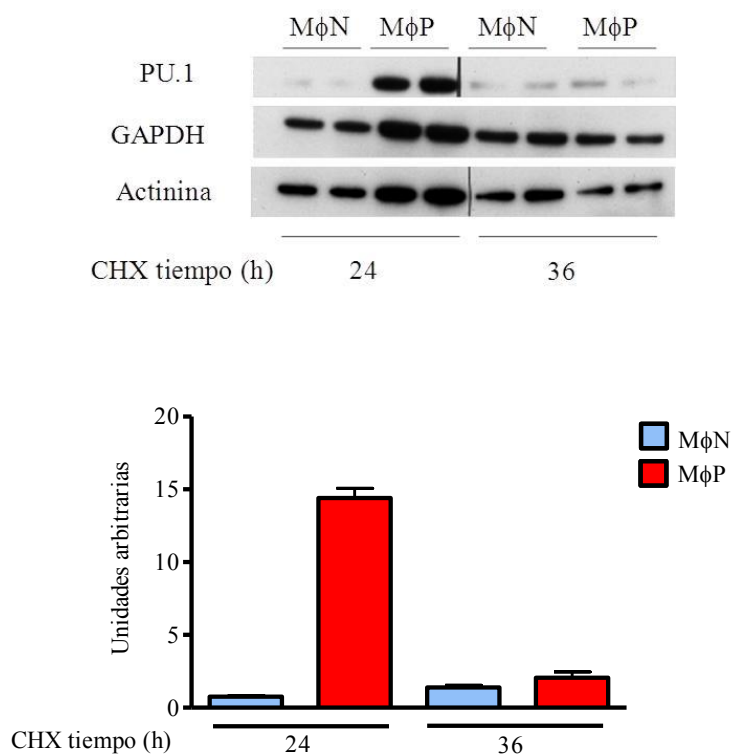


Figura 12. Inhibición de síntesis de proteína con cicloheximida en MφN y MφP. Células de tres diferentes pases de MφN y células de los pases 72, 83 y 87 de MφP fueron tratados por 24 y 36 horas con cicloheximida, posteriormente las células fueron lisadas y las proteínas de PU.1 y GAPDH fueron determinadas por Western blot con anticuerpos específicos; La abundancia relativa de PU.1 fue determinada por análisis densitométrico.

VII DISCUSIÓN

Las modificaciones en la expresión génica de la célula por infecciones virales persistentes *in vitro* han sido ampliamente estudiadas y se cuenta con evidencia de los mecanismos implicados en las alteraciones por dichas infecciones, el modelo de persistencia viral en macrófagos con HRSV del laboratorio ha permitido estudiar diferentes funciones celulares como la fagocitosis, la expresión de citocinas modificadas por la infección viral [61], cambios en las proteínas virales [62], así como alteraciones en las vías de señalización.

En este trabajo se estudió el mecanismo de incremento en la fagocitosis mediada por Fc γ Rs reportada anteriormente [61]. Se utilizaron los cultivos de M ϕ P de los pases 80 en adelante, en los cuales se confirmó la presencia del HRSV a nivel de proteínas virales, el mRNA del gen N, así como el estado de activación de los macrófagos a través de la determinación del óxido nítrico.

En la figura 1A se muestra la presencia del gen N del HRSV en tres diferentes pases de cultivos, durante todo el estudio se evaluó la presencia de proteínas virales con un anticuerpo policlonal comercial contra HRSV. Entre el 92 y 96 % de las células de los cultivos de M ϕ P presentaron el antígeno viral (Figura 1B) similares a lo reportado en trabajos publicados por el laboratorio [58], lo que sugiere que el cultivo de M ϕ P es estable en cuanto a la presencia del virus en los macrófagos.

Guerrero-Plata A. demostró que los M ϕ P tienen incrementada la fagocitosis mediada por Fc γ Rs así como, la expresión de los Fc γ RIIB/RIII comparado con M ϕ N, En la figura 2A observamos que la característica de incremento en la actividad fagocítica mediada por Fc γ Rs en los M ϕ P se conserva con respecto a los M ϕ N, por otro lado, la actividad fagocítica no opsonica de SRBC no difiere entre ambos cultivos, se ha reportado que la fagocitosis de partículas opsonizadas con anticuerpos es más eficiente que la de partículas sin opsonizadas, Sin embargo, en la figura 2A la diferencia entre la actividad fagocítica no opsonica y opsonica con la primera concentración de anticuerpo utilizado, no es significativa en los M ϕ N. Esto podría deberse a la concentración de anticuerpo utilizado para opsonizar, por lo que, se incrementó la concentración de anticuerpo, y lo que se observó fue un incremento en la actividad fagocítica en los

M ϕ N. Por otro lado, los M ϕ P con ambas concentraciones de anticuerpo, la actividad fagocítica está incrementada con respecto a la no opsonizada y a los M ϕ N. En cuanto a la expresión de los Fc γ RIIB/RIII, los M ϕ P también conservan el incremento reportado previamente (Figura 2B). Los resultados sugieren una correlación entre la concentración de Fc γ RIIB/RIII en la membrana del macrófago y la concentración de anticuerpos en la partícula opsonizada.

Durante la infección persistente con el HRSV, se ha demostrado que induce la expresión de citocinas [62], además se producen partículas y/o proteínas virales [58], tanto las citocinas como las partículas y/o proteínas virales presentes en el medio de cultivo podrían participar en la inducción de la expresión de los Fc γ RIIB/RIII. Para descartar este efecto, se estimuló a M ϕ N con sobrenadantes de los cultivos de M ϕ P (Figura 3), el resultado observado descartó que la expresión de los Fc γ RIIB/RIII este influenciado de forma autocrina y/o paracrina por el contenido del sobrenadante. A pesar de que en este se ha demostrado que los M ϕ P están produciendo IL-1 β , IL-6 [61], TNF α [63].

Otra posibilidad que podría explicar el incremento en los Fc γ RIIB/RIII en la membrana del macrófago M ϕ P, es una alteración en la internalización y/o reciclaje de los receptores, para descartar esta posibilidad se realizó ensayos de endocitosis de los receptores. Los resultados observados en la figura 4 mostraron que la velocidad de internalización de los Fc γ RIIB/RIII en ambos cultivos es diferente. Sin embargo, la disminución de la señal entre el tiempo inicial y el tiempo final, fue similar en M ϕ N y M ϕ P. Además, el hecho que la actividad fagocítica muestre un incremento en los M ϕ P sugiere que los receptores son funcionales. En contraste, se ha reportado en un modelo de infección por el virus de la hepatitis C, donde se observó que la proteína NS5A interfiere con la internalización y señalización del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) [64].

Por otro lado en la figura 5 podemos observar que el incremento de los Fc γ RIIB/RIII no solo es a nivel de membrana celular sino también en contenido total, Se ha observado en otras infecciones virales persistentes la inducción de receptores de membrana.

Los resultados anteriores sugieren que el incremento en la expresión de los Fc γ RIIB/RIII se debe a la infección persistente por el HRSV y no a factores solubles presentes en el medio de cultivo o a una alteración en el reciclaje de los receptores.

En los macrófagos murinos se han descrito cuatro isoformas de Fc γ Rs con diferentes actividades determinadas por la isoforma del receptor así como por el isotipo del anticuerpo que preferentemente reconocen [43,44], los resultados mostrados anteriormente se realizaron con un anticuerpo monoclonal que reconoce tanto al Fc γ RIIB como al Fc γ RIII [47] y debido a que estos receptores tienen actividades antagónicas (inhibitorias y activadoras respectivamente), decidimos evaluar de forma individual la proteína de Fc γ RI, Fc γ RIIB, Fc γ RIII. El Fc γ RIV no se determinó por no existir un anticuerpo comercial. Y por otro lado, cuantificar la expresión del mRNA de los cuatro Fc γ Rs.

Encontramos que la expresión en proteína de cada uno de los Fc γ Rs está regulada en forma distinta, el Fc γ RIIB (inhibidor) y el Fc γ RIII (activador) están incrementados en los M ϕ P comparado con los M ϕ N, en cambio no encontramos diferencias el Fc γ RI entre ambos cultivos (Figura 6A). Mientras que, la expresión de los mRNA de las cuatro isoformas de los Fc γ Rs, observamos un incremento la expresión de Fc γ RI, Fc γ RIIB y Fc γ RIII en los M ϕ P comparada con los M ϕ N (Figura 6A y 6B). La expresión de Fc γ RIV fue similar en ambos cultivos (Figura 7). El incremento en el mRNA del Fc γ RIIB y del Fc γ RIII correlaciona con el incremento en proteína de estos dos receptores, no así el del Fc γ RI el cual está más expresado en el M ϕ P.

Estos resultados sugieren que la persistencia del virus en el macrófago altera la expresión en ambos niveles, transcripcional y/o post-transcripcional. Esta observación coincide con lo reportado para otras proteínas en el mismo modelo de persistencia viral, como la encontrada en ICAM, la cual es regulada post-transcripcionalmente [65].

Con los resultados anteriores planteamos la hipótesis, que el efecto de la persistencia del HRSV en el incremento en la expresión de los mRNA de los Fc γ Rs pudiera estar relacionada con la participación de factores de transcripción como PU.1

el cual se ha descrito está involucrado en la expresión de al menos tres de los cuatro FcγRs [49].

La búsqueda *in silico* de factores de transcripción que regulan a la expresión de los genes de los FcγRs mostró que el factor de transcripción PU.1 tiene dominios de unión a secuencias de nucleótidos conservadas cercanos a los promotores de los cuatro genes que codifican para los FcγRs (Tabla 1). Algunos trabajos han reportado que otros factores de transcripción pueden contribuir a la regulación la expresión de los genes de los FcγRs de manera independiente, lo que coincide con lo encontrado en análisis *in silico*.

