



CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

TESIS

ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE SA-F3X-BBL UTILIZADA COMO INMUNÓGENO EN RATONES.

PRESENTA

Claudia Berenice Barrón García

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL
TOXICOLOGÍA**

COMITÉ TUTORAL

Dra. Eva María Salinas Miralles

Dr. Daniel Cervantes García

Dr. Andrés Quintanar Stephano

Aguascalientes, Ags.

Junio de 2021

Mtro. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

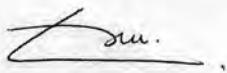
P R E S E N T E

Por medio del presente, como Tutores designados de la estudiante **CLAUDIA BERENICE BARRÓN GARCÍA** con ID 13398 quien realizó la tesis titulada: "**ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE SA-F3X-BBL UTILIZADA COMO INMUNÓGENO EN RATONES**", un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 14 de Junio de 2021.



Dra. Eva María Salinas Miralles
Tutor de tesis



Dr. Daniel Cervantes García
Tutor de tesis



Dr. Andrés Quintanar Stephano
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 01
Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 15/06/21

NOMBRE: CLAUDIA BERENICE BARRÓN GARCÍA ID: 13398

PROGRAMA: MAESTRÍA EN CIENCIAS ÁREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL O TOXICOLOGÍA LGAC (del posgrado): TOXICOLOGÍA

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo práctico

TÍTULO: ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE SA-F3X-BBL UTILIZADA COMO INMUNÓGENO EN RATONES

Se desarrollaron estudios preclínicos de un prototipo de vacuna para el Virus Sindical Respiratorio

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- ☒ SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
☒ SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
☒ SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
☒ SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
☒ SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
☒ SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
☒ SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
☒ NA Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- ☒ SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
☒ SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc.)
☒ SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo al tutor.
☒ NA Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
☒ NA Coincide con el título y objetivo registrado
☒ SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
☒ SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
☒ NA Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- ☒ NA Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
☒ NA El estudiante es el primer autor
☒ NA El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
☒ NA En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
☒ NA Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
☒ NA La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

SI X
No

FIRMAS

Elaboró:
* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

Elsa Marcela Ramírez López
Dra. en C. Elsa Marcela Ramírez López

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Raquel Guerrerro Alba
Dra. en C. Raquel Guerrerro Alba

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del HAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano

Revisó:
NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Maydeé Martínez Ruvalcaba
Dra. en C. Maydeé Martínez Ruvalcaba

Autorizó:
NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado
En cumplimiento con el Art. 100C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuarta la elección termina el programa de posgrado y el Art. 100F las funciones del Secretario Técnico, lleva el seguimiento de los alumnos.

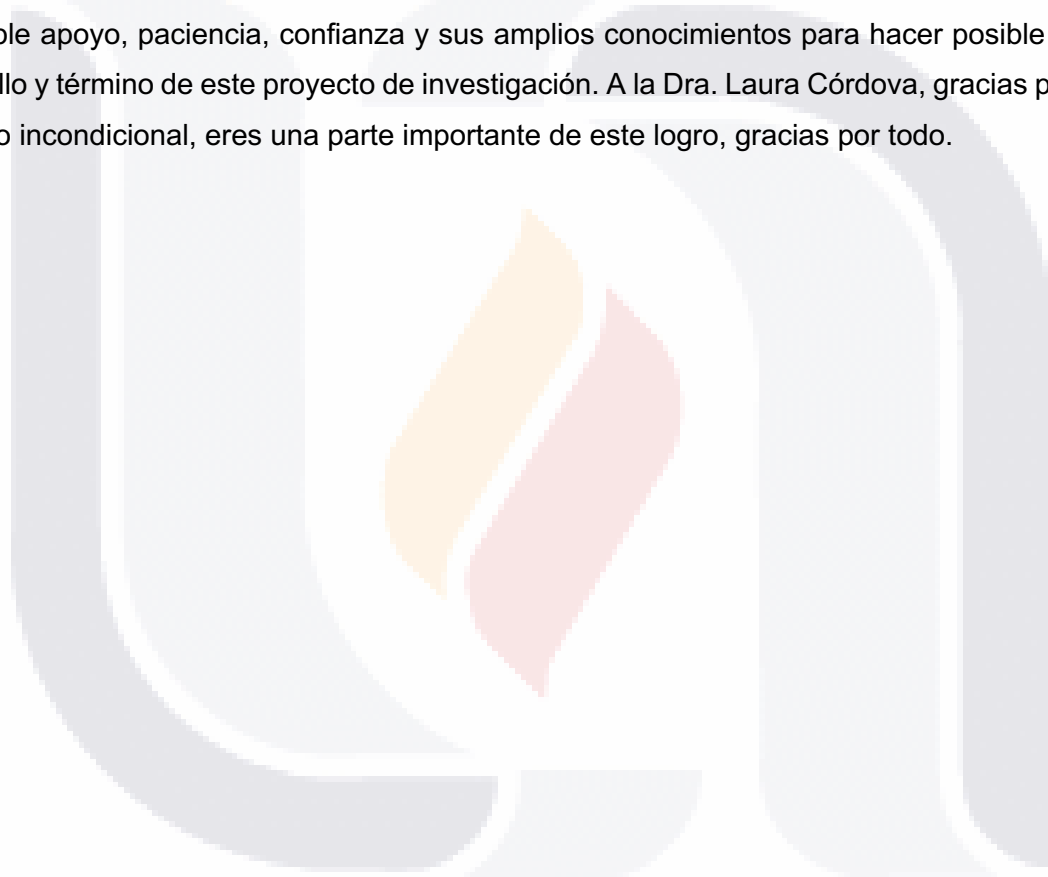
Elaborado por: D. Apoyo al Posgrado
Revisado por: D. Control Externo/ D. Gestión de Calidad.
Aprobado por: D. Control Externo/ D. Apoyo al Posgrado.

Código: DD-SEP-PO-15
Actualizado: 05
Emisión: 20/06/19

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por haberme otorgado la beca para poder realizar mis estudios de Maestría en Ciencias en el área de Toxicología y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) por permitirme realizar mis experimentos en esta casa de estudios.

A la Dra Eva Salinas, al Dr. Daniel Cervantes y al Dr. Andrés Quintanar por su invaluable apoyo, paciencia, confianza y sus amplios conocimientos para hacer posible el desarrollo y término de este proyecto de investigación. A la Dra. Laura Córdova, gracias por tu apoyo incondicional, eres una parte importante de este logro, gracias por todo.



DEDICATORIAS

A mi hija Abigail Rangel, por su paciencia interminable, su apoyo en cada uno de mis pasos y su compañía en tiempos difíciles. Sin ti no lo habría logrado, eres mi razón de ser. Te amo mi vida.

A mis padres y hermanos, por sus consejos, su apoyo, las risas, su compañía y sus porras para alcanzar mis metas y sueños. Los amo.

A las familias Rangel-Rivas y Dávila-Rangel por su paciencia, su tiempo y su apoyo para cuidar de mi más grande tesoro, para que pudiera terminar mis estudios con éxito. Por siempre agradecida.

A mis amigas, porque siempre sé que puedo contar con ellas, porque me animan a seguir adelante y porque su vida es un ejemplo para mí. Gracias Sonia, Cristina, Nancy, Liliana y Ale Glz. Dios las conserve por siempre a mi lado, las quiero.

A las chicas del pasillo, por las risas, los conocimientos y el apoyo que me brindaron, siempre estaré agradecida. Me siento orgullosa de conocerlas en este camino de la ciencia. Las admiro y las quiero mucho.

A mis amigos de maestría, fue duro el camino pero lo logramos. Mis mejores deseos para ustedes y que siempre logren con éxito lo que se propongan.

Por último, pero El más importante en mi vida, a Dios por cuidarme a mí y a mi familia en estos tiempos tan difíciles y porque siempre me ha abierto puertas y nunca me ha faltado nada. Pongo mi vida en tus manos, no me sueltes nunca. Te dedico todos mis logros, porque tu eres mi vida y sin ti no soy nada.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO.....	7
1.1 FAMILIA <i>PARAMYXOVIRIDAE</i>	7
1.2 MORFOLOGÍA, GENOMA, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE PROTEÍNAS DEL RSV	7
1.3 CICLO BIOLÓGICO DEL RSV	11
1.3.1 <i>Entrada del virus</i>	11
1.3.2 <i>Replicación y Transcripción</i>	12
1.3.3 <i>Ensamblaje de viriones</i>	12
1.3.4 <i>Liberación de progenie viral</i>	13
1.4 DISTRIBUCIÓN DEL RSV	13
1.5 PATOGENESIS	14
1.6 PATOLOGÍA.....	15
1.7 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	16
1.8 RESPUESTA INMUNE FRENTE AL RSV	17
1.9 ENFERMEDAD EXACERBADA POR RSV DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS (ADE)	21
1.10 EVASIÓN VIRAL.....	23
1.11 HISTORIA DE LA GENERACIÓN DE OPCIONES TERAPÉUTICAS PARA COMBATIR RSV	24
1.11.1 <i>Vacunas</i>	24
1.11.2 <i>Tratamientos</i>	26
1.12 LA PROTEÍNA RECOMBINANTE SA-F3X-BBL	27
2. JUSTIFICACIÓN	30
3. HIPÓTESIS.....	31
4. OBJETIVO GENERAL.....	31
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	31
4.1.1. <i>Evaluar la respuesta de anticuerpos inducida por la proteína SA-F3X-BBL en los ratones.</i>	31
4.1.2. <i>Determinar el título de anticuerpos neutralizantes en suero de ratones inmunizados a diferentes concentraciones de proteína SA-F3X-BBL.</i>	31
4.1.3. <i>Desarrollar una estrategia de cuantificación de la carga viral del RSV en una línea celular en presencia o ausencia de sueros de ratones inmunizados con la proteína SA-F3X-BBL</i>	31
5. METODOLOGÍA.....	32
5.1. PROPAGACIÓN DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO.....	32
5.1.1. <i>Preparación de células A549 y Vero</i>	32
5.1.2. <i>Preparación de stocks de RSV</i>	32
5.1.3. <i>Infección en células Vero para propagar RSV</i>	32
5.1.4. <i>Purificación de RSV</i>	33
5.1.5. <i>Titulación del RSV por el método Dosis media de cultivo de tejido infeccioso (TCID50).</i>	34
Si.....	35

ENTONCES	36
5.1.6. Estandarización de cantidad de multiplicidad de infección (MOI) de RSV para infectar células Vero.	36
5.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE SA-F3X-BBL	36
5.2.1. Transformación de pET-SA-F3X-BBL	36
5.2.2. Extracción de plásmidos	37
5.2.3. PCR en punto final	37
5.2.4. Inducción con IPTG	38
5.2.5. Purificación de SA-F3X-BBL	38
5.2.6. Análisis de la proteína SA-F3X-BBL por Western Blot	39
5.2.7. Identificación de proteínas por tinción con azul Coomassie	39
5.3 ANIMALES EXPERIMENTALES	40
5.3.1. Protocolo de inmunización con SA-F3X-BBL en ratones C57BL/6	40
5.4. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS IgG INDUCIDA POR LA PROTEÍNA SA-F3X-BBL EN LOS RATONES POR EL MÉTODO DE ELISA.	42
5.5 EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES FRENTE A RSV (A) IN VITRO.	42
5.5.1. Titulación de anticuerpos neutralizantes frente a RSV in vitro por SA-F3X-BBL	42
5.6 EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA REPLICACIÓN VIRAL CON SUEROS DE RATONES INMUNIZADOS. ..	44
5.6.1. Efecto de la inmunización con la proteína recombinante SA-F3X-BBL y evaluación de la inhibición de la replicación viral in vitro	44
5.6.2. Clonación de un fragmento de los genes NS1 y NS2 y estandarización de PCR cuantitativa.	45
5.6.3. Curva estándar del fragmento NS1 y NS2 para determinar la carga viral por qPCR	47
5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
6. RESULTADOS	49
6.1 PROPAGACIÓN DE VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO	49
6.2 TITULACIÓN DEL RSV POR EL MÉTODO DOSIS MEDIA DE CULTIVO DE TEJIDO INFECCIOSO (TCID₅₀) ..	50
6.3 ESTANDARIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE SA-F3X-BBL.	54
6.4. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS IgG INDUCIDA POR LA PROTEÍNA SA-F3X-BBL EN LOS RATONES POR EL MÉTODO DE ELISA.	56
6.5 DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES EN SUERO DE ANIMALES INMUNIZADOS CON LA PROTEÍNA SA-F3X-BBL.	57
6.6 ESTANDARIZACIÓN DE PCR Y CLONACIÓN DE FRAGMENTO DE LAS PROTEÍNAS NS1 Y NS2.	60
6.7 CURVA ESTÁNDAR DEL FRAGMENTO NS1 Y NS2 PARA DETERMINAR LA CARGA VIRAL POR qPCR	63
6.8 EVALUACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL DE LA CARGA VIRAL DEL RSV EN CÉLULAS VERO EN PRESENCIA DE SUERO DE ANIMALES CONTROL Y LOS INMUNIZADOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SA-F3X-BBL	66
7. DISCUSIÓN	69
8. CONCLUSIONES	74
BIBLIOGRAFÍA	75

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO.....	10
FIGURA 2. RESPUESTA INFLAMATORIA DEL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR INDUCIDA POR LA INFECCIÓN POR RSV (MODIFICADO DE BOHMWALD ET AL., 2019).....	20
FIGURA 3. ENFERMEDAD EXACERBADA DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS (ADE).	22
FIGURA 4. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE SA-F3X-BBL Y SU TETRAMERIZACIÓN.	28
FIGURA 5. DETERMINACIÓN DE LA TITULACIÓN DE RSV POR EL MÉTODO TCID ₅₀	35
FIGURA 6. IMÁGENES DE TOMA DE MUESTRA SE SANGRE DE RATONES C57BL/6 INMUNIZADOS Y DE APLICACIÓN INTRAMUSCULAR DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE SA-F3X-BBL.....	41
FIGURA 7. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE PROCESO DE NEUTRALIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS GENERADOS POR LOS ANIMALES INMUNIZADOS CON LA PROTEÍNA SA-F3X-BBL FRENTE A LA INFECCIÓN POR RSV IN VITRO.	43
FIGURA 8. PROPAGACIÓN DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO (RSV) EN CÉLULAS A549 Y VERO.	50
FIGURA 9. TITULACIÓN DEL RSV POR EL MÉTODO TCID ₅₀ IN VITRO.	51
FIGURA 10. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE SA-F3X-BBL POR POLIACRILAMIDA CON SDS-PAGE AL 7.5%.	55
FIGURA 11. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS IgG ESPECÍFICOS DE RSV CUANTIFICADOS POR ELISA.....	57
FIGURA 12. EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES POR MEDIO DE CPE FRENTE A RSV IN VITRO.	58
FIGURA 13. TÍTULO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES EN SUERO DE ANIMALES INMUNIZADOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SA-F3X-BBL.	59
FIGURA 14. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1% DEL PRODUCTO DE PCR DE cDNA OBTENIDO DE LA RT-PCR A DIFERENTES CONCENTRACIONES (22.4, 44.8 Y 67.2 NG/ μ L).	61
FIGURA 15. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1% DONDE SE MUESTRA EL ANÁLISIS DEL PRODUCTO DE LA PCR PARA 4 CLONAS SELECCIONADAS CON EL PLÁSMIDO DE CLONACIÓN PJET 1.2/BLUNT-NS1/NS2.	62
FIGURA 16. ESTANDARIZACIÓN DE UNA CURVA ESTÁNDAR A PARTIR DEL PLÁSMIDO QUE CONTIENE EL GENOMA COMPLETO NS1/NS2 PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL EN TEJIDO.....	64
FIGURA 17. CURVA DE DESNATURALIZACIÓN O DE DISOCIACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR.	65
FIGURA 18.....	68

ACRÓNIMOS

RSV	Virus Sincitial Respiratorio
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
MAbs	Anticuerpos Monoclonales
DC	Célula Dendrítica
NK	Células asesinas naturales
IFN- γ	Interferón gamma
IgE	Inmunoglobulina E
IL	Interleucina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IgA	Inmunoglobulina A
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
CPE	Efecto citopático
SA	Core de estreptavidina
F3X	Sitio II de la proteína F del RSV
BBL	Coestimulador 4-1-BBL

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE SA-F3X-BBL UTILIZADA COMO INMUNÓGENO EN RATONES.