Con el resultado del análisis *in silico*, se evaluó la presencia de PU.1 en los cultivos de MφN y MφP a nivel de mRNA y proteína, el resultado mostró que los niveles de expresión tanto de mRNA como de proteína son similares en ambos cultivos (Figura 8^a y 8B), Por otro lado, evaluamos la activación de PU.1, se puede observar que la concentración de PU.1 en el núcleo fue similar en ambos cultivos (Figura 8C), esto sugiere que el incremento observado en la expresión de los mRNA de FcγRI, FcγRIIB y FcγRIII no está relacionado con un incremento en la expresión de PU.1 ni activación de PU.1 en los MφP.

Por lo tanto, evaluamos el efecto de apagar PU.1 sobre la expresión de los FcγRs, Se realizaron transfecciones con siRNA-PU.1 específico y siRNA-irrelevante (como control). Los resultados mostraron que la proteína de PU.1 disminuye en el cultivo de MφN pero en el cultivo de MφP comparado con el control (Figura 9).

Como se esperaba al apagar la expresión de PU.1 en los MφN la expresión de los mRNA de los FcγRs disminuye, mientras que en los MφP no se observa disminución en la expresión de los FcγRS, en la figura 10 podemos observar que los niveles de expresión de las cuatro isoformas de los FcγRs disminuye en los MφN de forma diferente, siendo el efecto más evidente sobre los expresión de los FcγRIIB y FcγRIII mientras que el FcγRI la disminución no es diferente. Esto puede tener su explicación en el hecho de que PU.1 no es el único factor de transcripción involucrado en la expresión de los FcγRs y otros factores de transcripción podrían estar participando como se ha

demostrado en otros trabajos. Por ejemplo, para inducir la expresión del Fc γ RI se demostró que se requiere la participación de NF- κ B [66].

Considerando la posibilidad que el siRNA-PU.1 no hubiera tenido ningún efecto sobre el mRNA de PU.1 en los M ϕ P, cuantificamos los niveles de expresión en ambos cultivos y encontramos que hay disminución en M ϕ N y M ϕ P (Figura 11), lo que sugiere que la regulación de PU.1 es a nivel de proteína.

El resultado anterior sugiere una alteración en la vida media de PU.1, observamos ambos cultivo se mantuvieron en presencia de ciclohexamida y encontramos que PU.1 tiene una mayor resistencia a la degradación en los M ϕ P comparado con los M ϕ N, y este efecto es específico dado que la proteína GAPDH se disminuye de forma similar en ambos cultivos (Figura 12). Este resultado muestra una nueva forma de regulación de la expresión de genes *in vitro* por el HRSV.

En resumen, la persistencia viral o cambios observados en la expresión de los Fc γ Rs en los M ϕ P podrían afectar o estar relacionadas con alteraciones en las funciones efectoras del macrófago, tal como se demostró con el incremento de la actividad fagocítica, así también, los Fc γ Rs en los M ϕ P, esto podría contribuir a una exacerbada liberación de citocinas proinflamatorias, además se podrían presentar alteraciones en la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC). Por otro lado, otra consecuencia que pudiera tener el incremento en los Fc γ Rs es que se ha demostrado que el HRSV puede infectar macrófagos a través de anticuerpos facilitadores (ADE) [67,68].

El efecto de la persistencia del HRSV en la modulación de la vida media del factor de transcripción PU.1, puede estar relacionado además con otras alteraciones, ya que como se mencionó anteriormente, PU.1 se ha relacionado con la expresión de otras moléculas como las integrinas involucradas en la migración celular, así como, en la sinapsis inmunológica o presentación de antígeno, por lo que es importante estudiar este nuevo mecanismo de modulación de factor de transcripción por HRSV.

Por último, es importante estudiar los efectos de persistencia del HRSV en células humanas con el fin de evaluar la posible importancia de estos resultados en la

enfermedad humana, por las diferencias que se han reportado en las células inmunes entre ratones y humanos [37,69,70].

VIII CONCLUSIONES

En la infección persistente con HRSV, el aumento en la fagocitosis mediada por Fc γ Rs se relaciona con el incremento de la expresión de los Fc γ Rs. Este aumento se asocia con una mayor estabilidad del factor de transcripción PU.1 el cual participa en la expresión de los Fc γ Rs

Conclusiones puntuales

1. El aumento en la expresión de los Fc γ RIIB/RIII y la fagocitosis mediada por Fc γ Rs se conservan después de más de 80 pases de los M ϕ P.
2. El aumento de la expresión en las proteínas de los Fc γ RIIB y Fc γ RIII y en mRNA de Fc γ RI, Fc γ RIIB y Fc γ RIII no se debe a factores solubles (citoquinas) o productos virales liberados por las células infectadas, ni a una alteración en la tasa de internalización y/o reciclaje de los Fc γ RIIB/RIII.
3. La persistencia del HRSV en las células infectadas no afecta la expresión del factor de transcripción PU.1 (proteína y/o mRNA), así como tampoco la translocación al núcleo de la célula.
- 4 La persistencia del HRSV en el macrófago incrementa la vida media de PU.1.

IX PERSPECTIVAS

- Evaluar posibles cambios postraduccionales en PU.1 como:
Glicosilaciones
Fosforilaciones

- Estudiar posibles interacciones proteína-proteína
PU.1 y otras proteínas celulares
PU.1 y alguna proteína viral

X. BIBLIOGRAFIA

- 1 Kent JR, Kang W, Miller CG, Fraser NW: **Herpes simplex virus latency-associated transcript gene function.** J Neurovirol 2003;9:285-290.
- 2 Griffin DE, Lin WH, Pan CH: **Measles virus, immune control, and persistence.** FEMS Microbiol Rev 2012;36:649-662.
- 3 Battistini A, Sgarbanti M: **HIV-1 latency: An update of molecular mechanisms and therapeutic strategies.** Viruses 2014;6:1715-1758.
- 4 Steiner I, Benninger F: **Update on herpes virus infections of the nervous system.** Curr Neurol Neurosci Rep 2013;13:414.
- 5 Thorley-Lawson DA, Hawkins JB, Tracy SI, Shapiro M: **The pathogenesis of Epstein-barr virus persistent infection.** Curr Opin Virol 2013;3:227-232.
- 6 Kedzierska K, Crowe SM: **The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection.** Curr Med Chem 2002;9:1893-1903.
- 7 Avanzi S, Alvisi G, Ripalti A: **How virus persistence can initiate the tumorigenesis process.** World J Virol 2013;2:102-109.
- 8 Lambert DM, Pons MW, Mbuy GN, Dorsch-Hasler K: **Nucleic acids of respiratory syncytial virus.** J Virol 1980;36:837-846.
- 9 Collins PL, Graham BS: **Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis.** J Virol 2008;82:2040-2055.
- 10 Collins PL, Huang YT, Wertz GW: **Identification of a tenth mRNA of respiratory syncytial virus and assignment of polypeptides to the 10 viral genes.** J Virol 1984;49:572-578.
- 11 Grosfeld H, Hill MG, Collins PL: **RNA replication by respiratory syncytial virus (RSV) is directed by the N, P, and L proteins; transcription also occurs under these conditions but requires rsv superinfection for efficient synthesis of full-length mrna.** J Virol 1995;69:5677-5686.
- 12 Collins PL: **Respiratory syncytial virus and metapneumovirus;** in Crowe JEJ (ed). Fields Virology, D.M. Knipe and P. M. Howley, Editors., Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA. P. , 2007, pp 1601-1646.
- 13 Graham BS, Rutigliano JA, Johnson TR: **Respiratory syncytial virus immunobiology and pathogenesis.** Virology 2002;297:1-7.
- 14 Falsey AR: **Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults.** Exp Lung Res 2005;31 Suppl 1:77.
- 15 Han LL, Alexander JP, Anderson LJ: **Respiratory syncytial virus pneumonia among the elderly: An assessment of disease burden.** J Infect Dis 1999;179:25-30.
- 16 Chen CJ, Jeng MJ, Yuan HC, Wu KG, Soong WJ, Hwang B: **Epidemiology of Respiratory syncytial virus in children with lower respiratory tract infection.** Acta Paediatr Taiwan 2005;46:72-76.
- 17 Boeck KD: **Respiratory syncytial virus bronchiolitis: Clinical aspects and epidemiology.** Monaldi Arch Chest Dis 1996;51:210-213.
- 18 Openshaw PJ: **Immunopathological mechanisms in Respiratory syncytial virus disease.** Springer Semin Immunopathol 1995;17:187-201.
- 19 Falsey AR, Walsh EE: **Respiratory syncytial virus infection in elderly adults.** Drugs Aging 2005;22:577-587.
- 20 Mills BG, Singer FR, Weiner LP, Holst PA: **Immunohistological demonstration of Respiratory syncytial virus antigens in paget disease of bone.** Proc Natl Acad Sci U S A 1981;78:1209-1213.