RESUMEN

Según la Organización Mundial de la Salud, el Virus Sincitial Respiratorio (RSV) es el principal agente etiológico de las enfermedades respiratorias agudas y es causa de una alta morbilidad principalmente en niños menores de 2 años. La bronquiolitis es el resultado de la infección por RSV. La limitada eficacia de los tratamientos actuales y su alto costo, los hace prácticamente inaccesibles en países subdesarrollados. Tras la infección por RSV en el tracto respiratorio inferior, las células epiteliales secretan citocinas y quimiocinas inflamatorias. Esta respuesta inmune exacerbada promueve la infiltración de células inmunes en los pulmones causando una obstrucción de las vías respiratorias por el abundante moco y daño en el tejido pulmonar. Es por ello que resulta de suma importancia diseñar estrategias preventivas contra la infección por RSV. El RSV tiene alrededor de su estructura dos grandes glicoproteínas: la G de adhesión y la F de fusión que dirigen las respuestas neutralizantes. Es por ello que este trabajo se enfocó en determinar si una versión recombinante del virus (RSV-F) y unido con un core de estreptavidina (SA) y un coestimulador (4-1BBL), posee capacidad inmunogénica en un modelo *in vivo*. La proteína recombinante SA-F3X-BBL fue expresada en *E. coli* y usada como inmunógeno en ratones C57BL/6. Utilizando una prueba de ELISA para cuantificar IgG anti-RSV, se mostró que el protocolo de inmunización intramuscular con SA-F3X-BBL no indujo la producción de IgG sérica específica de RSV en los animales a los 14 días tras la primo-inmunización. Los sueros de animales control e inmunizados con la proteína SA-F3X-BBL fueron preincubados con el RSV para luego evaluar la inhibición de replicación viral mediante qPCR y la capacidad neutralizante de los anticuerpos generados por los animales inmunizados. La replicación viral se disminuyó significativamente con el suero de animales inmunizados con 50 µg de proteína. Se determinó que la proteína induce una respuesta de anticuerpos neutralizantes al encontrarse disminución del efecto citopático en una línea celular susceptible a la infección. La concentración más adecuada de la proteína recombinante que indujo el título de anticuerpos neutralizantes más alto fue de 20 µg.

ABSTRACT

According to the World Health Organization, Respiratory Syncytial Virus (RSV) is the main etiological agent of acute respiratory diseases and is the cause of high morbidity and mortality, mainly in children under 2 years of age. Bronchiolitis is the result of RSV infection. The limited efficacy of the current treatments and their high cost make their use practically inaccessible in underdeveloped countries. Following RSV infection in the lower respiratory tract, epithelial cells secrete inflammatory cytokines and chemokines. This exacerbated immune response promotes the infiltration of immune cells in the lungs causing an obstruction of the airways by the abundant mucus and damage to the lung tissue. That is why it is extremely important to design preventive strategies against RSV infection. RSV has around its structure two large glycoproteins: protein G of adhesion and protein F of fusion, that address the neutralizing responses. The aim of this work was to determine whether a recombinant version of the virus (RSV-F) bounded to a streptavidin core (SA) and to a costimulator (4-1BBL) possesses immunogenic capacity in an *in vivo* model. The recombinant protein SA-F3X-BBL was expressed in *E. coli* and used as an immunogen in C57BL / 6 mice. Using an ELISA assay to quantify IgG anti-RSV, we showed that the intramuscular immunization protocol with SA-F3X-BBL did not induce the production of serum RSV-specific total IgG by animals at day 14 after the first immunization. Sera from control animals immunized with the SA-F3X-BBL protein were preincubated with RSV to then evaluate the inhibition of viral replication by qPCR and the neutralizing capacity of the antibodies generated by the immunized animals. Viral replication was significantly decreased with serum from animals immunized with 50 µg of protein. It was determined that the protein induces a neutralizing antibody response when a decrease in CPE is found in a cell line susceptible to infection. The most suitable concentration of the recombinant protein that induced the highest neutralizing antibody titer was 20 µg.

1. INTRODUCCIÓN

VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO

1.1 Familia *Paramyxoviridae*

La familia de virus *Paramyxoviridae* está incluida en el orden de los *Mononegavirales*, ya que todos los virus integrantes presentan un RNA de una sola hebra, de sentido negativo (Teng & Collins, 2002). La familia *Paramyxoviridae* incluye virus de mucha importancia por las enfermedades que causan en el hombre como: virus parainfluenza y parotiditis; el virus de sarampión, el virus sincital respiratorio (RSV, por su nombre en inglés, Respiratory Syncytial Virus) y el metapneuvirus. Estos virus causan altas tasas de mortalidad y morbilidad alrededor del mundo (Falsey *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2005).

El RSV se aisló por primera vez en 1956, a partir de muestras de garganta en una colonia de chimpancés que tenían síntomas como tos, estornudos y secreción nasal purulenta (Beem *et al.*, 1960; Morris *et al.*, 1956; Wright *et al.*, 2014). Estos síntomas se observaron en otros monos, lo que indica que el patógeno responsable de la enfermedad era altamente contagioso. Originalmente, el patógeno se llamaba agente de coriza de chimpancé (Morris *et al.*, 1956). Más tarde, en 1957, se aisló un agente viral similar de las gargantas de los bebés que tenían enfermedades respiratorias graves (Chanock *et al.*, 1957). El patógeno aislado indujo la formación de sincitios y la fusión de célula con célula que luego se demostró que era causada por la proteína de fusión viral F (Chanock *et al.*, 1957, Walsh & Hruska *et al.*, 1983). Desde entonces, este patógeno fue renombrado como RSV (Walsh & Hruska *et al.*, 1983).

1.2 Morfología, genoma, estructura y función de proteínas del RSV

El RSV es un virus de RNA envuelto de morfología pleomórfica, con una variedad de formas esféricas, filamentosas, y una combinación de ambas, con un diámetro desde los 100 hasta los 1000 nm (Liljeroos *et al.*, 2013). El RSV pertenece a la Familia: *Paramyxoviridae* Género: *Pneumovirus* (Lotz & Peebles, 2012). Todos los virus de esta familia se caracterizan por poseer envoltura de bicapa lipídica. Es de aproximadamente 15 Kb. Su genoma está compuesto de RNA de cadena sencilla de sentido negativo y no está segmentado (Kiss *et al.*, 2014; Collins *et al.*, 1995). El hecho de que el genoma del RSV sea

no segmentado es considerado importante porque no se reordenan con otros virus. El reordenamiento puede dar el potencial de cambios en la composición genética de un virus, haciendo al virus más virulento o más resistente al anticuerpo sérico humano existente y a algunas respuestas antivirales (Glezen *et al.*, 1991; Welliver, 2003).

En su genoma de RNA se contienen 10 genes que codifican para 11 proteínas: la proteína nucleocápside (N), proteínas asociadas a la nucleocápside (M2-1, P, L), una proteína M2-2 (el segundo marco de lectura abierto del gen M2), una proteína de matriz (M), tres proteínas transmembranales (F, G, SH), y dos proteínas no estructurales (NS1, NS2) (Battles & McLellan, 2019; Collins & Graham, 2008) (Figura 1). Además, estas proteínas contribuyen a que el RSV, al igual que otros virus, sea capaz de desarrollar varias estrategias para evadir, reducir o engañar al sistema inmune y evitar finalmente ser eliminado (Iannello *et al.*, 2006; Espinoza *et al.*, 2014).

La proteína nucleocápside (N) tiene propiedades intrínsecas de unión a RNA, y se une al RNA viral en una forma no específica para formar un complejo proteína N-RNA. Se ha propuesto que antes de ensamblar la nucleocápside, la proteína N se une a la proteína P para evitar uniones no específicas a los RNAs celulares. La proteína N, la fosfoproteína P, y la RNA polimerasa dependiente de RNA (L) encapsulan el RNA viral para formar un ensamblado helicoidal denominado complejo de ribonucleoproteína (RNP). Esta estructura protege al RNA y forma la maquinaria mínima de replicación (Collins *et al.*, 2013; Gilman *et al.*, 2019). La proteína L funciona como una RNA polimerasa dependiente de RNA que replica el genoma de RNA viral y transcribe RNA mensajeros. Para realizar la transcripción y replicación del genoma, la proteína L se une a secuencias promotoras que se encuentran en los extremos 3' de los RNA de genomas y antigenomas. La fosfoproteína P ayuda a posicionar a la proteína L sobre los genomas virales (Borchers *et al.*, 2013). La proteína M2-2 es prescindible en la replicación del RSV; sin embargo, se ha sugerido que tiene un papel en la regulación del cambio entre el proceso de replicación y transcripción del RNA viral (Cheng *et al.*, 2005; Battles & McLellan, 2019). La proteína M2-1 es un factor de procesividad transcripcional involucrado en la transcripción durante la etapa de elongación del RNA. Además, M2-1 tiene funciones estructurales, ya que se colocaliza en inclusiones citoplásmicas dentro de células infectadas, donde se asocia con complejos RNP a través de la proteína P y el dominio N-terminal de la proteína M (Muniyandi *et al.*, 2018). La proteína M es una proteína fosforilada no glicosilada con función importante como

componente estructural del virión de RSV. La proteína M tiene un papel clave en el ensamblaje del virión al formar una interfase entre el complejo RNP viral y la envoltura. La polimerización de la proteína M es importante para dirigir el ensamblaje y liberación. M interacciona con el dominio amino-terminal de la proteína G y con la cola citoplásmica de la proteína F, por lo que coordina su reclutamiento a los sitios de ensamblaje y liberación de las partículas virales (Bajorek *et al.*, 2014). El RSV posee tres proteínas membranales: proteína pequeña hidrofóbica (SH), glicoproteína (G), y proteína de fusión (F). La proteína SH es una proteína integral de membrana tipo II que forma un canal iónico pentamérico. El papel de la proteína SH no está bien entendido, ya que SH no es necesaria para la unión del virus a la célula o la formación de sincitios (Gan *et al.*, 2012). La glicoproteína G está altamente glicosilada y es expresada en una forma secretada (Gs) y una forma anclada en la membrana (Gm), esta última funciona como una proteína de adhesión viral. La glicoproteína G participa activamente en la enfermedad luego de la infección primaria. Una región conservada central dentro de la glicoproteína G contiene cuatro cisteínas conservadas en una estructura de lazo como un motivo de quimiocina CX3C. La porción C-terminal de la región conservada tiene homología estructural con el cuarto dominio del receptor de TNF de 55 kDa, lo que sugiere que el lazo de cisteína puede interferir con los efectos apoptóticos y antivirales del TNF. Además, el motivo CX3C de la proteína G puede unirse al receptor de fractalquina (CX3CR1) y se ha demostrado que esta interacción altera la inflamación pulmonar y la respuesta de células T específicas de RSV (McLellan *et al.*, 2013). La glicoproteína de fusión (F) está involucrada en la penetración viral a la célula huésped y subsecuente formación de sincitios. También tiene un papel en la adhesión viral ya que se ha identificado a la proteína del huésped nucleolina como receptor para la proteína F. La glicoproteína F es sintetizada como un precursor de 67 kDa que sufre un procesamiento proteolítico para producir dos polipéptidos unidos por puentes disulfuro, F1 y F2, en los extremos C- y N-terminal, respectivamente. Adyacentes a estas dos regiones están dos secuencias de repeticiones de héptadas, denotadas como HR-C y HR-N, que forman un trímero estable de estructuras tipo horquilla que realizan un cambio conformacional para facilitar que las membranas viral y celular se acerquen antes de la entrada viral (McLellan *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013; Melero *et al.*, 2017). Las dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2) son pequeñas y no tienen homología importante en su secuencia con ninguna otra proteína celular. NS1 y NS2 antagonizan la respuesta celular antiviral y de inducción de interferón (IFN). Juntas, NS1 y NS2 degradan o sequestran

múltiples proteínas de señalización que afectan la inducción y funciones efectores de IFN (Sedeyn *et al.*, 2019; Tripp & Jorquera, 2016).

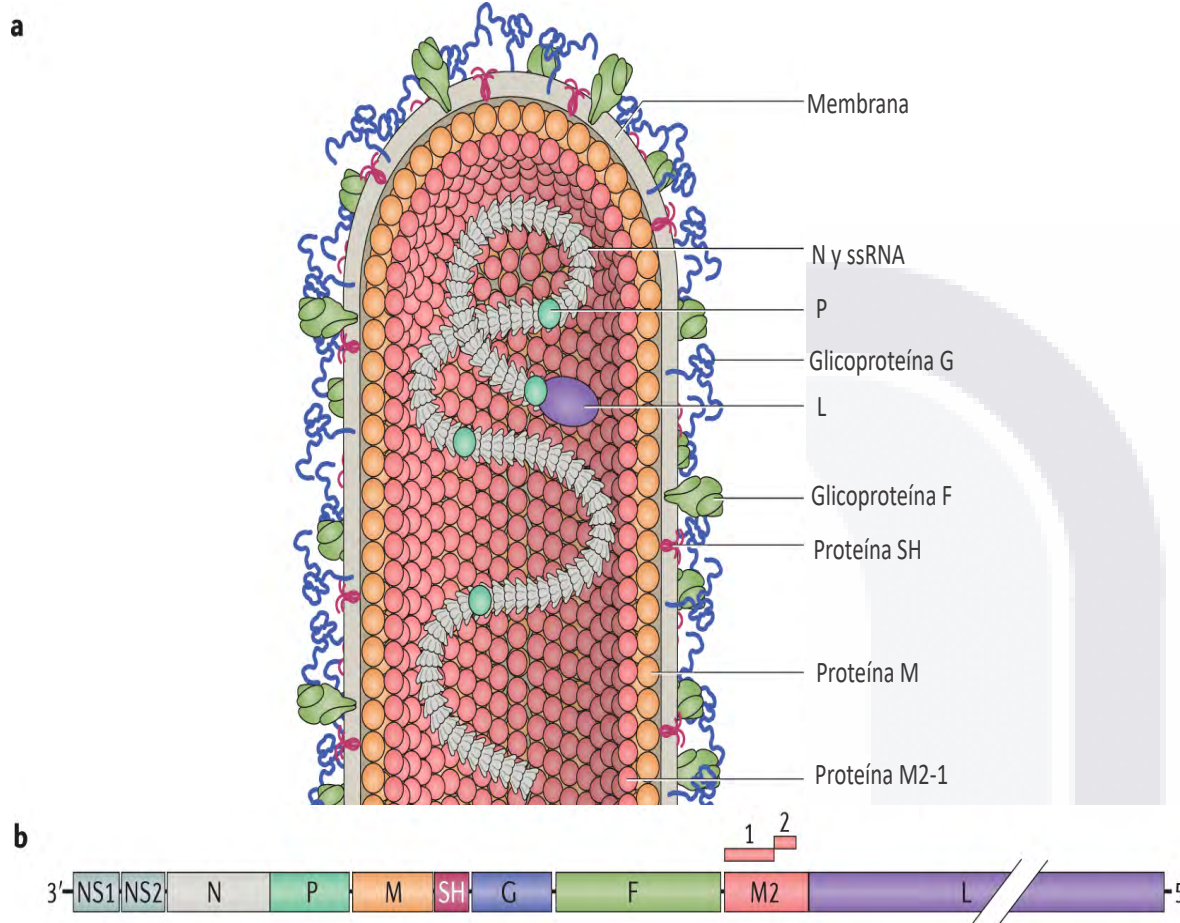


Figura 1. Estructura del Virus Sincitial Respiratorio. La imagen muestra la morfología filamentosa del virión. a) Las glicoproteínas de unión (G) y fusión (F) están incrustadas en la membrana viral, al igual que la pequeña proteína hidrófoba (SH), que funciona como una viroporina. Una capa de proteína de matriz (M) se encuentra debajo de la membrana viral y le da al virión su forma filamentosa. La proteína M2-1, un factor de procesividad de la transcripción, interactúa tanto con la proteína M como con la nucleoproteína (N) que encierra el genoma del ARN viral. La gran subunidad de polimerasa (L) y el cofactor de fosfoproteína polimerasa (P) también están asociados con N. b) Representación gráfica del genoma del virus respiratorio sincitial (RSV). El genoma contiene 10 genes que codifican 11 proteínas, y el gen M2 codifica las proteínas M2-1 y M2-2. Los genes más transcritos son los que codifican la proteína no estructural 1 (NS1) y NS2, que inhiben la apoptosis y las respuestas de interferón. ssRNA, RNA de cadena sencilla. (tomado de Battles & McLellan, 2019).

1.3 Ciclo biológico del RSV

1.3.1 Entrada del virus

El proceso de entrada del virus consta de dos pasos principales: la unión del virión a la célula huésped que corre a cargo en su mayoría por la glicoproteína G y la fusión de sus membranas para liberar la nucleocápside en el citoplasma celular. La unión y entrada del RSV están mediadas principalmente por las glicoproteínas G y F, sin aparente contribución de la proteína SH (Battles & McLellan, 2019; Levine *et al.*, 1987). La glicoproteína F se une a receptores celulares, dentro de los que se han propuesto que favorecen la adhesión del RSV a las células son el receptor tipo Toll (TLR)4, CX3CR1 y proteoglicanos de heparán sulfato. La nucleolina en la superficie celular también está involucrada aparentemente al activar un proceso de endocitosis que depende de su reconocimiento por la proteína F (Griffiths *et al.*, 2017). La entrada ocurre por fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática celular o mediante un proceso de endocitosis. La entrada del virus a través de un mecanismo dependiente de endocitosis permite la entrada de todo el virus, incluida su envoltura lipídica (Krzyzaniak *et al.*, 2013). Luego, el virus se transporta dentro de las vacuolas endocíticas, y se somete a una segunda fusión, esta vez con la propia vacuola, que ocurre cuando la proteína F es escindida por una convertasa similar a la furina, para que el virus pueda infectar la célula (Krzyzaniak *et al.*, 2013). El proceso de fusión de las membranas viral y de la célula huésped recae en la glicoproteína F que representa un factor crítico en la penetración, neutralización y protección, además de la formación de sincitios (Mastrangelo & Hegele, 2013; González-Reyes *et al.*, 2001; Openshaw & Tregoning, 2005) lo que originó el nombre del RSV (Harris *et al.*, 2003; Openshaw & Tregoning, 2005; Walsh & Hruska, 1983) y que permiten la propagación directa del virus. Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que la región conservada central no glicosilada de la proteína G contiene el motivo de quimiocina CXC3 que se une al receptor CX3CR1 lo que facilita la infección por RSV (Tripp *et al.*, 2001). Esta unión induce una fuerte respuesta tipo 2, lo que sugiere que representa una estrategia por parte del virus para modular y evadir la respuesta inmune dada por el hospedero (Bergeron *et al.*, 2021; Johnson *et al.*, 2015).

1.3.2 Replicación y Transcripción

La transcripción del genoma y replicación ocurren en el citoplasma, por lo que el virus puede crecer en células nucleadas y en presencia de actinomicina D, lo que indica que no hay participación del núcleo en el proceso. En general para los miembros de *Mononegavirales*, las nucleocápsides entrantes realizan la transcripción por polimerasas preformadas (transcripción primaria) contenidas en el complejo RNP. La replicación viral y la transcripción se llevan a cabo mediante un único complejo de polimerasa que requiere proteínas N, P y L (Grosfeld *et al.*, 1995; Kiss *et al.*, 2014). Las proteínas N y P solubles disponibles promueven la elongación de productos de replicación de RNA, llevando a la producción de genomas completos. La replicación de RNA genómico ocurre cuando la polimerasa cambia a un modo de lectura en el que no se reconocen las señales de transcripción. Esto da como resultado la síntesis de un intermediario replicativo de sentido positivo, o antigenoma, que sirve como plantilla para nuevos genomas de sentido negativo (Battles & McLellan, 2019; Bukreyev *et al.*, 1997). La procesividad de la transcripción está guiada por la proteína M2-1 (Fearn y Collins 1999b; Collins *et al.* 1996, 1999), ya que puede unirse preferentemente a RNAm de RSV y favorecer la llegada del complejo RNP (Cartee y Wertz 2001; Blondot *et al.* 2012). Los mRNAs del RSV y proteínas pueden ser detectados intracelularmente dentro de las 4 a 6 h después de la infección, y alcanzan un pico de acumulación a las 15 a 29 h. En este punto, la tasa de transcripción puede disminuir en favor de la replicación del RNA y la producción de genomas necesarios para su empaquetamiento, esta transición de la transcripción a la replicación y la producción de RNA genómico parece estar mediada por la proteína M2-2 y posiblemente NS1 (Bermingham y Collins, 1999; Collins *et al.* 1996; Cheng *et al.* 2005). La progenie de genomas promueve la transcripción (transcripción secundaria) y a su vez la replicación de RNA genómico. La transcripción y replicación ocurren simultáneamente (Battles & McLellan, 2019).

1.3.3 Ensamblaje de viriones

Para producir viriones de progenie, el RSV debe coordinar el ensamblaje entre las proteínas traducidas en el citoplasma, las glicoproteínas que han llegado a la superficie celular a través de la vía secretora y el RNA genómico recién sintetizado. Se cree que el

ensamblaje de RNP ocurre dentro de las inclusiones citoplasmáticas virales, ya que se encuentra que las proteínas de la polimerasa viral y el RNA genómico se colocan en estas estructuras (Lindquist *et al.*, 2010). La proteína M se asocia con la membrana plasmática cuando la proteína F está presente. Sin embargo, la proteína G no es necesaria para la generación de virus de la progenie, y M puede localizarse con proteínas F en ausencia de G. El ensamblaje del RSV ocurre en la membrana plasmática (Ghildyal *et al.*, 2006; Henderson *et al.*, 2002). En células polarizadas, esto ocurre en la cara apical. Estas regiones contienen balsas de lípidos modificados por virus con las tres proteínas de superficie y la proteína M. El requerimiento mínimo de proteína viral para la formación de partículas parecidas a virus (VLPs, virus-like particles) capaces de direccionar el genoma viral a las células blanco son las proteínas F, M, N y P, y la expresión de estas proteínas induce la formación de filamentos virales (Mitra *et al.*, 2012). Ambos, genomas y antígenomas se pueden detectar en viriones, sugiriendo que no hay selectividad en el empaquetamiento. Las nucleocápsides que contienen genomas son mucho más abundantes en células infectadas y son correspondientemente más abundantes en viriones (Borchers *et al.*, 2013).

1.3.4 Liberación de progenie viral

El paso final en el ensamblaje viral y la liberación implica un evento de escisión de la membrana para separar la partícula viral ensamblada de la membrana de la célula huésped. Si bien es probable que las proteínas del huésped desempeñen algún papel en la gemación viral, las proteínas virales pueden ser suficientes para realizar la escisión de la membrana para producir viriones libres. La exploración de otros mecanismos de exocitosis celular puede dar una idea de los mecanismos virales de salida en el futuro (Shaikh & Crowe Jr, 2013). La liberación de la progenie viral comienza a las 10 a 12 h post-infección, y alcanza un pico a las 24 h, y continúa hasta que la célula se deteriora entre las 30 y 48 h (Collins *et al.*, 2013).

1.4 Distribución del RSV

Su distribución es mundial y se estima que las infecciones y muertes anuales por RSV en todo el mundo son de 34 millones y 200,000 respectivamente (Nair *et al.*, 2011).

Las epidemias tienen lugar durante los meses de invierno y comienzos de la primavera (Nair *et al.*, 2010).

Los dos grupos antigénicos principales de RSV son A y B. Esto fue demostrado basándose en la reactividad que presentan frente a un panel de anticuerpos monoclonales (MAbs) (Anderson *et al.*, 1985). El grupo A es el más frecuentemente encontrado y el que se asocia a enfermedades más graves, ya que éste no protege al huésped de futuras reinfecciones con este mismo subtipo ni de que sean menos graves (Hall *et al.*, 1990).

1.5 Patogénesis

La transmisión de la infección por RSV ocurre mediante la inoculación de la mucosa nasofaríngea o conjuntival con secreciones respiratorias de individuos infectados. El virus permanece viable en superficies sólidas hasta por 6 horas, en guantes de goma durante 90 minutos y en la piel durante 20 minutos. El período de incubación varía de 2 a 8 días, y los individuos inmunocompetentes pueden eliminar el virus hasta en 3 semanas, aunque en promedio esto se limita a aproximadamente 8 días. Sin embargo, la diseminación viral de individuos inmunodeprimidos puede continuar durante varios meses porque la replicación intracelular no está contenida de manera efectiva por la inmunidad mediada por células específicas (Piedimonte & Pérez, 2014).

La infección por RSV comienza en el epitelio nasofaríngeo, donde causa cuadros de rinitis, sinusitis y otitis, pero luego se disemina rápidamente por transmisión intercelular a las vías respiratorias inferiores, llegando a los bronquiolos terminales, donde la replicación de este virus es más eficiente. El virus infecta principalmente células epiteliales de los alveolos y del tracto respiratorio inferior, causando una inflamación masiva (Collins & Graham, 2008). La infección viral promueve la pérdida de las funciones especializadas de estas células, reduciendo la motilidad de los cilios, promoviendo la apoptosis epitelial e induciendo cambios en la morfología celular (Guo-Parke *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2002). Las consecuencias patológicas directas de la replicación viral lítica incluyen desprendimiento de células epiteliales necróticas, que expone la densa red subepitelial de fibras nerviosas nociceptivas, que forman la rama aferente para el reflejo de la tos. La llegada inicial de neutrófilos polimorfonucleares en las vías respiratorias se reemplaza rápidamente por una infiltración predominantemente linfomononuclear en los tejidos

peribronquiolares y un aumento de la permeabilidad microvascular, lo que lleva a edema e hinchazón submucosos. Las secreciones mucosas aumentan en cantidad y viscosidad y tienden a acumularse debido a la pérdida del epitelio ciliado, lo que produce un taponamiento mucoso generalizado (Nam & Ison, 2019).

Esta serie de cambios inflamatorios agudos que forman la respuesta inmediata a la replicación viral exponencial en los bronquiolos conduce a la obstrucción de las vías respiratorias y al atrapamiento de aire, lo que produce la tríada clínica clásica de sibilancias polifónicas, atelectasia irregular e hiperinsuflación bilateral. Sin embargo, la gravedad y duración de la enfermedad son principalmente una función de la respuesta inmune montada por el huésped (Chatterjee *et al.*, 2021). Los mecanismos inmunitarios innatos proporcionan al tracto respiratorio una primera barrera contra el establecimiento de una infección productiva. Posteriormente, la inmunidad humoral específica y mediada por células juega un papel fundamental en la eliminación de la infección y la atenuación de su curso (Nam & Ison, 2019; Coverstone *et al.*, 2019).

Aunque esta respuesta no da como resultado una protección completa contra la infección posterior, si logra disminuir su gravedad. En los lactantes, los títulos más altos de anticuerpos neutralizantes del RSV derivados de la madre se asocian con un riesgo mucho menor de hospitalización debido al RSV, y este efecto protector puede reemplazarse o potenciarse en lactantes de alto riesgo mediante profilaxis pasiva mediante el uso de anticuerpos monoclonales (Barr *et al.*, 2019). Los linfocitos T citotóxicos son fundamentales en el control de la infección activa y el aclaramiento viral, lo que explica por qué los individuos inmunodeprimidos con inmunidad celular deficiente experimentan una enfermedad por RSV más grave y prolongada y la eliminación del virus la logran en tiempo mucho más prolongados (Terrosi *et al.*, 2007).

1.6 Patología

El RSV es altamente contagioso, puede transmitirse por partículas de aerosol de persona a persona, o por contacto directo de estas partículas de aerosol con la mucosa expuesta, como la conjuntiva (Hall *et al.*, 1980). Después de la infección, el periodo de incubación puede variar entre 2 y 8 días en individuos sanos (Piedmonte & Pérez, 2014).

RSV es el principal agente causal de enfermedades del tracto respiratorio inferior como bronquiolitis, afecta principalmente a la población en los extremos de la vida. Se estima que el 50% de los niños menores de 1 año se contagia por RSV y a la edad de 5 años prácticamente todos los niños han presentado episodios relacionados a la infección por RSV (Kutsaya *et al.*, 2016).

Los factores de riesgo relacionados con el establecimiento de la enfermedad por RSV son parto prematuro, bajo peso al nacer, tabaquismo materno, antecedentes de atopía, edad temprana, título bajo de anticuerpos en suero y afecciones subyacentes; como enfermedad pulmonar o cardíaca crónica o inmunosupresión, vías respiratorias estrechas o reactivas en los que puede causar enfermedad severa asociada a neumonía con altas tasas de mortalidad (80-100%) (Collins *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2015, González *et al.*, 2012).

La infección primaria ocurre aún en presencia de anticuerpos maternos y las reinfecciones pueden presentarse a lo largo de la vida, aunque con la edad disminuyen su incidencia y la gravedad de los síntomas (Glezen *et al.*, 1986). La infección primaria no induce inmunidad protectora de larga duración, por lo que a lo largo de la vida se presentan reinfecciones (Kapikian *et al.*, 1969).

1.7 Manifestaciones Clínicas

El RSV induce infecciones respiratorias agudas del tracto respiratorio inferior (Wright, 2014) con varias manifestaciones que incluyen: neumonía y bronquiolitis acompañadas de varios síntomas como: tos que puede aparecer durante los tres primeros días de inicio de los síntomas, también puede aparecer fiebre $\leq 38^{\circ}\text{C}$, sibilancia y dificultad respiratoria (Pickles *et al.*, 2015; Openshaw & Tregoning, 2005).

En los neonatos la mayoría de las infecciones por el RSV producen solo síntomas respiratorios superiores, probablemente reflejando el efecto protector de los anticuerpos maternos contra la infección del tracto respiratorio bajo (Lambert *et al.*, 2014). En niños mayores de un año y adultos, los cuadros suelen ser leves y en algunos casos, asintomáticos (Shay *et al.*, 2015).

Existen evidencias de que los niños que desarrollan síntomas del tracto respiratorio bajo durante la infección con RSV en el primer año de vida incrementan el riesgo a desarrollar

síntomas parecidos a los de asma durante la edad escolar (Sigurs *et al.*, 2010). El desarrollo del asma se da por infiltración de eosinófilos y neutrófilos. La eosinofilia pulmonar es incrementada con la ausencia de interferón (IFN)- γ (Garofalo *et al.*, 1992).

Se ha demostrado que la región conservada central no glicosilada de la proteína G contiene el motivo de quimiocina CXC3 que se une al receptor CX3CR1 facilitando la infección por RSV (Tripp *et al.*, 2001). Induce una fuerte respuesta Th2, lo que sugiere que representa una estrategia por parte del virus para modular y evadir la respuesta inmune dada por el hospedero (Johnson *et al.*, 2015).

1.8 Respuesta inmune frente al RSV

Bajo condiciones normales, los patógenos inhalados son eliminados vía movimiento mucociliar de las células epiteliales ciliadas. Este mecanismo de defensa es coordinado en conjunto por el recubrimiento aéreo, rico en antioxidantes, defensinas, y lisozimas secretadas por las células Clara y glándulas submucosas, junto con glicoproteínas del moco secretadas por células caliciformes. La infección de vías respiratorias inferiores se caracteriza por exacerbada infiltración de neutrófilos, necrosis de células epiteliales e incrementada producción de moco. El daño no sólo es provocado por la infección en sí misma, también la producción local de citocinas induce el daño del tejido pulmonar. Se ha reportado un incremento en la producción de citocinas de tipo 2 (McNamara *et al.*, 2004; Openshaw, 1995), tales como IL-4, IL-6, IL-9 IL-10 e IL-13 (Bohmwald *et al.*, 2019). Entre estas, la IL-6 es una citocina proinflamatoria la cual juega un papel esencial en la proliferación celular, diferenciación, sobrevivencia e inflamación, además de controlar la acumulación de neutrófilos en el sitio de inflamación (Pyle *et al.*, 2017). La linfopoyetina estromal tímica (TSLP, thymic stromal lymphopoietin) es secretada por células epiteliales y su presencia está fuertemente asociada con la producción de citocinas IL-4, IL-5, IL-13 y TNF- α (Lee *et al.*, 2015; Garofalo *et al.*, 2001; Garofalo *et al.*, 2005). También se genera la producción de quimiocinas durante la infección por el RSV. La quimiocina CCL3 es un quimioattractante y activador de células tales como eosinófilos, monocitos, basófilos y linfocitos. La CCL5 recluta principalmente monocitos, células T y eosinófilos. Finalmente, CXCL8 atrae principalmente neutrófilos, una de las células más frecuentes encontradas en vías aéreas de niños infectados por el RSV (Figura 2). El RSV demostró recientemente que

induce IL-33 (McNamara *et al.*, 2005; Harrison *et al.*, 1999; García-García *et al.*, 2017; Saravia *et al.*, 2015), que es una citocina que desempeña un papel importante en el desarrollo del asma alérgica.