- 21 Mills BG, Singer FR, Weiner LP, Suffin SC, Stabile E, Holst P: **Evidence for both respiratory syncytial virus and measles virus antigens in the osteoclasts of patients with paget's disease of bone.** Clin Orthop Relat Res 1984;303-311.
- 22 Cubie HA, Duncan LA, Marshall LA, Smith NM: **Detection of Respiratory syncytial virus nucleic acid in archival postmortem tissue from infants.** Pediatr Pathol Lab Med 1997;17:927-938.
- 23 Domurat F, Roberts NJ, Walsh EE, Dagan R: **Respiratory syncytial virus infection of human mononuclear leukocytes in vitro and in vivo.** J Infect Dis 1985;152:895-902.
- 24 Falsey AR, Formica MA, Hennessey PA, Criddle MM, Sullender WM, Walsh EE: **Detection of Respiratory syncytial virus in adults with chronic obstructive pulmonary disease.** Am J Respir Crit Care Med 2006;173:639-643.
- 25 Hegele RG, Hayashi S, Bramley AM, Hogg JC: **Persistence of Respiratory syncytial virus genome and protein after acute bronchiolitis in guinea pigs.** Chest 1994;105:1848-1854.
- 26 Streckert HJ, Philippou S, Riedel F: **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 1996;141:401-410.
- 27 Dakhama A, Vitalis TZ, Hegele RG: **Persistence of respiratory syncytial virus (RSV) infection and development of RSV-specific IgG1 response in a guinea-pig model of acute bronchiolitis.** Eur Respir J 1997;10:20-26.
- 28 Mejias A, Chavez-Bueno S, Gomez AM, Somers C, Estripeaut D, Torres JP, Jafri HS, Ramilo O: **Respiratory syncytial virus persistence: Evidence in the mouse model.** Pediatr Infect Dis J 2008;27:S60-62.
- 29 Baldridge P, Senterfit LB: **Persistent infection of cells in culture by Respiratory syncytial virus.** Proc Soc Exp Biol Med 1976;151:684-688.
- 30 Bangham CR, McMichael AJ: **Specific human cytotoxic t cells recognize B-cell lines persistently infected with Respiratory syncytial virus.** Proc Natl Acad Sci U S A 1986;83:9183-9187.
- 31 Iankevich OD, Dreĭzin RS: **Chronic infection of hela cells with Respiratory syncytial virus.** Vopr Virusol 1977:142-147.
- 32 Fernie BF, Ford EC, Gerin JL: **The development of Balb/c cells persistently infected with Respiratory syncytial virus: Presence of ribonucleoprotein on the cell surface.** Proc Soc Exp Biol Med 1981;167:83-86.
- 33 Valarcher JF, Bourhy H, Lavenu A, Bourges-Abella N, Roth M, Andreoletti O, Ave P, Schelcher F: **Persistent infection of B lymphocytes by bovine Respiratory syncytial virus.** Virology 2001;291:55-67.
- 34 Bossert B, Conzelmann KK: **Respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural (NS) proteins as host range determinants: A chimeric bovine RSV with NS genes from human RSV is attenuated in interferon-competent bovine cells.** J Virol 2002;76:4287-4293.
- 35 Collins PL, Melero JA: **Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: Still crazy after all these years.** Virus Res 2011;162:80-99.
- 36 Crowe JE: **Host responses to Respiratory virus infection and immunization.** Curr Top Microbiol Immunol 1999;236:191-214.
- 37 Openshaw PJ: **Immunity and immunopathology to Respiratory syncytial virus.** The mouse model. Am J Respir Crit Care Med 1995;152:S59-62.
- 38 Openshaw PJ: **Antiviral immune responses and lung inflammation after Respiratory syncytial virus infection.** Proc Am Thorac Soc 2005;2:121-125.

- 39 Merolla R, Rebert NA, Tsiviste PT, Hoffmann SP, Panuska JR: **Respiratory syncytial virus replication in human lung epithelial cells: Inhibition by Tumor necrosis factor alpha and Interferon beta.** Am J Respir Crit Care Med 1995;152:1358-1366.
- 40 Midulla F, Villani A, Panuska JR, Dab I, Kolls JK, Merolla R, Ronchetti R: **Respiratory syncytial virus lung infection in infants: Immunoregulatory role of infected alveolar macrophages.** J Infect Dis 1993;168:1515-1519.
- 41 Panuska JR, Cirino NM, Midulla F, Despot JE, McFadden ER, Huang YT: **Productive infection of isolated human alveolar macrophages by Respiratory syncytial virus.** J Clin Invest 1990;86:113-119.
- 42 Biswas SK, Chittezhath M, Shalova IN, Lim JY: **Macrophage polarization and plasticity in health and disease.** Immunol Res 2012;53:11-24.
- 43 Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV: **FcγRIV: A novel FcR with distinct IgG subclass specificity.** Immunity 2005;23:41-51.
- 44 Gerber JS, Mosser DM: **Stimulatory and inhibitory signals originating from the macrophage Fcγ receptors.** Microbes Infect 2001;3:131-139.
- 45 Nimmerjahn F, Ravetch JV: **Fc-receptors as regulators of immunity.** Adv Immunol 2007;96:179-204.
- 46 Lux A, Aschermann S, Biburger M, Nimmerjahn F: **The pro and anti-inflammatory activities of immunoglobulin G.** Ann Rheum Dis 2010;69 Suppl 1:i92-96.
- 47 Nimmerjahn F, Ravetch JV: **Fcγ receptors: Old friends and new family members.** Immunity 2006;24:19-28.
- 48 Brooks D, Ravetch JV: **Fc receptor signaling.** Adv Exp Med Biol 1994;365:185-195.
- 49 Berclaz PY, Shibata Y, Whitsett JA, Trapnell BC: **GM-CSF, via PU.1, regulates alveolar macrophage Fcγ R-mediated phagocytosis and the IL-18/IFN-γ-mediated molecular connection between innate and adaptive immunity in the lung.** Blood 2002;100:4193-4200.
- 50 Jabeen R, Chang HC, Goswami R, Nutt SL, Kaplan MH: **The transcription factor PU.1 regulates γδ T cell homeostasis.** PLoS One 2011;6:e22189.
- 51 Lloberas J, Soler C, Celada A: **The key role of PU.1/Spi-1 in B cells, myeloid cells and macrophages.** Immunol Today 1999;20:184-189.
- 52 Moulton KS, Semple K, Wu H, Glass CK: **Cell-specific expression of the macrophage scavenger receptor gene is dependent on PU.1 and a composite Ap-1/Ets motif.** Mol Cell Biol 1994;14:4408-4418.
- 53 Rosmarin AG, Caprio D, Levy R, Simkevich C: **CD18 (beta 2 leukocyte integrin) promoter requires PU.1 transcription factor for myeloid activity.** Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92:801-805.
- 54 Ito T, Nishiyama C, Nakano N, Nishiyama M, Usui Y, Takeda K, Kanada S, Fukuyama K, Akiba H, Tokura T, Hara M, Tsuboi R, Ogawa H, Okumura K: **Roles of PU.1 in monocyte- and mast cell-specific gene regulation: PU.1 transactivates CIITA pIV in cooperation with IFN-γ.** Int Immunol 2009;21:803-816.
- 55 Halenius A, Momburg F, Reinhard H, Bauer D, Lobigs M, Hengel H: **Physical and functional interactions of the cytomegalovirus US6 glycoprotein with the transporter associated with antigen processing.** J Biol Chem 2006;281:5383-5390.
- 56 Kedzierska K, Azzam R, Ellery P, Mak J, Jaworowski A, Crowe SM: **Defective phagocytosis by human monocyte/macrophages following HIV-1 infection:**

- Underlying mechanisms and modulation by adjunctive cytokine therapy.** J Clin Virol 2003;26:247-263.
- 57 Leeansyah E, Wines BD, Crowe SM, Jaworowski A: **The mechanism underlying defective Fcγ receptor-mediated phagocytosis by HIV-1-infected human monocyte-derived macrophages.** J Immunol 2007;178:1096-1104.
- 58 Sarmiento RE, Tirado R, Gomez B: **Characteristics of a Respiratory syncytial virus persistently infected macrophage-like culture.** Virus Res 2002;84:45-58.
- 59 Carreño LJ, Pacheco R, Gutierrez MA, Jacobelli S, Kalergis AM: **Disease activity in systemic lupus erythematosus is associated with an altered expression of low-affinity Fc γ receptors and costimulatory molecules on dendritic cells.** Immunology 2009;128:334-341.
- 60 Jovanovic V, Dai X, Lim YT, Kemeny DM, MacAry PA: **Fc γ receptor biology and systemic lupus erythematosus.** Int J Rheum Dis 2009;12:293-298.
- 61 Guerrero-Plata A, Ortega E, Gomez B: **Persistence of respiratory syncytial virus in macrophages alters phagocytosis and pro-inflammatory cytokine production.** Viral Immunol 2001;14:19-30.
- 62 Tirado R, Ortega A, Sarmiento RE, Gómez B: **Interleukin-8 mRNA synthesis and protein secretion are continuously up-regulated by Respiratory syncytial virus persistently infected cells.** Cell Immunol 2005;233:61-71.
- 63 Nakamura-Lopez Y, Villegas-Sepulveda N, Sarmiento-Silva RE, Gomez B: **Intrinsic apoptotic pathway is subverted in mouse macrophages persistently infected by RSV.** Virus Res 2011;158:98-107.
- 64 Mankouri J, Griffin S, Harris M: **The hepatitis C virus non-structural protein NS5A alters the trafficking profile of the epidermal growth factor receptor.** Traffic 2008;9:1497-1509.
- 65 Arrevillaga G, Gaona J, Sanchez C, Rosales V, Gomez B: **Respiratory syncytial virus persistence in macrophages downregulates intercellular adhesion molecule-1 expression and reduces adhesion of non-typeable Haemophilus influenzae.** Intervirology 2012
- 66 Kårehed K, Dimberg A, Dahl S, Nilsson K, Oberg F: **IFN-γ-induced upregulation of Fcγ receptor-I during activation of monocytic cells requires the PKR and NFκB pathways.** Mol Immunol 2007;44:615-624.
- 67 Osiowy C, Horne D, Anderson R: **Antibody-dependent enhancement of Respiratory syncytial virus infection by sera from young infants.** Clin Diagn Lab Immunol 1994;1:670-677.
- 68 Gimenez HB, Chisholm S, Dornan J, Cash P: **Neutralizing and enhancing activities of human respiratory syncytial virus-specific antibodies.** Clin Diagn Lab Immunol 1996;3:280-286.
- 69 Mestas J, Hughes CC: **Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology.** J Immunol 2004;172:2731-2738.
- 70 Openshaw PJ: **The mouse model of Respiratory syncytial virus disease.** Curr Top Microbiol Immunol 2013;372:359-369.

Article

Respiratory Syncytial Virus Persistence in Macrophages Upregulates Fcγ Receptors Expression

Jorge Gaona ¹, Carlos Santiago-Olivares ¹, Enrique Ortega ² and Beatriz Gómez ^{1,*}

¹ Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Ciudad Universitaria, D.F. Mexico C.P. 04510, Mexico; E-Mails: jgaber2007@gmail.com (J.G.); carlosantiagolivares@yahoo.com.mx (C.S.-O.)

² Department of Immunology, Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Ciudad Universitaria, D.F. México C.P. 04510, Mexico; E-Mail: ortsoto@unam.mx

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: begomez@unam.mx; Tel.: +52-55-5623-2469; Fax: +52-55-5623-2382.

Received: 14 October 2013; in revised form: 29 November 2013 / Accepted: 15 January 2014 / Published: 6 February 2014

Abstract: Viruses can persist in differentiated cells (*i.e.*, macrophages) over long periods of time, altering host cells functions but not inducing their death. We had previously reported that, in early passages (14–40) of a murine macrophage-like cell line persistently infected with respiratory syncytial virus (RSV) (MφP), FcγR-mediated phagocytosis and expression of FcγRIIB/RIII on the cell membrane were increased with respect to mock-infected macrophages (MφN). In this work, we explored the mechanism underlying such effects. Increases in FcγR expression and FcγR-mediated phagocytosis are preserved after more than 87 passages of the persistently infected culture. We analyzed the expression of FcγR isoforms at both mRNA and protein levels, and found out that RSV persistence distinctly affects the expression of FcγR isoforms. We also observed that the increase in FcγRs expression results neither from soluble factors (cytokines) or viral products released by the infected cells, nor from an increase in the rate of FcγR internalization. Our results suggest that RSV persistence in macrophages induce intracellular effects that have an impact on FcγRs gene expression at both mRNA and protein levels, and that the characteristics of RSV persistence were preserved for over 87 passages.

Keywords: RSV persistence; macrophages; FcγRs expression

1. Introduction

Viruses persisting in differentiated cells—*i.e.*, macrophages (M ϕ s)—can regulate the expression of both their own genes and those of the host cell in order to achieve residence in a non-lytic state, besides selectively affecting functions of the infected cell without destroying it [1]. M ϕ s play very important roles in innate and adaptive immune responses since they are involved in various processes, such as phagocytosis, antigen presentation, and cytokine production [2,3]. M ϕ s express on their membrane receptors for the Fc region of IgG antibodies (Fc γ Rs). Alterations of Fc γ R-mediated phagocytosis *in vitro* and *in vivo* have been reported in M ϕ s persistently infected with an RNA virus (HIV-1). This effect is caused by a decreased synthesis of the gamma chain of receptors, suggesting that viral persistence alters gene expression in the host cell [4,5]. Changes in host cell-gene expression resulting from persistence of respiratory syncytial virus (RSV), another RNA virus, have also been reported: in the human epithelial cell line HEp-2, viral persistence alters the expression of host genes involved in cell survival and chemokine production [6]. Also, we had previously shown that, in a macrophage-like murine cell line persistently infected with RSV (M ϕ P) [7], Fc γ Rs expression, Fc γ R-mediated phagocytosis, and cytokines production are altered [8].

Cell-surface Fc γ Rs comprise a family of integral membrane glycoproteins expressed by most leukocytes. Murine M ϕ s express four different Fc γ Rs: while Fc γ RI, Fc γ RIII, and Fc γ RIV are activatory, Fc γ RIIB mediates the inhibition of Fc γ R-mediated signals [9,10]. Aggregation of Fc γ R by antigen-antibody complexes or IgG-opsonized particles triggers several effects or functions, including phagocytosis [11]. Fc γ Rs have also been shown to participate in both the afferent phase of immune responses and immune system homeostasis [12,13].

RSV, a paramyxovirus of the genus *Pneumovirus*, is prevalent and highly infectious [14]. Worldwide, it is a very important pathogen that causes frequent acute upper and lower respiratory tract infections, especially among infants and young children [15,16]. RSV is also a paramount cause of morbidity and mortality in the elderly and in immunocompromised patients [17], constituting the second leading cause of death due to viral infections in elderly individuals [18]. While seasonal RSV outbreaks occur each year globally, the RSV virus can be detected only during the winter epidemic season [14,19]. Young children who have recovered from severe RSV bronchiolitis often develop chronic and recurrent respiratory problems [20,21]. The link between RSV infection, the development of sequelae (wheezing, asthma) [22,23] and chronic obstructive pulmonary disease has been clearly established in several well-controlled prospective epidemiological studies [24,25], suggesting that RSV persists in individuals with this condition [26]. The delayed effects of severe RSV disease might be partially explained by viral persistence, which may cause chronic inflammation [26,27] and/or change cell genome expression patterns.

Persistent infection with RSV occurs in patients with T-cell immunodeficiencies, and establishing persistent infections in tissue culture of either epithelial or hematopoietic cells (e.g., HEp-2 [6] or M ϕ [7]) is easy. RSV persistence in animal models has been reported in infected nude mice [28–30], which develop chronic airway function abnormalities [31–33]. Persistence of bovine respiratory syncytial virus, which is closely related to RSV, has also been demonstrated in B cells from naturally infected cows [34]. Although viral persistence in humans has not been clearly proven, circumstantial evidence suggests its occurrence. Immunohistological observations indicate the presence of RSV antigens in

osteoclasts and in multinucleated cells formed in bone marrow cultures from patients with Paget's disease [35]. In addition, RSV nucleic acid was detected in archival postmortem lung tissue from infants who had died during the summertime, without apparent clinical disease having been reported, suggesting that the virus might persist in lungs after an acute infection [36]. Since no animal reservoir of RSV has been found, persistent human infections by RSV may be implicated, at least partially, in preserving the virus during inter-epidemic periods. Despite the evidence that RSV is able to establish persistent infections in various cell types, and the possible relationship between RSV persistence and human disease [23–26,37], few studies have investigated the effects that persistent infection by this virus can have on the functions of infected cells.

We have previously reported that persistent infection by RSV in a murine macrophage-like cell line (M ϕ P) alters the expression of Fc γ RIIB/RIII on the cell membrane and Fc γ Rs-mediated phagocytosis [8]. In this work, we explored the mechanism underlying such effects, studying the effect of RSV persistence on the expression of the different Fc γ R isoforms at both mRNA and protein level, and determining whether the effect is caused by soluble factors (cytokines) or viral products released by infected cells.

2. Results and Discussion

2.1. Results

2.1.1. Persistent Infection by RSV Increases Fc γ R-mediated Phagocytosis and Fc γ RIIB/RIII Expression even at High Passage Numbers

Throughout this paper, we refer to M ϕ P as cells of the murine macrophage-like cell line (P388D1) persistently infected with RSV, and to M ϕ N as mock-infected P388D1 cells. Persistent infection in the M ϕ P cultures used in these experiments was confirmed by the presence of mRNA for the N gene and the expression of viral antigens in 92%–96% of cells (Figure 1). Viral persistence parameters (infective units in culture supernatants and % of RSV antigen-positive cells) did not differ significantly from earlier reported values [7].

Previously, we had reported that in M ϕ P early passages (14–40), Fc γ Rs-mediated phagocytosis and plasma membrane expression of Fc γ RIIB/RIII increase in comparison with non-infected M ϕ N [8]. In this work, we evaluated whether the same characteristics were present in M ϕ P later culture passages (72 to 87). Phagocytosis and expression of Fc γ RIIB/RIII were determined as previously described [8]. We found out that, after more than 70–80 passages, M ϕ P still showed higher levels of phagocytic activity and cell surface Fc γ RIIB/RIII expression than M ϕ N cells (Figure 2). As expected, phagocytic activity was dependent on the IgG concentration used for opsonization, and the phagocytosis of IgG-opsonized sheep red blood cells (SRBCs) by M ϕ P was always significantly higher (usually by a factor of 2) than that of M ϕ N. It is noteworthy that no differences were observed in the phagocytosis of non-opsonized erythrocytes, which suggests that the effect is characteristic of Fc γ R-mediated phagocytosis (Figure 2A). Increases in the expression of cell surface Fc γ RIIB/RIII in M ϕ P (50%–72%) (Figure 2B) was similar to those previously reported for early culture passages [8].

Figure 1. RSV persistence in M ϕ P. **(A)** Presence of mRNA of the N gene in M ϕ P. Agarose/EtBr gel (2%) electrophoresis of RT-PCR products. Total RNA from three different passages of M ϕ P (72, 83 and 87) or M ϕ N cells was harvested and converted to cDNA. DNA primers for the N gene were used to amplify a segment of 1,187 bp by PCR. As control, a segment of RNA for GAPDH was amplified; **(B)** Expression of RSV antigens on M ϕ P membrane. M ϕ N (empty histogram) or M ϕ P (gray histogram) were stained with FITC-labeled anti RSV antibodies and analyzed by flow cytometry. Histogram is representative of several experiments with different passages of M ϕ P and M ϕ N during the course of these experiments.

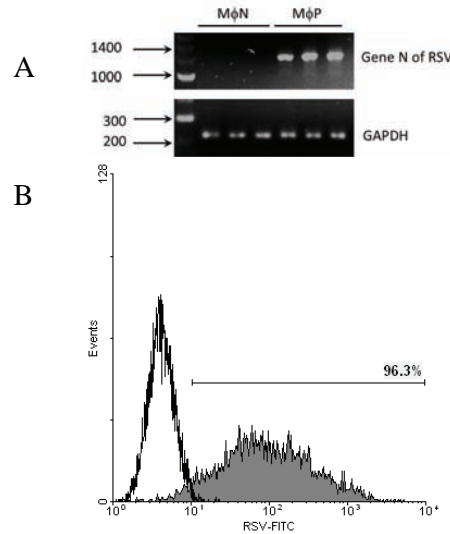
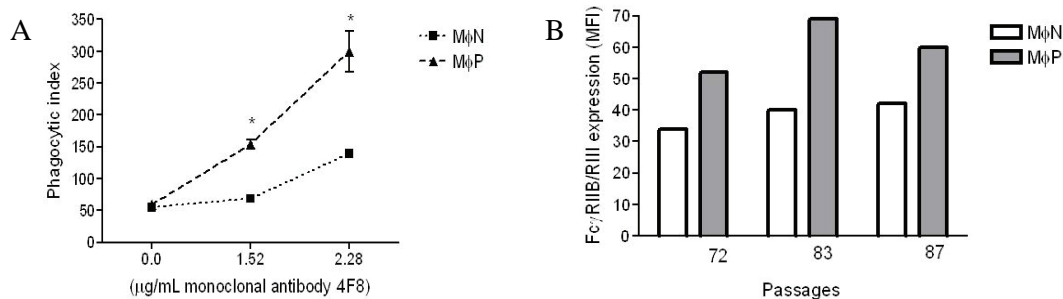