Frente a la presencia de RSV, el huésped responde a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), los cuales activan las respuestas inmunes innatas tempranas en el sitio de infección (Baum & García-Sastre, 2010). Los PRR pueden detectar patrones moleculares característicos de patógenos, incluidos los de virus de RNA como el RSV (Durbin *et al.*, 2013).

El receptor clave que se encuentra en la superficie de las células epiteliales y que reconoce al RSV es el complejo TLR4/CD14, esto mediante la unión con la proteína de fusión F presente en la membrana del virus que permite una respuesta mediada por NF- κ B para que se liberen citocinas como IL-8, IL-6 e IL-10 (Kurt-Jones *et al.*, 2000). Varios estudios han comprobado que el RSV es reconocido por el receptor TLR3 en células epiteliales respiratorias aumentando su expresión, lo cual puede contribuir a incrementar la secreción de citocinas inflamatorias después del contacto con RSV (Groskreutz *et al.*, 2006). El RSV puede predisponer al tejido pulmonar para exacerbar la inflamación tras exposiciones posteriores por virus o bacterias (Stark *et al.*, 2006).

La inducción de IFN tipo I es un paso previo para la activación de la respuesta celular antiviral (Lay *et al.*, 2013), pero, afecta la naturaleza y eficacia de la inducción de la respuesta inmune adquirida (Goritzka *et al.*, 2015). Así mismo, los IFN tipo I modulan la calidad de la respuesta inmune adaptativa contra el RSV promoviendo el desarrollo de un tipo de respuesta Th1 (Durbin *et al.*, 2002).

Últimamente, se ha planteado que los IFN tipo III juegan un papel crucial en la eliminación del virus en el tracto respiratorio, ya que se expresan a niveles más altos que los IFN tipo I en el epitelio nasal en ratones y en células epiteliales de las vías respiratorias humanas (Okabayashi *et al.*, 2011).

Las células T CD8⁺ de memoria reducen la replicación viral, previenen la infección, disminuyen la gravedad de la enfermedad, y confieren protección cruzada contra cepas antigénicamente distintas de RSV (Schmidt & Varga, 2018). Durante la infección por RSV de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), el equilibrio entre el número de células T CD4⁺ y CD8⁺ depende directamente de la relación *in vitro* entre anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes (Kruijsen *et al.*, 2010). Altos niveles de anticuerpos neutralizantes específicos de RSV en suero reduce el riesgo de infección severa por el virus pero no provee de completa protección contra la reinfección (Giménez *et al.*, 1996).

Los niños producen anticuerpos contra la mayoría de las proteínas del RSV (Noor & Krilov, 2018). La infección por RSV induce el desarrollo de anticuerpos IgM, IgA e IgG en sangre y mucosa (Ruuskanen & Ogra, 1993). Estos anticuerpos generalmente se dirigen contra las proteínas F y G para neutralizar el virus (Murphy *et al.*, 1986). Sin embargo, los lactantes <6 meses de edad producen menos anticuerpos contra la proteína F y, por lo tanto, presentan una respuesta neutralizante poco efectiva para RSV (Noor & Krilov, 2018; Nadal *et al.*, 1990).

La respuesta inmune humoral primaria contra el RSV comienza con la inducción del anticuerpo IgM, que generalmente se detecta durante los primeros 5 a 10 días de la infección y persiste en la sangre durante 1 a 3 meses. Sin embargo, en algunos estudios, la respuesta de IgM permanece detectable durante al menos 1 año. Por el contrario, los anticuerpos IgG específicos del RSV se detectan en la mayoría de los pacientes y alcanzan su punto máximo entre 20 y 30 días después del inicio de los síntomas (Ruuskanen & Ogra, 1993). Asimismo, se observa una disminución en el número de anticuerpos neutralizantes específicos del RSV en el suero de los adultos mayores que se correlaciona con un mayor riesgo de desarrollar una infección sintomática por el RSV (Falsey *et al.*, 2005).

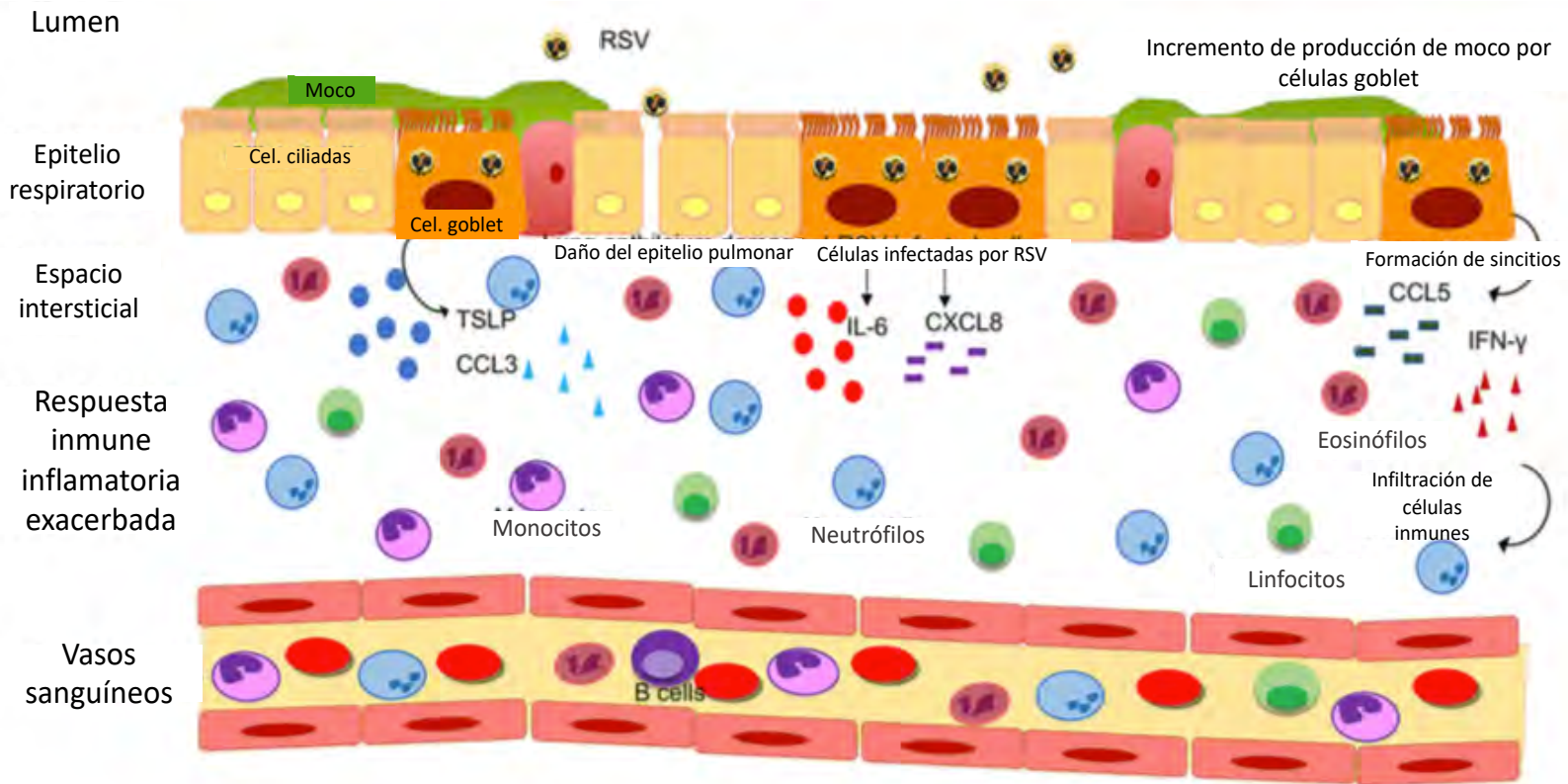


Figura 2. Respuesta inflamatoria del tracto respiratorio inferior inducida por la infección por RSV (tomado de Bohmwald *et al.*, 2019). Una vez que el RSV infecta al tracto respiratorio inferior, las células epiteliales secretan citocinas y quimiocinas inflamatorias (CCL3, CXCL8, CCL-5, IFN- γ y TSLP). Esta respuesta inmune exacerbada promueve la infiltración de células inmunes (monocitos, eosinófilos, neutrófilos, linfocitos) en los pulmones causando una obstrucción de las vías respiratorias por el abundante moco y daño en el tejido pulmonar.

1.9 Enfermedad exacerbada por RSV dependiente de anticuerpos (ADE)

En la enfermedad exacerbada dependiente de anticuerpos (ADE), se ha demostrado que se potencia la infección por el RSV de células que tienen receptores $Fc\gamma$ ($Fc\gamma RIIIA$) principalmente (van Erp *et al.*, 2019; Osioy *et al.*, 1994; Gimenez *et al.*, 1996; Krilov *et al.*, 1987; Domurat *et al.*, 1985), los cuales facilitan la entrada del virus al hospedero, por ejemplo: a macrófagos y células B (Wang *et al.*, 2015). Estas células proveen de mecanismos de latencia o persistencia y que alteran la capacidad de captación y procesamiento de antígenos virales en contexto del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I) (Guerrero-Plata *et al.*, 2001). El dominio Fc característico de los distintos isotipos de anticuerpos (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) representa el principal determinante en las funciones efectoras desarrolladas por los anticuerpos. De estos isotipos, la IgG es el más importante cuando se trata de funciones efectoras mediadas por Fc, ya que este es el único isotipo conocido que interactúa con los $Fc\gamma R$ ampliamente expresados. Mientras que la mayoría de los anticuerpos en suero son del subtipo IgG, la IgA es el isotipo principal presente en las secreciones mucosas.

Además de causar ADE, los receptores Fc reducen la capacidad de neutralización del RSV de la mayoría de los anticuerpos monoclonales, incluidos el palivizumab (van Mechelen *et al.*, 2016), permitiendo que el RSV infecte incluso en presencia de títulos de anticuerpos neutralizantes. Las concentraciones de anticuerpo no neutralizantes o subneutralizantes pueden inducir ADE al formar complejos con el virus y luego poner el virus acomplexado en contacto con los receptores Fc de la superficie celular; esto presumiblemente facilita la entrada del virus en la célula (Halstead, 1982).

Los anticuerpos no neutralizantes pueden formar complejos inmunes con antígenos virales dentro de los tejidos de las vías respiratorias, lo que da como resultado la secreción de citocinas proinflamatorias, el reclutamiento de células inmunitarias y la activación de la cascada del complemento dentro del tejido pulmonar. La inflamación resultante puede provocar la obstrucción de las vías respiratorias y puede causar síndrome de dificultad respiratoria aguda en casos graves.

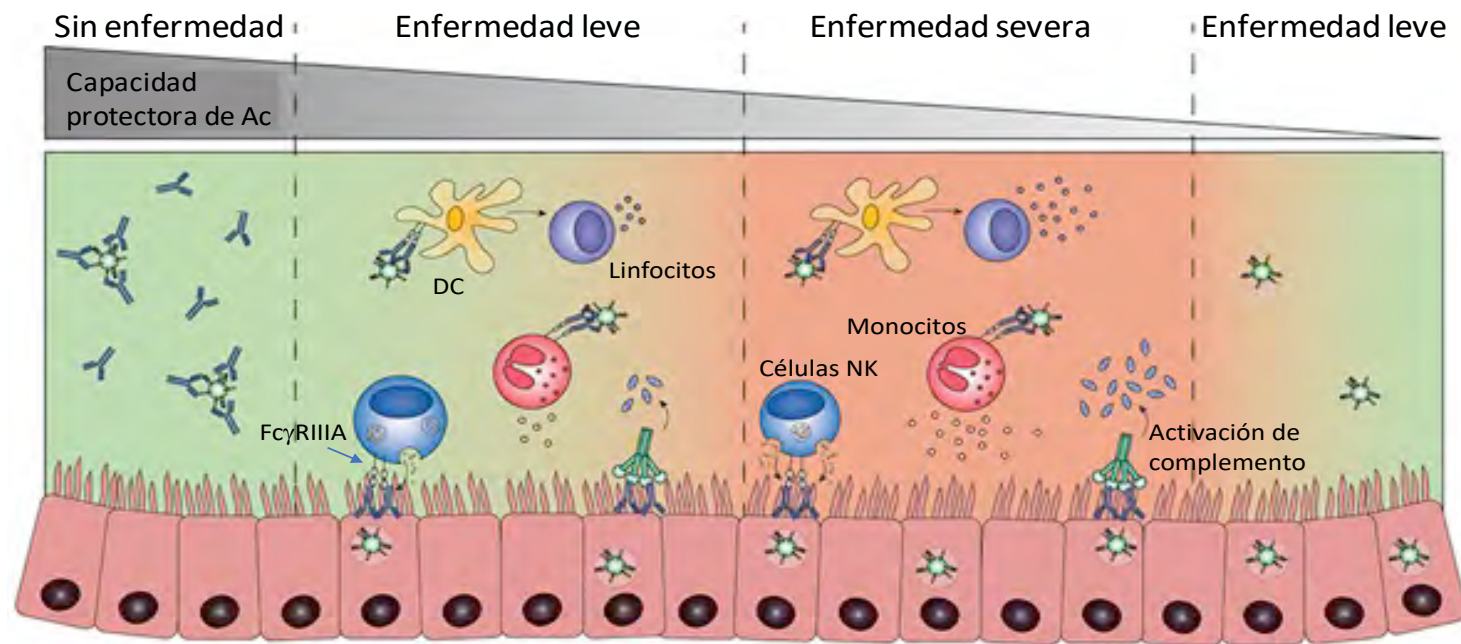


Figura 3. Enfermedad exacerbada dependiente de anticuerpos (ADE). Se refiere a un proceso en el que la presencia de anticuerpos específicos de patógenos contribuye a la gravedad de la enfermedad. Los anticuerpos (Ac) altamente neutralizantes dan como resultado una inmunidad estéril, evitando infecciones y enfermedades (panel izquierdo). La presencia de bajos niveles de anticuerpos protectores permite la replicación viral y conduce a una respuesta inmune mediada por FcγRIIA que puede contribuir a la protección (segundo panel) o potencialmente conducir a una enfermedad más grave (tercer panel), el reclutamiento de células inmunes (monocitos, linfocitos, células dendríticas (DC) y células NK) y la activación de la cascada del complemento dentro del tejido pulmonar, en comparación con la infección en ausencia de anticuerpos (panel derecho) (tomado de van Erp *et al.*, 2019).

1.10 Evasión viral

El sistema IFN tipo I es indispensable en la defensa del hospedero contra el virus, por lo que su evasión es de vital importancia para la supervivencia del RSV (Bossert & Conzelmann, 2002). Proteínas no estructurales como NS1 y NS2 están implicadas en la evasión de la respuesta inmune innata durante la infección por RSV. Se ha visto que participan en la disminución de la expresión de IFNs tipo I, debido a que bloquean la activación del factor 3 regulador del IFN (IRF3) (Spann *et al.* 2005; Swedan *et al.* 2011).

La evasión de la respuesta inmune adaptativa es dada por la mutación de diferentes proteínas virales internas. La mayoría de los virus respiratorios tienen genomas de RNA, la combinación de RNA polimerasa y un alto nivel de renovación viral significa que hay una alta tasa de mutación (Elena & Sanjuan, 2005) dando como resultado infecciones repetidas por la misma familia de RSV durante los picos estacionarios de la enfermedad (Scott *et al.*, 2008), lo que sugiere que la respuesta de memoria que induce puede ser deficiente. Las proteínas de recubrimiento de los virus también pueden alterarse cambiando los patrones de glicosilación (Vigerust & Shepherd, 2007).

Recientemente, se ha descrito que este virus puede afectar el ensamblaje de una sinapsis inmunológica adecuada entre las células presentadoras de antígeno y las células T (Cespedes *et al.*, 2014; González *et al.*, 2008; Barcia *et al.*, 2006; González *et al.*, 2007; Grakoui *et al.*, 1999). Este proceso implica la reorganización de la membrana y las moléculas de señalización intracelular en la célula T, lo que lleva a la polarización de su maquinaria secretora hacia la CPA (González *et al.*, 2007; Grakoui *et al.*, 1999; Kupfer & Singer, 1989). Este evento es necesario para la activación y función eficiente de las células T (Thoulouze *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2004). De esta manera, el RSV hace que las células T no puedan responder correctamente, lo que puede conducir a una respuesta inmune adaptativa deficiente contra el virus y, en consecuencia, reinfecciones (Müller *et al.*, 2006).