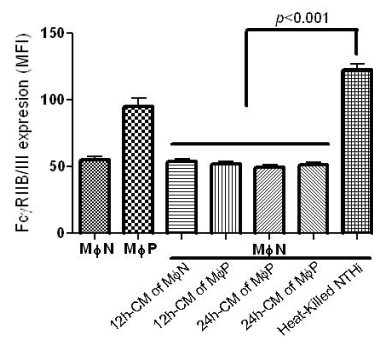
Figure 2. Fc γ RIIB/RIII mediated phagocytic activity and expression of Fc γ RIIB/RIII receptors in M ϕ P and M ϕ N. **(A)** Phagocytosis of IgG-opsonized and non-opsonized SRBC by M ϕ N and M ϕ P. Cells were incubated with 2,4,6-trinitrophenyl-labeled SRBC opsonized with the indicated concentrations of the anti-2,4-dinitrophenol (anti-DNP) IgG antibody 4F8. Results are expressed as mean \pm 1 SD from three independent experiments passages of M ϕ N and passages 72, 83 and 87 of M ϕ P (* $p < 0.05$); **(B)** Expression of Fc γ RIIB/RIII in the above mentioned passages of M ϕ N or M ϕ P cells. Cell-membrane Fc γ RIIB/RIII were stained with specific monoclonal antibody 2.4G2 and secondary FITC-labeled F(ab')₂ fragments of anti-rat antibodies, and analyzed by flow cytometry. Each individual bar represents the MFI of 10,000 cells. Statistical analysis of the average of the three different passages of M ϕ N and M ϕ P (38.67 ± 2.4 vs. 60.33 ± 4.9 , respectively) indicates a significant difference in Fc γ RIIB/RIII expression ($p = 0.016$).



2.1.2. Increase in Fc γ RIIB/RIII Cell Membrane Expression Is Not Mediated by Soluble Factors

Persistence of RSV in macrophages could induce the release of extracellular factors (e.g., cytokines, viral particles, viral products), which would act in a paracrine-like way in order to induce the increase in Fc γ RIIB/RIII expression. Seeking to investigate whether the increased expression of Fc γ RIIB/RIII was produced by factors released by persistently infected M ϕ P, we treated M ϕ N cells with a conditioned medium obtained from M ϕ N or M ϕ P cultures after an incubation period of 12 h or 24 h. Expression levels of Fc γ RIIB/RIII were determined by flow cytometry. Mean fluorescence intensity (MFI) of Fc γ RIIB/RIII expression by M ϕ N was not significantly altered when M ϕ N were incubated for 24 h with supernatants from M ϕ N or M ϕ P (Figure 3). So as to verify that M ϕ N are able to increase the expression of Fc γ RIIB/RIII in response to a stimulus already known to increase the expression of these receptors [38], M ϕ N were incubated with heat-killed NHTi, which induced a significant increase in Fc γ R expression as compared to cells treated with conditioned medium (Figure 3). This suggests that the M ϕ N cell line is able to respond to an activating stimulus. These results show that the increase in the expression of Fc γ RIIB/RIII induced by RSV persistence is not mediated by extracellular factors released by persistently infected cells.

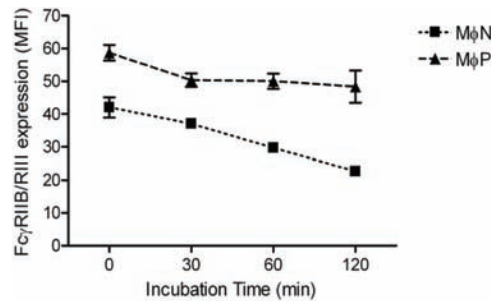
Figure 3. Fc γ RIIB/RIII expression in M ϕ N after treatment with M ϕ N or M ϕ P conditioned medium (CM). M ϕ N were treated with either 12 h- or 24 h-CM from M ϕ N or M ϕ P, or with heat-killed NHTi as control (see Materials and Methods for details). After 24 h, Fc γ RIIB/RIII was analyzed by flow cytometry. Results are expressed as mean \pm 1 SD of mean fluorescence intensity in three independent experiments.



2.1.3. RSV Persistence does not Affect Fc γ RIIB/RIII Endocytosis

In order to determine whether the increase in membrane Fc γ RIIB/RIII was due to impaired receptor endocytosis, we measured the rate of Fc γ RIIB/RIII internalization as described in Materials and Methods. We found similar Fc γ R internalization kinetics in both M ϕ N and M ϕ P. Average decreases in MFI at 120 min were 14.82 and 15.79 units for M ϕ N and M ϕ P, respectively, suggesting that Fc γ RIIB/RIII receptors endocytosis is not significantly altered by RSV persistence (Figure 4).

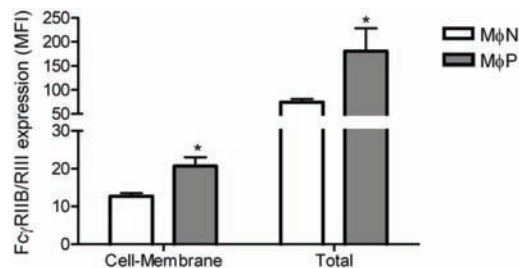
Figure 4. Internalization of Fc γ RIIB/RIII in M ϕ N and M ϕ P. Internalization kinetics of mAb 2.4G2-Fc γ RIIB/RIII complexes was monitored by flow cytometry during 120 min, as described in Materials and Methods. Results are expressed as the mean \pm 1 SD from three independent experiments. No significant difference was observed between M ϕ N and M ϕ P in the net amount of internalized mAb 2.4G2-Fc γ RIIB/RIII complexes.



2.1.4. Intracellular Levels of Fc γ RIIB/RIII Proteins Are Increased in M ϕ P

In order to investigate whether the increase of Fc γ RIIB/RIII expression on the membrane of M ϕ Ps was associated with increased receptor synthesis, we determined the total amount of receptor protein (membrane and intracellular) in the cells using flow cytometry. We found out that M ϕ Ps have more Fc γ RIIB/RIII protein than M ϕ Ns, both on the cell surface and intracellularly (Figure 5). These results suggest that viral persistence induces the upregulation of Fc γ RIIB/RIII synthesis.

Figure 5. Total Fc γ RIIB/RIII protein in M ϕ N and M ϕ P. Cell-membrane and total Fc γ RIIB/RIII protein content were determined in non-permeabilized or permeabilized M ϕ N and M ϕ P cells. Fc γ RIIB/RIII expression was evaluated with 2.4G2 monoclonal antibody and analyzed by flow cytometry. Results are expressed as mean \pm 1 SD from three independent experiments, using different passages of M ϕ N and M ϕ P.* indicates $p < 0.05$.

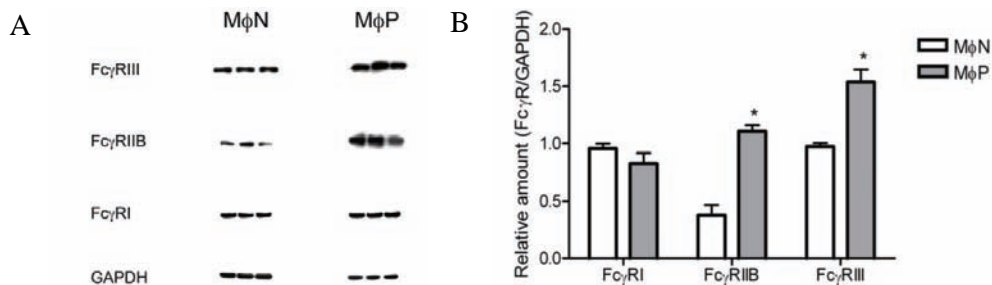


2.1.5. Membrane Expression of Fc γ RIIB and Fc γ RIII, but Not of Fc γ RI, Is Increased in RSV Persistently Infected Cells

Four different types of murine Fc γ receptors have been described (RI to RIV). In our initial work we measured the expression of Fc γ Rs with mAb 2.4G2, which recognizes both Fc γ RIIB and Fc γ RIII [39]. In order to determine the effect of RSV persistence on the expression levels of Fc γ RI, Fc γ RIIB and Fc γ RIII separately, we compared the amount of each protein in M ϕ Ps and M ϕ Ns lysates by Western blot using antibodies specific for each isoform. Lack of a suitable commercial antibody prevented us from determining Fc γ RIV.

The protein content of Fc γ RIIB and Fc γ RIII was observed to be higher in M ϕ P than in M ϕ N: fold increases were 1.9 and 0.6, respectively. In contrast, no significant difference was found in Fc γ RI levels between in M ϕ P and M ϕ N (Figure 6). It is interesting that the highest effect of RSV persistence was the increase in Fc γ RIIB, an inhibitory receptor, and yet phagocytosis is higher in M ϕ P cells. This discrepancy might be related to the IgG isotype used for opsonization (IgG2b), which is very weakly recognized by Fc γ RIIB [40].

Figure 6. Total Fc γ RI, RIIB, and RIII protein in M ϕ N and M ϕ P cell extracts. (A) Cells from three different passages of M ϕ N and cells from passages 72, 83 and 87 of M ϕ P were lysed and Fc γ RI, Fc γ RIIB, Fc γ RIII and GAPDH proteins in cell extracts were determined by Western blot with specific antibodies; (B) The relative amount of each Fc γ R isoform was determined as the ratio of the densitometric intensity of the Fc γ R band to the intensity of the GAPDH band in the correspondent cell extract. Results are expressed as mean \pm 1 SD (* indicates $p < 0.05$).



2.1.6. mRNA Expression of Fc γ R Is Distinctively Affected by Viral Persistence

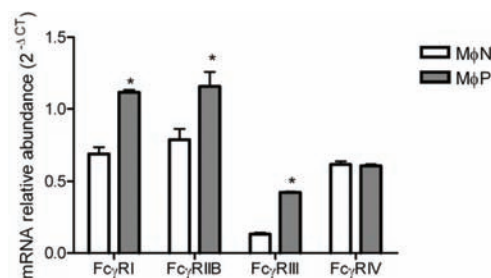
Since we could not evaluate the effect of RSV persistence on the expression of Fc γ RIV by Western blot, and we wanted to have a better understanding of the effect of RSV persistence on the expression of Fc γ Rs, we resorted to RT-PCR so as to determine mRNA levels for all four Fc γ R types in M ϕ P and M ϕ Ns. Results are shown in Figure 7. Levels of mRNA for Fc γ RIV were similar in M ϕ Ns and M ϕ P, suggesting that RSV persistence has no effect in the expression levels of this receptor. As expected from the results of Western blots, mRNAs for Fc γ RIIB and Fc γ RIII were higher in M ϕ P than in M ϕ Ns, with increases of 0.4 and 2.2 fold, respectively. Unexpectedly, we found that the Fc γ RI mRNA was also increased (0.6 fold) in M ϕ P with respect to M ϕ Ns, which suggests that this receptor's expression level is also regulated at the post-transcriptional level.

2.2. Discussion

Viral persistence in cell lines is a well established model that can be used to study alterations in the expression profile of the host genome, which are caused by the constant expression of viral genes [1]. We and other researchers have shown that RSV persistence in cell cultures alters the profile of host genome expression. RSV persistence has been reported in various cell lines, and in two of them, HEP-2, (human epithelial cell line) [6] and P338D1 (murine macrophage-like cell line) [7], the characteristics resulting from persistent viral infection have been extensively studied. Although these two cell models of RSV persistence share several characteristics, they differ in some others. Thus, for instance, expression

of viral antigens in RSV-infected HEp-2 cells ranges from nil to highly positive, a high titer of extracellular virus is produced, and syncytia are formed [6]. In contrast, we have found that the characteristics of viral persistence in an RSV-infected murine macrophage-like cell line, M ϕ P (derived from P338D1), are different: 92%–96% of the cells express viral antigens—as determined by flow cytometry—low titers of extracellular infective virus are produced, and no syncytia are observed. These characteristics are still present after 87 passages. Also, RSV persistence produces an increase in the expression of Fc γ R_s and phagocytic activity in M ϕ P as compared to M ϕ N. RSV persistence induced no cell activation, as evaluated by nitrite production. However, it is clear that RSV persistence induces alterations in the expression of host genes, as demonstrated by the downregulation of ICAM-1 [41] and upregulation of membrane receptors (Fc γ R_s [8]), cytokines [8,42] and chemokines [43]. In addition, expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2, Bcl-X, and XIAP was enhanced, while Bcl-X and XIAP were regulated post-transcriptionally [44].

Figure 7. Fc γ R_s mRNA expression in M ϕ N and M ϕ P. Total RNA from M ϕ N and M ϕ P cells was harvested and converted to cDNA, and mRNAs for Fc γ RI, RIIB, RIII and RIV were measured by real-time PCR. Transcript levels were normalized to GAPDH mRNA expression. Data are expressed as $2^{-\Delta CT}$. Results are shown as mean \pm 1 SD from three independent experiments using cells from passages 72, 83 and 87, * indicates $p < 0.05$.



In this work, we focused on exploring the mechanisms possibly responsible for the increase in Fc γ R-mediated phagocytosis that we had previously reported to occur in early passages (14–40) of the persistently infected macrophage-like cell line M ϕ P [8]. This increase is still evident after 87 passages (Figure 2). The likelihood that the observed effect on Fc γ R_s expression resulted from an autocrine/paracrine-like action of factors (*i.e.*, cytokines, viral particles, viral proteins) released by infected cells was ruled out, because extracellular components in conditioned medium from M ϕ P did not alter Fc γ RIIB/RIII expression in M ϕ N (Figure 3). This suggests that the higher expression of Fc γ RIIB/RIII seen in M ϕ P is not due to stimulation either by cytokines (IL-1 β , IL-6, [8]) or chemokines (RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2; Tirado R. personal communication), which have been detected in M ϕ P supernatants. We also analyzed the possibility that the observed increase in membrane expression of Fc γ RIIB/RIII resulted from a reduced rate of Fc γ R internalization induced by RSV persistence. However, we found no difference between M ϕ N and M ϕ P in the kinetics of Fc γ RIIB /RIII internalization (Figure 4).

Since neither endocytic activity nor components of the conditioned medium (viral particles, viral proteins, cytokines, chemokines, *etc.*) seemed to participate in the increased Fc γ R_s expression, we hypothesized that the observed effect of viral persistence was caused by RSV inducing an increase in

the synthesis of Fc γ Rs. Results obtained by flow cytometry assays of cell-membrane and intracellular protein expression (Figure 5) were consistent with our hypothesis. Since mouse cells express four different Fc γ R isoforms, and because up to this point we had only evaluated the expression of Fc γ RIIB and Fc γ RIII isoforms with a monoclonal antibody which recognizes both, we set out to determine the effect of RSV persistence in the expression of each of the four Fc γ R isoforms expressed by mouse macrophages (Fc γ RI, Fc γ RIIB, Fc γ RIII and Fc γ RIV) by Western blot with isoform-specific antibodies and by quantitative RT-PCR. We found out that RSV persistence distinctively affects expression of Fc γ R isoforms. Protein levels of Fc γ RIIB and Fc γ RIII are increased in M ϕ P as compared to M ϕ N, while Fc γ RI levels are not affected. Fc γ RIV levels could not be determined because no suitable commercial antibody is available at present. However, since the levels of mRNA for Fc γ RIV were not altered, it is reasonable to expect that the membrane expression of this isoform is not altered either. Higher protein levels of Fc γ RIIB and Fc γ RIII are consistent with the increased levels of mRNA for these two isoforms.

The effect of the observed changes in the expression of Fc γ R isoforms on the activation of effector functions of macrophages, is expected to depend on the IgG isotype involved [40]. IgG1 isotype has a higher affinity for the inhibitory Fc γ RIIB isoform than for the activatory Fc γ RIII and Fc γ RIV isoforms. Thus, the increases in Fc γ RIIB and Fc γ RIII expression would be expected to result in a lower cell response to immune complexes or opsonized particles containing IgG1. In contrast, IgG2a and IgG2b show higher affinity for the activatory Fc γ RIII and Fc γ RIV isoforms than for Fc γ RIIB. Therefore, effector functions mediated by these isotypes are less sensitive to changes in Fc γ RIIB. In fact, this is consistent with our observation that Fc γ R-mediated phagocytosis of IgG2b-opsonized erythrocytes is increased in M ϕ P. However, it should be kept in mind that phagocytosis is a complex cellular process, involving many proteins and signaling molecules—thus, it is not expected to depend solely on the expression of the receptor involved. For example, Fc γ Rs-mediated phagocytosis in human monocyte-derived macrophages (MDM) increases after IL-10 treatment and decreases after IFN- γ treatment, but these opposite effects do not correlate with the changes in Fc γ R expression induced by these cytokines [45]. The effect of RSV persistence on the expression of Fc γ Rs mRNA suggests that RSV persistence is able to affect transcription factors, such as PU.1, which participates in Fc γ Rs transcription [46]. Further work is underway in our laboratory in order to examine the participation of PU.1 in Fc γ Rs transcription in RSV infected cells.

It is interesting that, while RSV-induced changes in protein levels of Fc γ RIIB and Fc γ RIII correlated with changes in the respective mRNA levels, Fc γ RI protein expression levels were not significantly affected by RSV persistence, although its mRNA was found to be increased. This suggests that expression of cellular genes in M ϕ P can be regulated at either the transcriptional and/or post-transcriptional levels. Consistent with this notion are studies reporting that the expression of transmembrane protein ICAM-1 is transcriptionally downregulated [41].

Changes in Fc γ Rs expression in macrophages persistently infected with RSV, besides its effect on phagocytosis, could affect other effector functions mediated by these receptors, such as ADCC. However, as previously mentioned, effects of the observed changes are also expected to be highly influenced by the antibody isotypes involved. RSV persistence could also have an impact on the release of inflammatory mediators, thus affecting the functions of macrophages and other cells involved in host defense, although RSV persistence does not seem to alter endogenous or exogenous

viral antigen presentation [42]. Additional studies are needed to further characterize the effects of RSV persistence in macrophages. Finally, it is important to study the effects of RSV persistence in human cells in order to evaluate the possible significance of these results to human disease, since differences have been reported in immune cells between mice and human [47].

3. Experimental Section

3.1. Virus and Cell Lines

The RSV Long strain wild type (wt RSV) has been the prototype virus used in our laboratory. Both the virus origin and the procedures for propagating, purifying and measuring its infectivity in Vero cells have been previously reported [7]. The murine macrophage-like cell line P388D1 was originally obtained from ATCC (TIB 63; Rockville, MD, USA). A sub-line of P388D1 cells persistently infected with wt RSV (M ϕ P) was obtained in our laboratory by infecting the original cell line with RSV at a multiplicity of infection (moi) of 1, and then culturing the surviving cells [7]. As control, P388D1 cells were mock-infected and subcultured in parallel conditions (M ϕ N). Both cell lines are maintained by subculturing. M ϕ P passages from 72 to 87 were used in this study. Throughout the passages, the presence of viral genome was monitored by detecting the mRNA of the gene N by conventional RT-PCR, using a primer pair to amplify a segment of 1,187 bp between nucleotides 1,140–2,327: forward 5'-ATGGCTCTTAGCAAAGTC-3', Reverse 5'-TTTTTTGTAACTTCAAGCTCTACATC-3'. A segment of 260 bp of GAPDH was amplified as control. RSV antigen was detected by flow cytometry on the surface of 92%–97% of the M ϕ P using FITC-labeled polyclonal anti-RSV (Oxoid, Hampshire, UK), diluted 1:10 in PBS containing 0.1% (w/v) BSA (PBSA) (Figure 1). Extracellular viral infectivity titer was $1\text{--}2 \times 10^2$ TCID₅₀/mL per $1\text{--}2 \times 10^6$ cells, and no syncytia were observed [7].