1.11 Historia de la generación de opciones terapéuticas para combatir RSV

1.11.1 Vacunas

1.11.1.1 Vacuna de RSV inactivada con formalina (FI-RSV)

En la historia del desarrollo de vacunas para combatir el RSV se han desarrollado varios métodos, no todos han sido exitosos pues el momento no se cuenta con una vacuna que pueda proteger a los niños de las infecciones virales por RSV. De los primeros intentos para desarrollar una vacuna efectiva ha sido el RSV inactivado con formalina (FI-RSV), el cual se administró en niños pequeños en la década de los años sesenta (Kim *et al.* 1969). Los resultados obtenidos no han sido positivos, pues la vacuna no funcionó pues no se generó una respuesta inmune dirigida hacia la protección de los pequeños ya que hubo subsecuentes reinfecciones por RSV. En estos ensayos un gran porcentaje de niños vacunados requirieron de hospitalización y 2 murieron por complicaciones por RSV. A este hecho se le denominó “enfermedad exacerbada” y ha sido replicada en modelos animales (Kim *et al.*, 1976). Dicha enfermedad exacerbada mediada por FI-RSV se ha atribuido a una serie de causas inmunológicas, incluida la deposición de complejos inmunes (Polack *et al.*, 2002), la incapacidad de inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes y la generación de una respuesta inmunitaria exacerbada con sesgo Th2 en ausencia de linfocitos T citotóxicos (Murphy *et al.*, 1986; Kakuk *et al.*, 1993 & Hurwitz, 2011). Esto es consistente con los hallazgos en modelos animales en los que se ha demostrado que el FI-RSV induce respuestas inmunes sesgadas por Th2 y la hipersensibilidad de las vías respiratorias caracterizada por la regulación al alza de IL-4, IL-5, IL-13 e IgE (Killikelly *et al.*, 2016) en respuesta en específico a la proteína G del RSV (Hancock *et al.*, 1996).

1.11.1.2 Vacunas pre-fusión y post-fusión de la proteína F del RSV

La vacunación con proteínas F estabilizadas en una conformación similar a las formas pre ensambladas de la proteína (pre-F), las cuales se ha sugerido dan como resultado la inducción de anticuerpos específicos de pre-F altamente neutralizantes, la cual parece ser más efectiva que la vacunación con proteínas post-F (McLellan *et al.*, 2013; Krarup *et al.*, 2015).

La proteína F del RSV contiene múltiples epítopos de anticuerpos neutralizantes conservados, así como múltiples epítopos de células T CD4+ y CD8+. Patton *et al.*, 2015

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

diseñaron una vacuna contra el RSV que consta de proteína de fusión soluble del RSV (RSV sF) (Tang *et al.*, 2004) formulada con o sin el adyuvante glucopiranosil lípido A (GLA) en una emulsión estable de aceite en agua (SE) [GLA-SE] (Anderson *et al.*, 2010). GLA-SE es un adyuvante de combinación que se dirige a la vía del TLR4 y puede inducir una respuesta inmune celular caracterizada por la producción de IFN- γ (Schneider-Ohrum *et al.*, 2017). En modelos de roedores, RSV F indujo la producción de anticuerpos neutralizantes contra el RSV y células T productoras de IFN- γ específicas de la proteína F, al mismo tiempo que proporciona protección contra la exposición viral. Por lo que, GLA-SE adyuvado a la proteína F indujo respuestas inmunes humorales y Th1 celulares más robustas y de mayor duración en comparación con las proteínas no adyuvadas en primates no humanos. (Lambert *et al.*, 2014; Patton *et al.*, 2015).

1.11.1.3 Vacunas intranasales

Estas vacunas se han dirigido principalmente a adultos mayores, actualmente MEDI-534 se desarrolló a partir del virus atenuado y aún se encuentran en fase I de ensayos clínicos, esta vacuna actúa contra el virus Parainfluenza tipo III y el RSV (Gómez *et al.*, 2009).

Otra opción de inmunización nasal desarrollada ha sido la administración vía nasal en un modelo animal de varios plásmidos que codifican todas las proteínas del RSV, a excepción de la proteína L, en una formulación de nanoesferas asociadas con quitosán, la cual resultó en una reducción significativa de los títulos virales después de la infección por RSV (Hua *et al.*, 2017; Pepini *et al.*, 2017).

1.11.1.4 Vacunas atenuadas y basadas en subunidades

Si bien algunas vacunas atenuadas y basadas en subunidades se han mostrado prometedoras en los ensayos clínicos, un enfoque alternativo, es el diseño de vacunas centradas en el uso de un solo epítipo neutralizante y protector con el objetivo de obtener anticuerpos protectores conocidos sin inducir respuestas desequilibradas de las células T (Jaberolansar *et al.*, 2017). Varios estudios en fase I y II mostraron que la vacuna BBG2Na basada en la subunidad G resultó ser prometedora en cuanto a seguridad e

inmunogenicidad. Se está en espera de los resultados de un estudio de fase III (Hu *et al.*, 2014).

El uso de oligodeoxinucleótidos (ODN) que contienen el motivo CpG como adyuvante de vacunas de subunidades contra el RSV se probó en un modelo animal. La administración simultánea de la proteína F adsorbida con hidróxido de aluminio y ODN-CpG resultó en un incremento significativo en los títulos de neutralización del suero, en la generación de precursores de células NK y una eliminación acelerada de los virus presentes en los pulmones (Littel-van den Hurk *et al.*, 2006).

1.11.1.5 Vacunas de RNA

Un beneficio potencial de las vacunas de RNA es la capacidad de estimular una respuesta inmune innata adecuada; en particular las derivadas de genomas virales son un potente estímulo para los PRR y posiblemente eliminan la necesidad de la administración de adyuvantes requerida para las vacunas de subunidades (Muralidharan *et al.*, 2018).

1.11.2 Tratamientos

1.11.2.1 Terapia con monoclonales (Palivizumab)

Se ha probado que la administración de una versión humanizada de un MAb contra la proteína F del RSV (Palivizumab) tiene como objetivo reducir la probabilidad de infección por RSV en bebés susceptibles (Tripp & Jorquera, 2017). Desafortunadamente, su uso es costoso, limitado para países en desarrollo, se requieren inyecciones periódicas del anticuerpo para su efectividad y existe preocupación sobre la aparición de nuevas cepas virales resistentes (Hall *et al.*, 2009). Esta preocupación tomó fuerza cuando virus resistentes al Palivizumab fueron generados *in vitro* y mostraron resistencia a la profilaxis con esta formulación en un modelo animal (Frogel *et al.*, 2008).

1.11.2.2 Drogas antivirales

Aunque la evidencia experimental indica que el fármaco Ribavirina interfiere de manera eficiente con la transcripción y la replicación viral, los resultados clínicos son desfavorables y su uso se ha dirigido para tratar la infección en un grupo especial de

individuos inmunodeficientes y durante los primeros días de un curso severo de la enfermedad por RSV (Ventre & Randolph, 2007).

Igualmente, entre las drogas antivirales se encuentra BTA9981, la cual inhibe la fusión de la proteína F y de esta forma previene que el virus penetre al interior celular y se encuentra en fase I de ensayos clínicos (Shadman & Wald, 2011).

1.11.2.3 RNA interferencia

Otra estrategia como tratamiento contra las infecciones virales consiste en aprovechar el mecanismo de interferencia contra el RNA. Dicho mecanismo es desencadenado por la presencia de RNA de doble cadena, que es degradado en fragmentos de 21 a 25 nucleótidos (siRNAs) con extremos 5' y 3' característicos por la acción de una enzima parecida a la RNasa III (Román *et al.*, 1997). Entre las drogas antivirales en evaluación que emplean para la infección por RSV se encuentra la estrategia de RNA pequeños de interferencia (siRNAs) los cuales actúan sobre los RNAm, degradándolos y disminuyendo la producción de proteínas virales, se tiene a ALN-RSV01 que se encuentra en fase II de estudios clínicos (DeVincenzo *et al.*, 2010).

1.11.2.4 Inducción de expresión de IFN-γ

El IFN-γ es una molécula clave producida por las células del sistema inmune en la eliminación viral. Ensayos realizados en modelos animales ha demostrado que la administración profiláctica de un plásmido que contenía el gen que codifica para IFN-γ en un modelo de infección en animales resultó en una disminución de la replicación viral e indujo un perfil de respuesta Th1 contra el RSV. El hecho que la infección natural por el RSV es resuelta por una elevada producción de IFN-γ, sugiere que los resultados de este modelo animal podrían tener aplicación en el cuadro humano (Hua *et al.*, 2017).

1.12 LA PROTEÍNA RECOMBINANTE SA-F3X-BBL

Actualmente, el uso de vacunas con subunidades virales o antígenos tumorales fusionados a ligandos, o antígenos potenciadores de la respuesta inmune ha mostrado tener resultados prometedores (Moyle, 2017). En el contexto de la profilaxis frente al RSV o frente a los tumores, la generación de proteínas recombinantes tiene como finalidad la de

promover la generación de una respuesta T citotóxica, a través de la activación de los linfocitos Th1, que está vinculada con la resistencia a la infección por RSV (Srikiatkachorn *et al.*, 1997) o la resistencia antitumoral.

Experimentos alternos a este proyecto, han logrado establecer una estrategia de diseño para la construcción de un vector para obtener la proteína recombinante SA-F3X-BBL. A partir de las bases de datos GenBank se obtuvo la secuencia de la proteína F del RSV y se realizó su optimización para expresión en *Escherichia coli*, usada por su eficiencia transcripcional y traduccional, la estabilidad del vector de expresión y del RNAm transcrito, la localización, la estabilidad proteolítica y el plegamiento del producto génico, así como el crecimiento celular (Jonasson *et al.*, 2002). La síntesis química de la secuencia de la proteína F se obtuvo por la empresa GenScript. La secuencia fue clonada en el vector pUC57 y luego por diferentes pasos de subclonación se generó un vector inducible pET 6xHN-SA-F3X-BBL con un PM = 84.3 kDa.

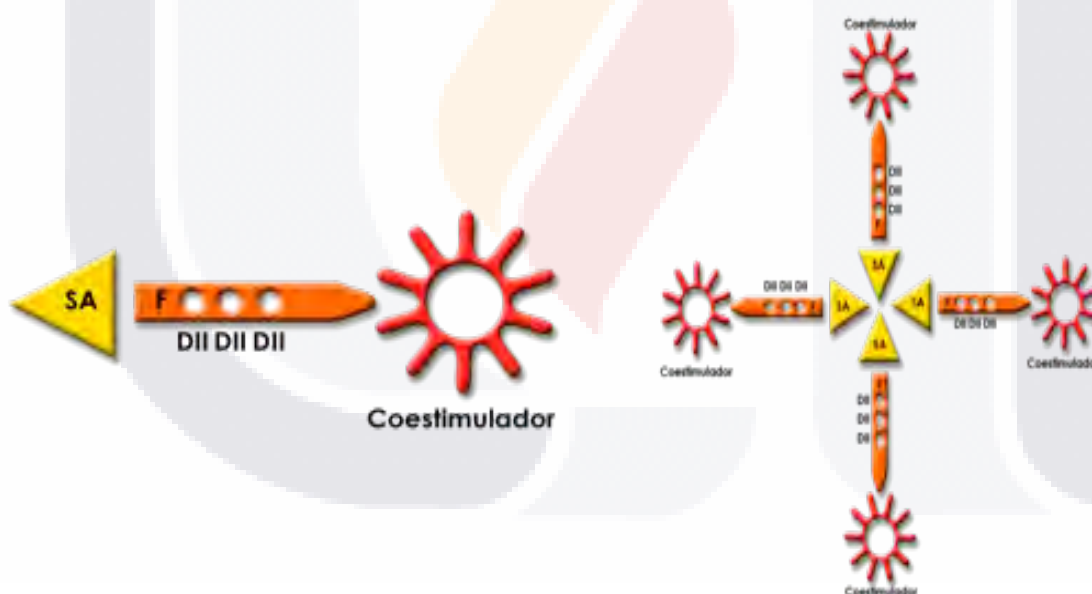


Figura 4. Estructura de la proteína recombinante SA-F3X-BBL y su tetramerización. Configuración de la proteína recombinante SA-F3X-BBL con un peso molecular de 84.3KDa: Core de estreptavidina representado como SA, fragmento de la proteína F del RSV en un tándem de 3 repeticiones del sitio II inmunodominante y un coestimulador 4-1BBL (representado en este proyecto de investigación como BBL). La tetramerización de estas subunidades aumenta la señalización para generar una respuesta citotóxica en contra de la infección por RSV.

A continuación, se detalla la estructura de cada una de las subunidades que conforman la proteína recombinante SA-F3X-BBL y su unión a las proteínas:

Core SA (Estreptavidina)

Promueve la tetramerización del coestimulador que aumenta la señalización para generar protección mediada por células citotóxicas.

F3X

- Fragmento de la proteína F del sitio II (epítipo inmunodominante) con un tándem de 3 repeticiones (García-Barreno *et al.*, 1989).

4-1BBL (TNFRS9 o ligando CD137, denominado BBL en la proteína recombinante)

Esta molécula forma parte de los elementos coestimuladores que se requieren para una eficiente activación de las células T por parte de las CPAs. Es importante recordar, que las DC son un subconjunto de CPAs con potentes propiedades inmunoestimulantes para la inducción de respuestas de células T. Estas células capturan y procesan antígenos, migran a los tejidos linfoides, expresan moléculas coestimuladoras y producen citocinas y quimiocinas que atraen y activan a las células T. Las células T normalmente reciben esta señal coestimuladora mientras están reconociendo antígenos en el contexto de las moléculas del MHC por una CPA (Tan *et al.*, 1999). La interacción de estas moléculas coestimuladoras con sus ligandos constituye la "segunda señal" necesaria para la activación completa de las células T y montar una respuesta inmune eficiente (Oh *et al.*, 2019). Se ha demostrado que varias señales coestimuladoras proporcionadas por miembros de la superfamilia de TNFR aumentan las respuestas de las células T (Arribillaga *et al.*, 2004). Entre ellas se encuentran las mediadas por la interacción 4-1BBL/4-1BB.

El receptor 4-1BB (CD137, superfamilia de receptores de TNF (TNFR) 9) es una glicoproteína de superficie de la familia TNFR que puede inducirse en células como T y NK. La expresión de 4-1BBL (ligando de CD137) se encuentra en la mayoría de los tipos de leucocitos y en algunas células no inmunes. En las células monocíticas (monocitos, macrófagos y DC), la señalización de CD137L induce la activación, migración, supervivencia y diferenciación de las células T (Sanchez-Paulete *et al.*, 2016). Las células

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

T, células B, células progenitoras hematopoyéticas y algunas células malignas también están influenciadas por el coestimulador CD137 (Shao & Schwarz, 2011). 4-1BBL es un potente coestimulador tanto la producción de citocinas Th1 como Th2 y, como tal, no parece desempeñar un papel en la determinación del perfil o nivel de citocinas producidas; más bien, regula el número de células productoras de citocinas (Watts *et al.*, 2005).

4-1BB se expresa en células T CD4 y CD8 activadas, pero, la señal coestimuladora ha demostrado ser más potente para las células T CD8 que para las células T CD4 (Miller *et al.*, 2002; Shuford *et al.*, 1997; Gramaglia *et al.*, 2000). El entrecruzamiento de CD137 aumenta fuertemente la proliferación, la secreción de IFN- γ y la actividad citolítica de las células T (Ye *et al.*, 2014). Además, promueve la secreción de citocinas tipo 1 (IFN- γ , TNF- α e IL-12) e induce células TCD8+ de memoria en humanos que median el aclaramiento viral y proporcionan protección contra infección secundaria por RSV (Schmidt & Varga, 2018).

Un perfil inmune seguro en respuesta a la inmunización contra el RSV combinaría una respuesta de anticuerpos neutralizantes alta con una respuesta celular que esté sesgada por Th1 (Christiaansen *et al.*, 2014; Shaw *et al.*, 2013). Se necesita una respuesta equilibrada Th1 vs Th2 para una vacuna RSV segura y efectiva (Khan *et al.*, 2018)

2. JUSTIFICACIÓN

Dado a que el RSV se considera mundialmente uno de los principales patógenos causantes de infecciones severas del tracto respiratorio inferior, principal causa de morbilidad en niños menores de 2 años y que los tratamientos existentes son costosos y no hay vacuna disponible contra este virus, el presente estudio busca proponer el uso de la proteína recombinante SA-F3X-BBL como inmunógeno para la prevención de esta enfermedad. Debido a que vacunas ya diseñadas inducen una respuesta inmune adversa que genera daño en los pacientes una vez que se enfrentan de forma natural al RSV, resulta de suma importancia la evaluación del tipo de respuesta inmune generada por la proteína recombinante SA-F3X-BBL en un modelo murino, así como su capacidad de aclaramiento del virus luego del reto.