In order to verify lack of activation, the production of nitrates by M ϕ N and M ϕ P was routinely evaluated by the Griess reaction. Nitrate concentrations in supernatants usually ranged from: 7.1–8.0 $\mu\text{mol/mL}$ per $5\text{--}6 \times 10^6$ cells for M ϕ N and 8.3–10.2 $\mu\text{mol/mL}$ per $5\text{--}6 \times 10^6$ cells for M ϕ P.

Both cultures were propagated in RPMI 1640 medium (GIBCO/BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 0.2% NaHCO₃, 10 mM HEPES, 1 μM 2-mercaptoethanol, and 10% heat-inactivated (56 °C; 30 min) fetal bovine serum (FBS) (Biowest, Veracruz, Mexico).

3.2. Phagocytosis Assays

Phagocytosis of non-opsonized and IgG-opsonized sheep red blood cells (IgG-SRBC) was performed as previously described [8,48], but with minor modifications. In brief, SRBC were labeled with trinitrobenzene-sulfonic acid (TNBS, Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) 1 mg/mL for 30 min at room temperature. After washing, SRBCs were opsonized by incubation with one out of two different sub-hemagglutinating concentrations (1.52 or 2.28 $\mu\text{g/mL}$) of affinity-purified murine monoclonal anti-DNP IgG (4F8; IgG2b, produced in our laboratory). Concentrations higher than 2.28 $\mu\text{g/mL}$ could not be used due to agglutination of erythrocytes.

For phagocytosis assays, M ϕ N or M ϕ P were plated in 96-well plates (1×10^5 cells/200 μL of RPMI per well). Non-opsonized or opsonized SRBC (25 μL /well of a 2% suspension of SRBC) were added, and the plates were incubated for 60 min at 37 °C. Non-ingested SRBC were lysed with distilled water,

and the cells were exhaustively washed with PBS. Cells in the wells were lysed with sodium dodecyl sulfate (1% in PBS), and the pseudoperoxidase activity of the ingested SRBC hemoglobin was determined by a colorimetric assay using 3,3'-diaminobenzidine as substrate. Optical density was read at 492 nm. Results are expressed as phagocytic index = (number of cells \times Optical Density/100). In all experiments, phagocytosis of opsonized and non-opsonized SRBC was determined in sextuplicate wells. Controls for endogenous enzymatic activity consisted in lysates of six additional wells to which no SRBC had been added, treated under the same conditions.

3.3. Flow Cytometry

Cell surface expression of Fc γ Rs was determined by flow cytometry using anti-Fc γ RIIB/III (2.4G2, a rat monoclonal antibody that recognizes Fc γ RIIB and RIII epitopes) as unconjugated primary antibody and goat anti-rat F(ab')₂-FITC as secondary antibody, both from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Cells (5×10^5) from different M ϕ P or M ϕ N passages were washed with PBSA and fixed with 4% paraformaldehyde (30 min; room temperature). Fixed cells were washed with PBSA and incubated in PBS + 1% BSA containing 15 μ g of 2.4G2 antibody (2 h; room temperature). After incubation, cells were washed twice with PBSA, and then incubated with goat anti-rat F(ab')₂-FITC (1 h; at room temperature and protected from light). Cells were resuspended in PBS (300 μ L), and 10,000 cells were analyzed by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). So as to determine intracellular proteins, cells were fixed and permeabilized with cold methanol:acetone, 1:1 (1 min; room temperature). Afterwards, cells were washed with PBSA and incubated in PBS + 1% BSA containing 10 μ g of 2.4G2 antibody (2 h; room temperature). Following that incubation, cells were washed twice with PBSA and then incubated with goat anti-rat F(ab')₂-FITC (1 h; at room temperature and protected from light). Thereafter, cells were resuspended in 300 μ L of PBS and analyzed by flow cytometry.

3.4. Conditioned Medium

Confluent M ϕ N or M ϕ P cultures (approx. 5×10^6 cells) were washed with PBS, and then seven mL of supplemented RPMI were added. After 12 or 24 h of incubation at 37 °C, supernatants were collected and cellular debris was removed by centrifugation (352 \times g). (We know that cytokine concentrations in supernatants reach a plateau at 24 h [43]). Two mL of this conditioned medium were added to M ϕ N cultures (1×10^6 cells) and the cultures were incubated for 24 h at 37 °C, 5% CO₂ atmosphere. As positive stimulation control, M ϕ N were incubated with heat-killed non-typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) strain 2019 (moi of 100), kindly provided by Dr. Michael Apicella (Department of Microbiology, College of Medicine, University of Iowa, Iowa City, IA, USA). NTHi had been heat-killed (60 min; 70 °C water bath), washed twice by centrifugation (20 min; 900 \times g; 4 °C), and suspended in PBS at a final concentration of 1×10^{10} bacteria/mL. The expression of Fc γ RIIB/RIII was determined by flow cytometry, as described above.

3.5. Endocytosis Assay

The endocytosis of cell-membrane Fc γ RIIB/RIII receptors was monitored with the monoclonal antibody 2.4G2. Briefly, 2.4G2 antibody was added to M ϕ N or M ϕ P (5×10^5) cells at 20 μ g/mL (30 min, 4 °C). After this period, cells were washed thoroughly with ice-cold medium without FBS. Endocytosis was started by adding medium at 37 °C and then incubating at 37 °C for different periods of time (0, 30, 60, and 120 min). Thereafter, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (30 min; room temperature) and washed. Afterwards, F(ab')₂-FITC against the primary antibody 2.4G2 was added. Fluorescence intensity was determined by flow cytometry as described above.

3.6. Western Blot

Whole-cell extracts were prepared from M ϕ N or M ϕ P (3×10^6 cells) with ice-cold lysing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS) containing 1 \times protease inhibitors cocktail (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). After incubation (10 min on ice), lysates were collected and detergent-insoluble material was removed by centrifugation (20 min, 4 °C; 8,800 \times g). Protein concentration was determined using the DC protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Samples containing 20 μ g of protein each were then boiled in 4 \times SDS sample buffer and resolved on NovexBis-Tris Mini Gels NuPAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Subsequently, proteins were transferred to PVDF membranes (Amersham, Piscataway, NJ, USA) and nonspecific binding sites were blocked by immersing the membranes in blocking solution (PBS, 0.1% Tween-20, and 5% low-fat milk) (1 h, room temperature). After washing the membranes with PBS-0.1% Tween-20, they were incubated with the primary antibody diluted 1:500 in blocking solution (4 °C, overnight), followed by a peroxidase-conjugated appropriate secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), diluted 1:2,500 in blocking solution (1 h, room temperature). The primary antibodies used for Western blot were anti-Fc γ RI goat polyclonal antibody, anti-Fc γ RIIB rabbit polyclonal antibody, anti-Fc γ RIII mouse monoclonal antibody (clone ASH1975), and anti-GAPDH, all from Santa Cruz Biotechnology. Proteins were detected using a chemiluminescent substrate, Super Signal West Dura Extended Duration substrate (Pierce Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), and their intensities were normalized to that of GAPDH. Densitometric analysis of results was performed in images obtained with the Chemidox XRS (BioRad, Hercules, CA, USA) and analyzed with the Quantity one software (Bio-Rad).

3.7. Real Time RT-PCR

Total RNA was extracted from M ϕ N or M ϕ P (2×10^6 cells) with TRIzol, following the manufacturer's instructions. RNA (2 μ g) was reverse transcribed with RNA transcriptase Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). TaqMan real-time PCR was performed with primers and probes (assay on demand 20 \times mix) for Fc γ R genes and GAPDH as control gene, using TaqMan assay reagent master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-time PCR was performed with 80 ng of cDNA for both target genes and endogenous control. Cycling parameters were established according to the manufacturer's protocol. Triplicate CT values were analyzed in Microsoft Excel, using the comparative CT (Δ T) method as described by the manufacturer (Applied Biosystems, Branchburg, NJ,

USA). The amount of mRNA from each target gene ($2^{-\Delta CT}$) was obtained by normalizing it to the endogenous reference (GAPDH) sample.

3.8. Statistics

Data are expressed as mean \pm 1 SD from the indicated number of experiments. Differences between groups were determined by Student's *t*-test, using GraphPad Prism 4.0 software (GraphPad, San Diego CA, USA), and considered statistically significant at $p < 0.05$.

4. Conclusions

RSV persistent infection in a murine macrophage-like cell line alters Fc γ R expression and induces an increase in Fc γ R-mediated phagocytosis. Increases in Fc γ R expression and Fc γ R-mediated phagocytosis are preserved after more than 87 passages of the persistently infected culture. The increase in Fc γ Rs expression results neither from soluble factors (cytokines) or viral products released by the infected cells, nor from an increase in the rate of Fc γ R internalization. Persistence of RSV genome in infected cells distinctly affects the expression of Fc γ R isoforms at both the mRNA and protein levels. These results indicate that RSV persistence, a phenomenon possibly more common than usually assumed, might affect the expression of cellular genes and, consequently, normal cell functions as well.

Acknowledgments

The authors thank Yvonne Rosenstein Azoulay, Carlos Rosales Ledezma and Evelyn Rivera-Toledo for helpful discussions and constructive comments during the course of this work, Olivia Reynoso Ducoing for technical assistance with Western blot assays, Rafael Palma for technical assistance with conditioned medium assays, Veronica Yakoleff for helpful comments, and Ma Pilar Ortega for English editing. The research was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México (Grant 78862); Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (Grant PAPIIT IN23610-3); and Facultad de Medicina and PDCB, UNAM. Jorge Gaona was recipient of a scholarship from CONACYT (Scholarship 20313). This work is part of the PhD dissertation submitted by Jorge Gaona in partial fulfillment of the degree requirements.

Author Contributions

Beatriz Gómez, Enrique Ortega, and Jorge Gaona designed the experiments; Carlos Santiago-Olivares and Jorge Gaona performed the experiments; Beatriz Gómez, Enrique Ortega and Jorge Gaona prepared the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References and Notes

1. Oldstone, M.B. Anatomy of viral persistence. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000523.
2. Anderson, C.F.; Gerber, J.S.; Mosser, D.M. Modulating macrophage function with IgG immune complexes. *J. Endotoxin Res.* **2002**, *8*, 477–481.
3. Biswas, S.K.; Chittechath, M.; Shalova, I.N.; Lim, J.Y. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol. Res.* **2012**, *53*, 11–24.
4. Leeansyah, E.; Wines, B.D.; Crowe, S.M.; Jaworowski, A. The mechanism underlying defective Fcγ receptor-mediated phagocytosis by HIV-1-infected human monocyte-derived macrophages. *J. Immunol.* **2007**, *178*, 1096–1104.
5. Kedzierska, K.; Azzam, R.; Ellery, P.; Mak, J.; Jaworowski, A.; Crowe, S.M. Defective phagocytosis by human monocyte/macrophages following HIV-1 infection: Underlying mechanisms and modulation by adjunctive cytokine therapy. *J. Clin. Virol.* **2003**, *26*, 247–263.
6. Martinez, I.; Lombardia, L.; Herranz, C.; Garcia-Barreno, B.; Dominguez, O.; Melero, J.A. Cultures of HEp-2 cells persistently infected by human respiratory syncytial virus differ in chemokine expression and resistance to apoptosis as compared to lytic infections of the same cell type. *Virology* **2009**, *388*, 31–41.
7. Sarmiento, R.E.; Tirado, R.; Gomez, B. Characteristics of a respiratory syncytial virus persistently infected macrophage-like culture. *Virus Res.* **2002**, *84*, 45–58.
8. Guerrero-Plata, A.; Ortega, E.; Gomez, B. Persistence of respiratory syncytial virus in macrophages alters phagocytosis and pro-inflammatory cytokine production. *Viral Immunol.* **2001**, *14*, 19–30.
9. Ravetch, J.V.; Bolland, S. IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **2001**, *19*, 275–290.
10. Nimmerjahn, F.; Ravetch, J.V. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* **2005**, *310*, 1510–1512.
11. Nimmerjahn, F.; Ravetch, J.V. Analyzing antibody-Fc-receptor interactions. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *415*, 151–162.
12. Nimmerjahn, F.; Ravetch, J.V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 34–47.
13. Nimmerjahn, F.; Ravetch, J.V. Antibody-mediated modulation of immune responses. *Immunol. Rev.* **2010**, *236*, 265–275.
14. Collins, P.L.; Melero, J.A. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: Still crazy after all these years. *Virus Res.* **2011**, *162*, 80–99.
15. Bont, L.; Houben, M.L. The epidemiology of respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection on young children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2012**, *30*, 778–784.
16. Van Drunen Littel-van den Hurk, S.; Watkiss, E.R. Pathogenesis of respiratory syncytial virus. *Curr. Opin. Virol.* **2012**, *2*, 300–305.
17. Habibi, M.S.; Openshaw, P.J. Benefit and harm from immunity to respiratory syncytial virus: Implications for treatment. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2012**, *25*, 687–694.
18. Walsh, E.E. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **2011**, *32*, 423–432.
19. Welliver, R.C. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. *J. Pediatr.* **2003**, *143*, S112–S117.

20. Zeng, R.; Li, C.; Li, N.; Wei, L.; Cui, Y. The role of cytokines and chemokines in severe respiratory syncytial virus infection and subsequent asthma. *Cytokine* **2011**, *53*, 1–7.
21. Hall, C.B.; Douglas, R.G.; Geiman, J.M. Respiratory syncytial virus infections in infants: Quantitation and duration of shedding. *J. Pediatr.* **1976**, *89*, 11–15.
22. Szabo, S.M.; Levy, A.R.; Gooch, K.L.; Bradt, P.; Wijaya, H.; Mitchell, I. Elevated risk of asthma after hospitalization for respiratory syncytial virus infection in infancy. *Paediatr. Respir. Rev.* **2013**, *13*, S9–S15.
23. Piedimonte, G. Respiratory syncytial virus and asthma: Speed-dating or long-term relationship? *Curr. Opin. Pediatr.* **2013**, *25*, 344–349.
24. Openshaw, P.J.; Dean, G.S.; Culley, F.J. Links between respiratory syncytial virus bronchiolitis and childhood asthma: Clinical and research approaches. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2003**, *22*, S58–S64.
25. Sikkel, M.B.; Quint, J.K.; Mallia, P.; Wedzicha, J.A.; Johnston, S.L. Respiratory syncytial virus persistence in chronic obstructive pulmonary disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2008**, *27*, S63–S70.
26. Tripp, R.A. The brume surrounding respiratory syncytial virus persistence. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2004**, *169*, 778–779.
27. McNamara, P.S.; Smyth, R.L. The pathogenesis of respiratory syncytial virus disease in childhood. *Br. Med. Bull.* **2002**, *61*, 13–28.
28. Mejias, A.; Chavez-Bueno, S.; Gomez, A.M.; Somers, C.; Estripeaut, D.; Torres, J.P.; Jafri, H.S.; Ramilo, O. Respiratory syncytial virus persistence: Evidence in the mouse model. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2008**, *27*, S60–S62.
29. Sutton, T.C.; Tayyari, F.; Khan, M.A.; Manson, H.E.; Hegele, R.G. T helper 1 background protects against airway hyperresponsiveness and inflammation in guinea pigs with persistent respiratory syncytial virus infection. *Pediatr. Res.* **2007**, *61*, 525–529.
30. Schwarze, J.; O'Donnell, D.R.; Rohwedder, A.; Openshaw, P.J. Latency and persistence of respiratory syncytial virus despite T cell immunity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2004**, *169*, 801–805.
31. Bramley, A.M.; Vitalis, T.Z.; Wiggs, B.R.; Hegele, R.G. Effects of respiratory syncytial virus persistence on airway responsiveness and inflammation in guinea-pigs. *Eur. Respir. J.* **1999**, *14*, 1061–1067.
32. Hegele, R.G.; Hayashi, S.; Bramley, A.M.; Hogg, J.C. Persistence of respiratory syncytial virus genome and protein after acute bronchiolitis in guinea pigs. *Chest* **1994**, *105*, 1848–1854.
33. Riedel, F.; Oberdieck, B.; Streckert, H.J.; Philippou, S.; Krusat, T.; Marek, W. Persistence of airway hyperresponsiveness and viral antigen following respiratory syncytial virus bronchiolitis in young guinea-pigs. *Eur. Respir. J.* **1997**, *10*, 639–645.
34. Valarcher, J.F.; Bourhy, H.; Lavenu, A.; Bourges-Abella, N.; Roth, M.; Andreoletti, O.; Ave, P.; Schelcher, F. Persistent infection of b lymphocytes by bovine respiratory syncytial virus. *Virology* **2001**, *291*, 55–67.
35. Mills, B.G.; Frausto, A.; Singer, F.R.; Ohsaki, Y.; Demulder, A.; Roodman, G.D. Multinucleated cells formed *in vitro* from paget's bone marrow express viral antigens. *Bone* **1994**, *15*, 443–448.
36. Cubie, H.A.; Duncan, L.A.; Marshall, L.A.; Smith, N.M. Detection of respiratory syncytial virus nucleic acid in archival postmortem tissue from infants. *Pediatr. Pathol. Lab. Med.* **1997**, *17*, 927–938.

37. Mohapatra, S.S.; Boyapalle, S. Epidemiologic, experimental, and clinical links between respiratory syncytial virus infection and asthma. *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21*, 495–504.
38. Herra, C.M.; Keane, C.T.; Whelan, A. Increased expression of Fc gamma receptors on neutrophils and monocytes may reflect ongoing bacterial infection. *J. Med. Microbiol.* **1996**, *44*, 135–140.
39. Unkeless, J.C. Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte fc receptors. *J. Exp. Med.* **1979**, *150*, 580–596.
40. Nimmerjahn, F.; Ravetch, J.V. Fcgamma receptors: Old friends and new family members. *Immunity* **2006**, *24*, 19–28.
41. Arrevillaga, G.; Gaona, J.; Sanchez, C.; Rosales, V.; Gomez, B. Respiratory syncytial virus persistence in macrophages downregulates intercellular adhesion molecule-1 expression and reduces adhesion of non-typeable haemophilus influenzae. *Intervirology* **2012**, *55*, 442–450.
42. Guerrero-Plata, A.; Ortega, E.; Ortiz-Navarrete, V.; Gomez, B. Antigen presentation by a macrophage-like cell line persistently infected with respiratory syncytial virus. *Virus Res.* **2004**, *99*, 95–100.
43. Tirado, R.; Gómez, B. National Autonomous University of Mexico (UNAM), Ciudad Universitaria, D.F., México. Unpublished work, 2013.
44. Nakamura-Lopez, Y.; Villegas-Sepulveda, N.; Sarmiento-Silva, R.E.; Gomez, B. Intrinsic apoptotic pathway is subverted in mouse macrophages persistently infected by RSV. *Virus Res.* **2011**, *158*, 98–107.
45. Frausto-Del-Río, D.; Soto-Cruz, I.; Garay-Canales, C.; Ambriz, X.; Soldevila, G.; Carretero-Ortega, J.; Vázquez-Prado, J.; Ortega, E. Interferon gamma induces actin polymerization, rac1 activation and down regulates phagocytosis in human monocytic cells. *Cytokine* **2012**, *57*, 158–168.
46. Berclaz, P.Y.; Shibata, Y.; Whitsett, J.A.; Trapnell, B.C. GM-CSF, via PU.1, regulates alveolar macrophage Fcgamma R-mediated phagocytosis and the IL-18/IFN-gamma -mediated molecular connection between innate and adaptive immunity in the lung. *Blood* **2002**, *100*, 4193–4200.
47. Mestas, J.; Hughes, C.C. Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 2731–2738.
48. Jungi, T.W. A rapid and sensitive method allowing photometric determination of erythrophagocytosis by mononuclear phagocytes. *J. Immunol. Methods* **1985**, *82*, 141–153.