3. HIPÓTESIS

La inmunización de ratones con la proteína SA-F3X-BBL puede generar una respuesta inmune humoral y celular capaz de promover la reducción de la carga viral del RSV.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta inmune protectora activada por la proteína recombinante SA-F3X-BBL en ratones.

4.1. Objetivos Particulares

4.1.1. Evaluar la respuesta de anticuerpos inducida por la proteína SA-F3X-BBL en los ratones.

4.1.2. Determinar el título de anticuerpos neutralizantes en suero de ratones inmunizados a diferentes concentraciones de proteína SA-F3X-BBL.

4.1.3. Desarrollar una estrategia de cuantificación de la carga viral del RSV en una línea celular en presencia o ausencia de sueros de ratones inmunizados con la proteína SA-F3X-BBL

5. METODOLOGÍA

5.1. Propagación del Virus Sincitial Respiratorio

5.1.1. Preparación de células A549 y Vero

Las líneas celulares de células epiteliales de riñón Vero (ATCC CCL-81; donadas por la Dra. María de Jesús Loera Arias de la Universidad Autónoma de León) y carcinoma alveolar inmortalizadas A549 (ATCC CCL-185) se sembraron en medio Dulbecco's modified of Eagle's Medium (DMEM; Corning), respectivamente, adicionados con L-glutamina (2mM) (DMEM F-12; Corning) y suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS) al 10% (GE Healthcare), penicilina 100U/ml, y estreptomicina 100 µg/ml (SIGMA). Se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂ con un 95% de humedad relativa.

5.1.2. Preparación de stocks de RSV

Las alícuotas congeladas de RSV-A (ATCC VR-1580) fueron atemperadas a 37°C e inmediatamente se hicieron diluciones 1:50 (10 µl de la suspensión del virus + 490 µl de medio DMEM sin suplementar). Para realizar el proceso de infección, se partió de una caja de 24 pozos que tenía una monocapa de 300,000 células A549 por pozo, se desechó el medio, se lavaron los pozos con PBS 1X en tres ocasiones. Se agregaron 500 µl de la suspensión viral (stock y dilución 1:50) a dos pozos, otros dos pozos fueron tomados como control por lo que se les agregó 500 µl de medio no suplementado y se dejó incubando 2 h a 37°C con 5% de CO₂. Pasadas las 2 h se agregó a cada pozo 500 µl de medio DMEM suplementado con FBS al 5% (DMEM5) y se observaron al microscopio. Se observaron los cambios cada 24 h en un microscopio invertido en búsqueda de focos citopáticos. Una vez que se ha alcanzado el 80% de efecto citopático (CPE, cytopathic effect), se colectaron el sobrenadante y las células infectadas con RSV de cada pozo y se guardaron en crioviales para almacenarlos a -80°C para su posterior aplicación en la propagación del virus. Estos nuevos viales corresponden a stock de virus preparados en el laboratorio.

5.1.3. Infección en células Vero para propagar RSV

Los stocks de virus preparados en el laboratorio que contenían el RSV se sometieron a 3 procesos de congelación (10 min a -80°C) y descongelación (20 min a 37°C), luego se centrifugaron a 5,000 rpm (6,189 x g) durante 10 min a 4°C. Se separó el sobrenadante del pellet celular y se alicuotó en crioviales. El sobrenadante fue empleado para la infección de células con el virus RSV. El pellet se resguardo a -80°C para posibles usos futuros.

Para iniciar con la producción a gran escala de virus se realizó una infección gradual. En placas de 6 pozos que contenían 150,000 células Vero por pozo con 3 ml de medio DMEM suplementado con FBS al 2% (DMEM2) (confluencia de 70%) se colocaron 2 ml del sobrenadante que contenía el virus, y como control se le agregó a un pozo con células 2 ml de medio sin suplementar. Se dejaron reposar por 3 h a 37°C y 5% de CO₂, pasado el tiempo, se agregaron 2 ml de medio a todos los pozos. Se observaron los cambios día a día mediante microscopio invertido para la búsqueda de un CPE en aproximadamente el 80% de la monocapa de células infectadas por RSV. Una vez logrado, se recuperó el sobrenadante y pellet y se almacenó en crioviales a -80 °C. Para el siguiente proceso de infección se realizaron los 3 pasos de congelación y descongelación mencionados anteriormente. El sobrenadante se empleó para infectar una monocapa de 500,000 células Vero en 5 ml de medio DMEM suplementado con FBS al 3% (DMEM3) en una placa T25. Por último, cuando las placas llegaron a tener el CPE deseado, se escaló a una infección de 3 placas T75 (Corning) con 700,000 células Vero en 10 ml de DMEM3. El CPE se mantuvo hasta el pase 6 de la infección con RSV en células Vero.

5.1.4. Purificación de RSV

Para la purificación de partículas virales del RSV se partió del protocolo propuesto por Arevalo *et al.*, 2016. Los tubos de polipropileno para ultracentrífuga de 5 mL (Beckman-Coulter) se esterilizaron por 15 minutos con luz UV y el rotor de ángulo fijo MLS-50 (Beckman-Coulter) se colocó 1 h antes a 4°C. En tubos cónicos de 15 mL se colocaron 3,5 µl de sobrenadante obtenido anteriormente y se centrifugaron a 5,000 rpm (6,189 x g) durante 10 min a 4°C, y se recuperó el sobrenadante. Se colocaron 3,455 µL de sobrenadante clarificado en cada tubo de 5 mL para ultracentrífuga, se adicionaron 100 µl de aceite mineral estéril y se calibró con el mismo con la ayuda de una balanza analítica

(Precisa). Los tubos calibrados fueron ultracentrifugados a 135,000 x g por 4 h a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y al pellet se resuspendió con 100 µl de PBS 1X con glicerol al 20%, se alicuotaron en 20 µl y se guardan a -80°C para posteriores ensayos.

5.1.5. Titulación del RSV por el método Dosis media de cultivo de tejido infeccioso (TCID₅₀).

Se prepararon 2 placas de 96 pozos con 10,000 células Vero por pozo en 100 µl de DMEM2 y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por 8 h. Durante ese tiempo se hicieron diluciones por duplicado del RSV purificado mantenido en hielo, en microtubos de 2 ml se agregaron 900 µl de medio DMEM sin suplementar al tubo 10⁻¹ y a los tubos de 10⁻² hasta el 10⁻¹² se les agregó 1.8 ml de DMEM suplementado con FBS al 2% (DMEM2). Al tubo 10⁻¹ se le agregaron 100 µl de virus RSV pipeteando de arriba abajo 5 veces para mezclarlo. Cambiando la punta en cada ocasión, se tomaron 200 µl del tubo 10⁻¹ y se agregaron al tubo 10⁻², este paso se repitió hasta el tubo 10⁻¹². Se agregaron 100 µl de cada dilución comenzando por la dilución 10⁻¹² a la 10⁻⁵ en 10 pocillos de cada fila como se muestra en la Figura 6. A los pozos control se les agregó 100 µl de medio DMEM suplementado con FBS al 2% (DMEM2).

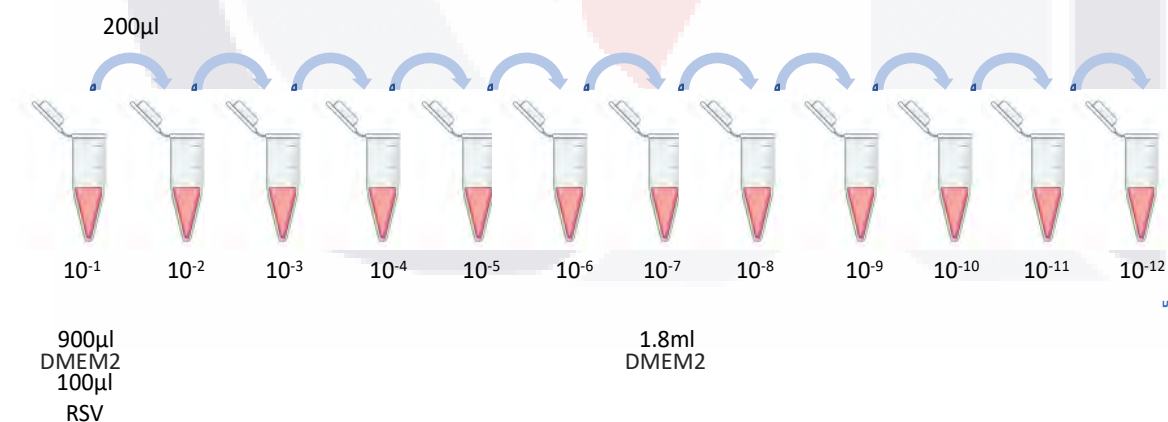




Figura 5. Determinación de la titulación de RSV por el método TCID₅₀. Distribución de pozos con 10,000 células Vero por pozo e infectadas con 100 µl de RSV a diferentes diluciones con DMEM2 para titulación y determinación de PFU/ml de RSV. Los resultados se analizaron tras 10 días de infección observando el efecto citopático (CPE) por medio de microscopio invertido como la relación de pozos positivos que presentan CPE con respecto al control que no fue infectado.

Se incubaron las placas a 37°C y 5% de CO₂ por 6 días y se contaron los pozos que presentaban CPE. Se contaron los pozos que contenían al menos un pequeño CPE y para que el experimento fuera válido todos los controles no debían presentar CPE.

El título de virus se determinó empleando la siguiente ecuación:

$$T = 10^{1+d(S-0.5)}$$

d = Log 10 de la dilución (=1 para diez diluciones)

S = la suma de la proporción de pozos por dilución que presentaban al menos 1 CPE (siempre empezando de la dilución 10⁻¹)

El título obtenido corresponde a TCID₅₀/ml

Para transformar TCID₅₀/ml en PFU/ml, de la siguiente manera:

$$\text{Si } T = 1 \times 10^A \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$$

entonces $T = 1 \times 10^{A-Y}$ PFU/ml,

donde Y es la diferencia de la suma de las proporciones de los duplicados

5.1.6. Estandarización de cantidad de multiplicidad de infección (MOI) de RSV para infectar células Vero.

En una placa de 96 pozos se colocaron 10,000 células Vero en 50 μ l con medio DMEM sin suplementar por pozo. De la titulación del RSV por el método TCID₅₀ se obtuvo 4×10^{10} PFU/ml de RSV (A) se hizo una dilución 1:400 de una alícuota de virus purificado con medio DMEM sin suplementar. En esta dilución se contenían 1×10^{10} PFU/ml. A partir de esa concentración se calculó lo necesario para colocar 10,000, 50,000 y 100,000 PFU/ml (que representaban MOI de 1, 5 y 10 respectivamente) que infectaron a las células Vero por 2 h a 37°C a 5% de CO₂.

5.2. Estandarización de la producción de proteína recombinante SA-F3X-BBL

5.2.1. Transformación de pET-SA-F3X-BBL

Se prepararon células *E. coli* C43 (donadas por María del Refugio Rocha-Pizaña del Tecnológico de Monterrey) calcio-competentes como a continuación se describe. A partir de un cultivo de toda la noche de células C43 se inoculó un matraz con 50 ml de medio LB (Luria-Bertani, peptona de caseína 1 g/100 ml, cloruro de sodio 1 g/100 ml y extracto de levadura 0.5 g/100 ml), y se incubó a 37°C en agitación orbital (150 rpm). Después de 2 h, se determinó la densidad óptica (OD) del cultivo a 600 nm en un SmartSpec Plus (Biorad). Una vez alcanzado un valor de OD de entre 0.4 y 0.6, el cultivo fue enfriado en hielo por al menos 10 min para detener su crecimiento y se centrifugó a 5,000 rpm (6,189 x g) durante 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet de células fue resuspendido en 10 ml de solución de cloruro de calcio (CaCl₂) 0.1 M. La suspensión bacteriana fue incubada en hielo y a 4°C durante 1 h. Luego se centrifugó a 5,000 rpm (6,189 x g) por 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet de bacterias fue resuspendido en 500 μ l de CaCl₂ 0.1 M. En este punto las células obtenidas son consideradas células calcio-competentes y se mantienen en hielo a 4°C.

El plásmido pET-SA-F3X-4-1BBL fue descongelado y a una dilución 1:100 se le adicionaron 100 μ l de bacterias calcio-competentes. La mezcla se incubó en hielo y a 4°C durante 1 h. Luego, las células fueron expuestas a un choque térmico por un cambio rápido del hielo a un baño de agua a 42°C durante 1 min, inmediatamente después la mezcla se regresó al hielo por al menos 2 min. Una vez realizado el choque térmico, se le adicionó al tubo 1 ml de medio LB líquido y se incubó a 37°C con agitación orbital 100 rpm. Luego las células se centrifugaron a 13,000 rpm (13,800 x g) durante 3 min y se resuspendieron en 100 μ l de medio LB para luego ser sembradas en medio agar LB adicionado con 100 μ g/ml de ampicilina. La placa fue incubada a 37°C toda la noche. Pasadas 24 h, se seleccionaron 4 colonias para ser crecidas en 4 ml de medio LB adicionado con 100 μ g/ml de ampicilina, los tubos fueron incubados a 37°C toda la noche.

5.2.2. Extracción de plásmidos

Al día siguiente se realizó extracción de DNA por el método de lisis alcalina de las 4 clonas seleccionadas. Para su obtención, se tomaron 2 ml de la suspensión bacteriana y se centrifugó a 13,000 rpm (13,800 x g) durante 3 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 250 μ l de solución GTE (glucosa 50 mM, Tris-HCL 25 mM, EDTA 10 mM), luego se agregaron 300 μ l de solución de lisis alcalina (SDS 1%, NaOH 0.2N) y se dejó incubando durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 250 μ l de solución alta en sales (acetato de potasio 5 M, ácido acético glacial 11.5 ml, en 100 ml de agua destilada) y se incubó a -20°C por 10 min. Después se centrifugó a 13,000 rpm (13,800 x g) durante 5 min y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo para luego adicionar 750 μ l de isopropanol frío, se incubó a -20°C por 10 min. El tubo se centrifugó a 13,000 rpm (13,800 x g) durante 5 min, se descartó el sobrenadante y al pellet se le agregaron 500 μ l de etanol al 70%, se centrifugó a 13,000 rpm (13,800 x g) durante 3 min y se descartó el sobrenadante para dejar secar la pastilla a 60°C por 3 min. Para resuspender la pastilla se le agregó 30 μ l de agua libre de nucleasas y se incubó a 60°C por otros 3 min. El DNA obtenido fue cuantificado en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.2.3. PCR en punto final

Para comprobar la presencia del plásmido pET-SA-F3X-4-1BBL en cada clona analizada se realizó PCR bajo las siguientes condiciones en el Termociclador 2720 (Applied Biosystems): desnaturalización inicial de 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, temperatura de alineamiento por 30 s de 55°C, y una extensión final de 72°C por 3 min. La secuencia de los oligos empleados fue la siguiente: Fw-4-1-BBL: 5'-ACTTGATGTGGAGGATACCGC-3' y Rv-4-1-BBL: 5'-CGAACATTAACCGCAGGGTA-3'. El producto de PCR fue analizado en un gel de electroforesis en agarosa al 1% con buffer TAE 1x (Tris base 40mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1 mM). El gel fue analizado en el equipo Bio-Imaging MiniBisPro System (DNR) para detectar la presencia del plásmido.

5.2.4. Inducción con IPTG

A 5 matraces con 100 mL de medio LB líquido se les agregó 200 µl de ampicilina (1 mg/mL) + 1 ml de suspensión bacteriana de una clona con el plásmido SA-F3X-4-1BBL, a otro matraz con 100 mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina se le agregó 1 mL de bacterias C43 como control y se incubaron a 37°C en agitación orbital (150 rpm). Se determinó la densidad óptica (OD) del cultivo a 600 nm en un SmartSpec Plus (Biorad). Una vez alcanzado un valor de OD de entre 0.4 y 0.6 se realizó la inducción con IPTG 1mM (Zymoresearch), el cultivo fue enfriado en hielo por al menos 10 min para detener su crecimiento y se centrifugó a 5,000 rpm (6,189 x g) durante 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet de células fue resuspendido en 300 µl de buffer de lisis (PBS pH=7.3, betamercaptoetanol 10 mM (SIGMA), PMSF 1mM (SIGMA), Lisozima 0.2 mg/ml), se dejó incubando por 30 min y después se separaron en microtubos de 2 ml para someterlos a 7 ciclos de sonicación a una potencia de 50% por 10 s con 30 s de descanso entre cada proceso. Se centrifugaron a 13,000 rpm (13,800 x g) durante 5 min a 4°C, se separaron las proteínas solubles (sobrenadante) de las insolubles o cuerpos de inclusión (pellet). Se resuspendió el pellet en 300 µl de buffer de lisis y se dejó incubando durante 30 min. Después de ese tiempo se almacenaron las muestras a -80°C.

5.2.5. Purificación de SA-F3X-BBL

Pasado el tiempo, las proteínas solubles fueron purificadas por un kit de purificación comercial His-Spin Protein Miniprep (Zymoresearch) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se transfirieron 250 µl de His-affinity gel a una columna Zymo-spin y se

centrifuga a 13,000 rpm por 5 a 10 segundos, se agregaron 200 µl de la proteína soluble y se resuspendió el gel por agitación con micropipeta durante 2 min, se centrifugó la columna/tubo colector de 5 a 10 segundos por 13,000 rpm, el sobrenadante se descartó y se colocó nuevamente la columna en el tubo colector y se agregaron 250 µl de His-wash buffer para resuspender el gel y se centrifugó de 5 a 10 segundos, se repitieron los lavados una vez más y se descartó el tubo colector. Se colocó la columna dentro de un tubo de microcentrífuga y se agregaron 150 µl de His-elution buffer y se resuspendió el gel, se centrifugó de 5 a 10 segundos a 13,000 rpm, las proteínas obtenidas se cuantificaron por el método de Bradford a 595 nm.

5.2.6. Análisis de la proteína SA-F3X-BBL por Western Blot

Para evaluar la cinética de expresión de la proteína recombinante SA-F3X-BBL se desarrolló el método de Western Blot de la siguiente forma: las proteínas purificadas del cultivo de *E. coli* transformada se corrieron en un gel de poliacrilamida con sulfato dodecil de sodio (SDS-PAGE) (Bio-Rad) al 7.5% a 120V por 2 h (Bio-Rad), y se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore 0.45 µM) durante toda la noche a 12mA (Bio-Rad). Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se dejaron secar y luego, se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 5% con TBS (NaCl 500 mM, Tris HCl 20 mM) por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron las membranas con un primer anticuerpo monoclonal anti-RSV 1:500 (Abcam) por toda la noche a 4°C. Después, se incubaron 2 h con el segundo anticuerpo proteína de unión (BP) a IgG kappa de ratón m-IgGk BP conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) 1:2,500 (Santacruz). Después de cada incubación con cada anticuerpo se lavaron las membranas 2 veces por 15 min con TBS-T (TBS + Tween 20 (SIGMA) 0.05%). Para el revelado de las membranas se usó un sustrato de quimioluminiscencia Clarity ECL (Bio-Rad). Las membranas fueron analizadas en el equipo MicroChemi 4.2 (DNR).

5.2.7. Identificación de proteínas por tinción con azul Coomassie

Un volumen de 5µl de muestra de la proteína recombinante soluble y purificada a una concentración de 0.193 mg/ml fue resuelta por 2 h a 120V por electroforesis en 7.5% gel de poliacrilamida-SDS-PAGE usando un sistema Mini Protean (Bio-Rad). El gel se cubrió con colorante Coomassie blue 0.1%, disuelto en ácido acético 10%, durante 45 minutos en agitación suave (50 rpm). Luego se lavó con solución desteñidora (ácido acético,

metanol y agua destilada) por 1 h y finalmente se dejó 24 h a 4°C en agua destilada, se escaneó y analizó visualmente.

5.3 Animales experimentales

Se obtuvo un pie de cría de ratones de la cepa C57/BL6 (C57) de entre 6-8 semanas de edad, correspondientes a 6 machos y 12 hembras, adquiridas en la empresa Scientmex (México), los cuales se mantuvieron con alimento completo y balanceado BDL7100 de mantenimiento y agua a libre demanda. Durante el desarrollo de los protocolos los ratones se mantuvieron en jaulas de acrílico a razón de 10 machos por caja en el bioterio central de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) bajo condiciones de luz- oscuridad por 12 h y temperatura controlada de 22-25°C. Todos los experimentos se realizaron bajo la ley interna de cuidado animal de la UAA.

5.3.1. Protocolo de inmunización con SA-F3X-BBL en ratones C57BL/6

Se desparasitaron 25 ratones machos C57BL/6 con 0.0006 ml/g de peso con Drontal puppy, suspensión oral (Bayer) por 3 días y después de ese tiempo se dejaron descansar por 1 semana con alimento completo y balanceado nutricubo (Purina) y agua a libre demanda.

Los ratones se anestesiaron con Sevofluorano solución 100% (PiSA). Antes de la inmunización con la proteína recombinante se tomaron muestras de sangre del seno retro-orbital por medio de un capilar en tubos amarillos microtainer de 600 µl (BD) en el día 0. Los tubos se centrifugaron a 3,500 rpm por 5 min para separar el suero de cada muestra y se guardaron a -80°C en microtubos de 1.5 ml nuevos para posteriores ensayos. La vía de inmunización para la administración de la proteína recombinante SA-F3X-BBL fue la intramuscular (Figura 6A) y en la que se administraron 100 µl a diferentes concentraciones de la proteína con PBS 1X en el día 0 y un refuerzo al día 7. Al grupo control se le administró buffer de elución (50mM buffer de fosfato de sodio ph 7.7, 300mM de cloruro de sodio y 250mM de imidazol) del kit de purificación de la proteína recombinante (ZymoResearch). Los grupos experimentales se clasificaron de la siguiente forma:

- Grupo control (buffer de elución, 100 µl) (n=10)
- Grupo de inmunización (10 µg de SA-F3X-BBL en 100 µl) (n=5)

- Grupo de inmunización (20 μg de SA-F3X-BBL en 100 μl) (n=5)
- Grupo de inmunización (50 μg de SA-F3X-BBL en 100 μl) (n=5)

El esquema de inmunización fue el siguiente:

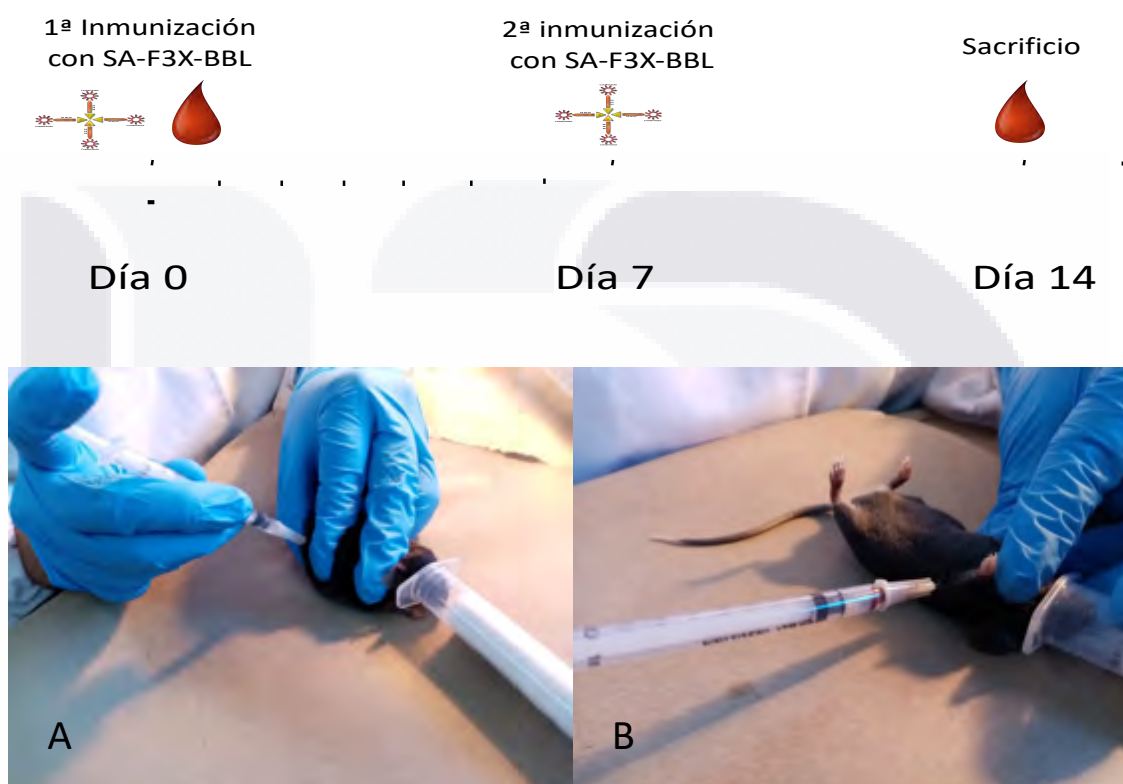


Figura 6. Imágenes de toma de muestra se sangre de ratones C57BL/6 inmunizados y de aplicación intramuscular de la proteína recombinante SA-F3X-BBL. A. Inmunización intramuscular con vehículo para grupos control y con la proteína recombinante SA-F3X-BBL a concentraciones de 10, 20 y 50 μg . B. Toma de muestra de sangre de corazón de los ratones para obtención de sueros en el día Día 14.

El Día 14 se anestesiaron los ratones con Sevoflurano y se tomó muestra de sangre de corazón (Figura 6B) en tubos amarillos microtainer (BD), los sueros se centrifugaron a 3,500 rpm por 5 min para separar el suero de cada muestra y se guardaron a -80°C en microtubos de 1.5 ml nuevos para posteriores ensayos.

5.4. Evaluación de la respuesta de anticuerpos IgG inducida por la proteína SA-F3X-BBL en los ratones por el método de ELISA.

Una vez realizada la inmunización intramuscular de la proteína recombinante SA-F3X-BBL en los ratones C57BL/6, se realizó la cuantificación de respuesta de anticuerpos IgG específico de RSV en los sueros de 5 animales control e inmunizados con la proteína recombinante por duplicado. Para esto se empleó el kit de ELISA, la cual tiene una placa recubierta con antígenos de RSV para la determinación de IgG (Cusabio), se añadieron 10 μ l de suero y 100 μ l de diluyente de muestra (factor de dilución = 10) por pozo en duplicado, se colocaron también 100 μ l de control negativo y positivo, se incubaron por 30 min a 37°C. Se agregó 100 μ l del anticuerpo anti-ratón IgG conjugado con HRP, se incubaron 30 min a 37°C. Luego se descartó el contenido y se lavó cada pozo con 250 μ l de buffer de lavado en 5 ocasiones por 1 min cada una. Se retiró la solución de lavado y después se agregó 100 μ l de sustrato TMB (tetrametilbencidina) a cada pozo y un color azul se desarrolló en proporción a la cantidad de anticuerpo anti-RSV de ratón (IgG) unido desde el primer paso. Se detuvo la reacción con 50 μ l de solución de paro y se leyó a 450 nm (630 nm como referencia). Los datos se representaron como el valor de la absorbancia a 450 nm

5.5 Evaluación de anticuerpos neutralizantes frente a RSV (A) *in vitro*.

5.5.1. Titulación de anticuerpos neutralizantes frente a RSV *in vitro* por SA-F3X-BBL.

Se realizó un ensayo de neutralización viral *in vitro* con suero de animales inmunizados con la proteína recombinante SA-F3X-BBL, como lo propone Piedra et al. 2016. Para esta técnica se emplearon los siguientes componentes:

RSV (A): De la titulación del RSV por el método TCID₅₀ en donde se obtuvo 4×10^{10} PFU/ml de RSV (A) se hizo una dilución 1:100 de una alícuota de virus purificado con medio DMEM sin suplementar y de donde se calculó el MOI=1 que van a infectar a las células Vero.

Sueros: El suero de los 5 animales (obtenidos en el día 14) inmunizados en cada grupo con las diferentes dosis de la proteína recombinante SA-F3X-BBL (10, 20 y 50 μ g) y en los que se buscaron anticuerpos neutralizantes. Todos los sueros se inactivaron a 56°C durante

30 min para eliminar el complemento. Se hicieron diluciones con solución salina isotónica 0.9% (suero puro, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16) por duplicado.

Células susceptibles a la infección por RSV: Se sembraron 10,000 células Vero en medio DMEM sin suplementar, 50 μ l por pozo en placas de 96 pozos.

En placas de 96 pozos, un número fijo de virus 4×10^{10} PFU/ml y con $MOI = 1$ se colocaron en cada pozo (50 μ l por pozo) por duplicado, posteriormente se agregaron las diluciones (50 μ l por dilución y por pozo) de los sueros de los 5 ratones/grupo inmunizados con SA-F3X-BBL y los sueros de los animales controles. Para los controles negativos de la técnica, sólo se agregaron 150 μ l de medio DMEM2 y para los controles positivos se colocaron 50 μ l de RSV (10,000 PFU, $MOI=1$) más 100 μ l de medio DMEM2. Todos los grupos se incubaron durante 2 h a 37°C a 5% de CO_2 . Durante este tiempo, los posibles anticuerpos neutralizantes se unieron de manera específica a la proteína F del RSV. Una vez que se cumplió el tiempo, estos se colocaron en una monocapa de 10,000 células Vero en 50 μ l por pozo y se incubaron a 37°C a 5% de CO_2 por otras 2 h. Luego, se retiró el medio de la reacción (virus+suero+células) y se colocaron 200 μ l de medio DMEM2 y se incubaron a 37° C a 5% de CO_2 por 5 días monitoreando cada 24 h el CPE por medio de un microscopio invertido.

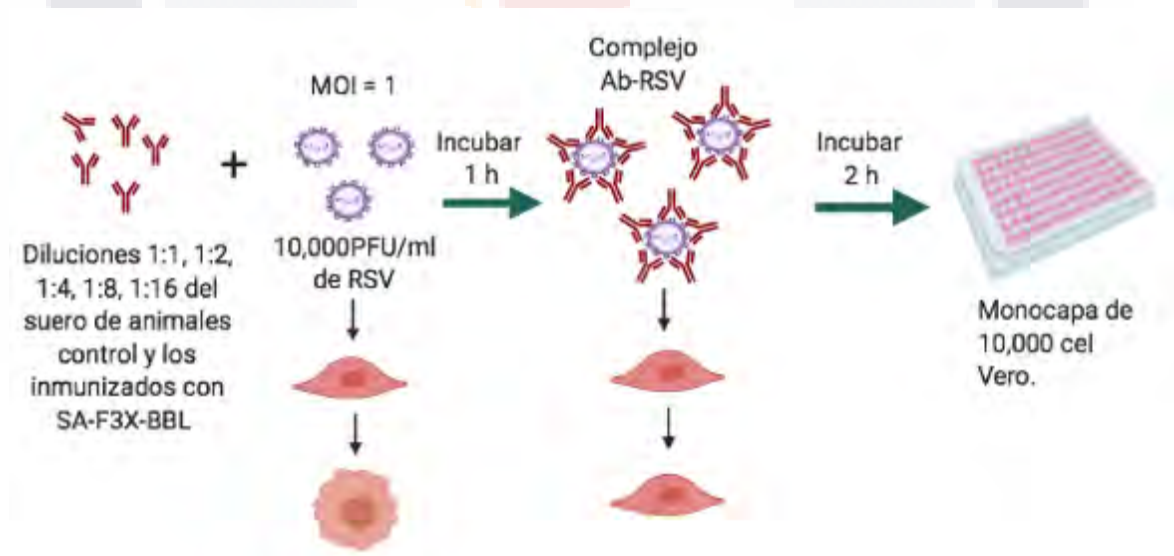


Figura 7. Representación gráfica de proceso de neutralización de los anticuerpos generados por los animales inmunizados con la proteína SA-F3X-BBL frente a la infección por RSV in vitro.

Aquellos virus que no fueron neutralizados pudieron unirse al receptor de la célula e iniciar un proceso infeccioso. Si en el suero hay presencia de anticuerpos neutralizantes contra el RSV (proteína F), estos impidieron que el virus se adsorbiera a las células Vero y no hubo infección, es decir no se observó CPE. El título de anticuerpos neutralizantes del suero se definió como la mayor dilución de suero que no generó CPE en las células Vero (Figura 7).

5.6 Evaluación de la inhibición de la replicación viral con sueros de ratones inmunizados.

5.6.1. Efecto de la inmunización con la proteína recombinante SA-F3X-BBL y evaluación de la inhibición de la replicación viral *in vitro*.

Pasados los 5 días de la infección por RSV *in vitro*, y una vez analizado el CPE, se despegaron las células de cada uno de los pozos de la titulación de anticuerpos neutralizantes y se hizo la extracción de RNA por medio de un kit comercial ZR Viral DNA/RNA (ZymoResearch) siguiendo las instrucciones del proveedor. El proceso seguido fue el siguiente: se agregaron 400 µl de la suspensión celular infectada, más 800 µl de buffer viral DNA/RNA y se mezclaron. Se transfirieron primero 600 µl de la muestra a una columna Zymo-Spin en un tubo colector y se centrifugó a 12,000 rpm (16,000 g) de 1 a 2 min y se descartó el sobrenadante. Después se colocaron los 600 µl restantes en la columna y se centrifugó a 12,000 rpm (16,000 g) de 1 a 2 min y se descartó el sobrenadante. Después se agregaron 500 µl de buffer de lavado viral a la columna y se centrifuga por 2 min a 12,000 rpm (16,000 g) y se descartó el sobrenadante. Se centrifugó por 2 min con la tapa abierta para eliminar completamente el etanol contenido en la solución de lavado y se transfirió la columna dentro de un tubo limpio libre de nucleasas. Finalmente, se agregaron 20 µl de agua libre de nucleasas a la matriz de la columna y se centrifuga por 30 segundos, después se cuantificó por NanoDrop para determinar la cantidad de RNA (RSV) presente en cada muestra. El RNA obtenido se cuantificó con el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Se realizó una retrotranscripción de las muestras para obtener cDNA con el kit Maxima first strand cDNA synthesis for RT-qPCR (Thermo Scientific) de la siguiente forma: 4 µl de buffer de reacción 5X, 2 µl de Maxima Enzyme mix y 14 µl de RNA con las siguientes

condiciones: una temperatura de templado de 25°C por 5 min, temperatura de extensión de 37°C por 60 min, y una inactivación de la transcriptasa reversa de 70°C por 5 min. Se guardaron las muestras de cDNA a -80°C para el ensayo de PCR en tiempo real.

5.6.2. Clonación de un fragmento de los genes NS1 y NS2 y estandarización de PCR cuantitativa.

La parte metodológica que se muestra a continuación se desarrolló con la finalidad de obtener un plásmido de DNA que contenga un fragmento de los genes NS1 y NS2 (que representan un genoma viral completo) para desarrollar una curva estándar que permitió cuantificar mediante PCR cuantitativa en tiempo real la carga viral en los cultivos infectados por RSV.

A partir de 100 µl del sobrenadante de RSV propagado en células Vero del último pase infectivo, se realizó la extracción de RNA viral empleando el estuche ZR Viral DNA/RNA (ZymoResearch) siguiendo las instrucciones del proveedor. El proceso seguido fue el siguiente: se agregaron 100 µl del sobrenadante de las células infectadas más 200 µl de buffer viral DNA/RNA y se mezclaron. Se transfirió a una columna Zymo-Spin en un tubo colector y se centrifugó a 12,000 rpm (16,000 g) de 1 a 2 min y se descartó el sobrenadante. Después se agregaron 500 µl de buffer de lavado viral a la columna y se procedió tal y como se indica en el apartado 6.6.1 hasta la cuantificación del RNA (RSV) presente en cada muestra. A partir del dato de concentración del RNA viral del RSV, se realizó la retrotranscripción del RNA bajo las siguientes características: 224 ng de RNA viral, 1 µl de random hexamer (50 µM), 4 µl de Buffer 5X, 1 µl de ribo lack RNAsa inhibidor, 2 µl de dNTP Mix y 2 µl de la enzima transcriptasa reversa (Thermo Scientific). Las condiciones en el Termociclador 2720 (Applied Biosystems) fueron las siguientes: una temperatura de templado a 25°C por 5 min, temperatura de síntesis de 37°C por 60 min, y una inactivación de la transcriptasa reversa a 70°C por 5 min. Al producto de la retrotranscripción se le hizo una PCR cuantitativa en tiempo final bajo las siguientes características: 10 µl de Buffer, 2 µl de oligonucleótido Fw-NS1 (5 µM), 2 µl de oligonucleótido Rv-NS2 (5 µM), 22.4, 44.8 y 67.2 ng de cDNA obtenido de la RT-PCR y se completó con agua libre de nucleasas para tener un volumen final de 20 µl. La secuencia de los oligos empleados fue la siguiente: Fw-NS1: 5'-CACTGCTCTCAACCTAATGG-3' y

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Rv-NS2: 5'-GGTGTGGTGTTCATTGTGTGT-3'. Ambos oligos hibridan en genes distintos dentro del genoma de RSV, por lo que la generación de este amplicón se deberá exclusivamente a la detección de RNA genómicos del virus. Las condiciones en el Termociclador 2720 (Applied Biosystems) fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, temperatura de alineamiento por 30 s de 50°C, y una extensión final de 72°C por 3 min. El producto de PCR fue analizado en un gel de electroforesis en agarosa al 2% con buffer TAE 1x (Tris base 40mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1 mM). El gel fue analizado con el equipo de detección y cuantificación de ácidos nucleicos Bio-Imaging MiniBisPro System (DNR) y revelado con GelRed (Biotium). Posteriormente, se purificaron las bandas del gel en base al protocolo de purificación comercial GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del proveedor. El proceso fue el siguiente (todos los procesos de centrifugación fueron a 13,000 rpm (12000 x g): se cortó la banda que contenía el DNA, se colocó en un microtubo de 1.5 ml y se pesó en balanza analítica. A los 300 µl obtenidos se le agregaron 300 µl de buffer de unión y se agitó con vórtex para mezclarlo, después se agregaron los 600 µl de esta mezcla a las columnas de purificación GeneJET, se centrifugaron por 60 segundos y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 700 µl de buffer de lavado a la columna de purificación, se centrifugó por 60 segundos, se descartó el sobrenadante y se volvió a colocar la columna en el tubo colector. Se realizó otro proceso de centrifugación por 1 min pero ahora con la tapa abierta para eliminar cualquier residuo del buffer de lavado, después se transfirió la columna a un tubo de 1.5 ml de microcentrífuga, se agregó 50 µl de buffer de elución a la columna, se centrifugó por 1 min y se cuantificó el DNA obtenido en el equipo de NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Una vez obtenido el fragmento purificado se realizó una reacción de clonación usando el sistema CloneJET PCR Cloning en una reacción con las siguientes características: 10 µl de buffer de reacción 2x, 7 µl de amplicón de PCR purificado, 1 µl de vector de clonación pJET1.2/blunt (50 ng/µl) y 1 µl de T4 DNA ligasa (10 U/µl). La ligación se desarrolló durante 30 min a temperatura ambiente. Luego la reacción se conservó a -20°C hasta su posterior uso.

Se prepararon células *E. coli* DH5α (donadas por María del Refugio Rocha-Pizaña del Tecnológico de Monterrey) calcio-competentes siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.2.1 Posteriormente, la reacción de ligación generada (fragmento NS1-NS2 de 270 pb clonado en pJET1.2/blunt de 2,974 pb) fue descongelada y se le adicionaron 100 µl

de bacterias calcio-competentes y se repitió el procedimiento descrito en el apartado 6.2.1, con la diferencia de que una vez transformadas las células se seleccionaron 5 colonias para ser crecidas en 4 ml de medio LB adicionado con 100 µg/ml de ampicilina durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se realizó extracción de DNA por el método de lisis alcalina de las 5 clonas seleccionadas, partiendo de 1 ml de la suspensión bacteriana y desarrollando el procedimiento descrito en el apartado 6.2.2. El DNA obtenido fue cuantificado en un Nanodrop 2000 y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Para comprobar la presencia del inserto de fragmento NS1-NS2 se realizó PCR bajo las mismas condiciones previamente mencionadas, pero empleando como templado 10 ng de DNA de cada una de las clonas seleccionadas. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X y teñido con GelRed. El gel fue analizado en el equipo Bio-Imaging MiniBisPro System (DNR).

Una vez comprobado y seleccionada una clona generada, a partir de 1 ml del medio de cultivo crecido de la clona se realizó la extracción de DNA plasmídico empleado el estuche Zyppy Plasmid Miniprep kit (ZymoResearch). El DNA obtenido se cuantificó en ng/µl con el equipo NanoDrop 2000. A partir del dato de concentración y tamaño molecular del plásmido se realizó el cálculo de número de copias/µl obtenido partiendo de la siguiente ecuación:

$$\text{Número de copias/}\mu\text{l} = [\text{concentración}(\text{ng}/\mu\text{l}) * 6.022 \times 10^{23}(\text{número/mol})] / [\text{long. Plásmido}(\text{pb}) * 1 \times 10^9(\text{ng/g}) * 650(\text{g/mol de pb})]$$

Donde la cantidad de DNA (en ng/µl) se multiplica por 6.022x10²³ moléculas/mol que es el Número de Avogadro; El producto se divide entre el producto de la longitud del plásmido (pb) multiplicado por 650 g/mol que es el peso medio en g de un par de bases (pb), y multiplicado por 1x10⁹ para convertir a ng.

5.6.3. Curva estándar del fragmento NS1 y NS2 para determinar la carga viral por qPCR

Para la generación de una curva estándar se realizaron diluciones seriadas para obtener 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10 copias/µl de plásmido, que representan copias

de genomas de virus por la presencia de los genes NS1 y NS2. Para la reacción de PCR en tiempo real, se realizó la siguiente mezcla de reacción por duplicado para estándar y por triplicado para las muestras: 5 μ l de SyBr Green/ROX qPCR MasterMix, 1 μ l de oligonucleótido Fw-NS1 (5 μ M), 1 μ l de oligonucleótido Rv-NS2 (5 μ M), 1 μ l de cada dilución del estándar y 2 μ l de agua libre de nucleasas. La reacción se desarrolló en el equipo StepOnePlus (Applied Biosystem) con la siguiente programación: desnaturalización inicial de 95°C por 3 min, 40 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s y una extensión final de 72°C por 3 min, con análisis de desnaturalización de 95°C por 15 s, 60°C por 1 min, una rampa de detección cada 0.5°C de incremento de temperatura, y 95°C por 15 s.

Los datos fueron analizados en una curva de regresión lineal generada con los datos de los estándares para determinar la cantidad de genomas de RSV que presentaba cada monocapa infectada con la mezcla de virus y sueros de los animales control e inmunizados con SA-F3X-BBL a diferentes concentraciones. Al interpolar los resultados con la curva estándar se obtuvo la cantidad de copias de RSV, pero para normalizar todos los resultados se tomó como estándar 10 nanogramos (ng) de muestra de cDNA y así poder obtener un dato real de la cantidad de genoma viral presente en las muestras. Los datos se muestran en el Anexo A.

5.7. Análisis estadístico

Los datos se representan como la media $\pm$ el error estándar de la media. Todos los análisis fueron realizados con el software GraphPad Prism versión 7.0 (GraphPad). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía con un análisis *post-hoc* de Dunnet cuando se compararon los diferentes grupos respecto a un grupo control o de Tukey para comparación múltiple entre grupos, con un intervalo de confianza del 95%, y considerando un valor $p < 0.05$ como significativo. Para evaluar la carga viral en cada dilución de cada grupo se empleó ANOVA de 2 vías y un análisis *post-hoc* de Tukey para comparación múltiple entre grupos.

6. RESULTADOS

6.1 Propagación de Virus Sincitial Respiratorio

Inicialmente se propagó el RSV en células A549 con medio DMEM3 en placas de 6 pozos. Una vez que se pudo obtener la donación de la línea celular Vero, se fue escalando el crecimiento del virus en células Vero en placas T25 y en T75. Las células HEp2 es la línea celular de predilección para la propagación del virus, pero la baja pureza de esta línea está en duda (Thornhill *et al.*, 2020), por lo que se usaron las líneas celulares Vero y A549 ya que permiten el mantenimiento, la supervivencia y la multiplicación del RSV, conservando sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas en mayor proporción. En cada paso de infección, se observó que a las 48 h post-infección (h.p.i) fue el tiempo cuando el CPE se presentó en aproximadamente el 80% de la placa.

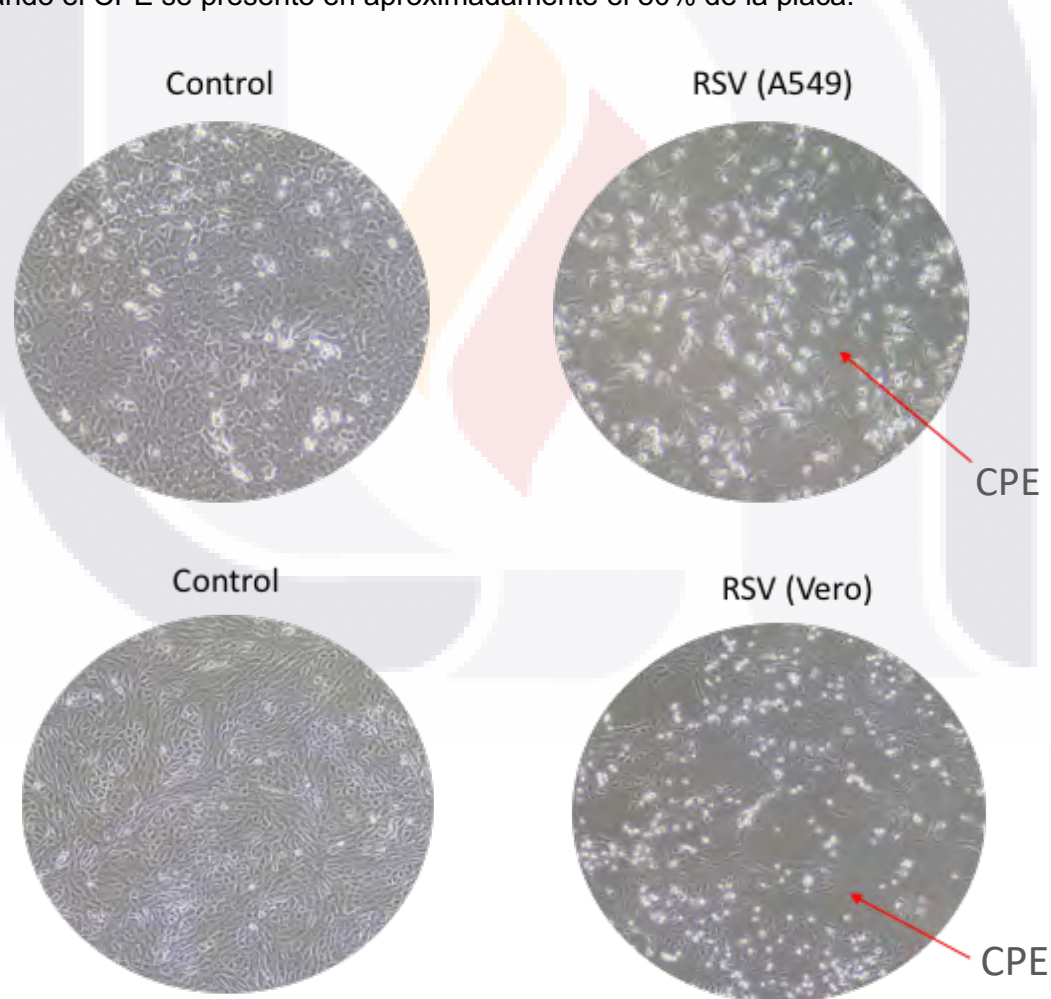


Figura 8. Propagación del Virus Sincitial Respiratorio (RSV) en células A549 y Vero. Se observa el efecto citopático (CPE) al 80% a las 48 h post infección (h.p.i.) en cada pasaje de la infección con el virus. Del lado izquierdo se muestra un control en células A549 y Vero sin la presencia de sincitios.

Una vez escalada la infección de virus en 3 placas T75, los sobrenadantes fueron clarificados para eliminar restos celulares por centrifugación, posteriormente se realizó un proceso de ultracentrifugación que permitió concentrar todas las partículas virales en un pellet. Para realizar la conservación adecuada de estos virus a -80°C , se resuspendieron en buffer PBS que contenía glicerol al 20%.

6.2 Titulación del RSV por el método Dosis media de cultivo de tejido infeccioso (TCID₅₀)

Una vez que se realizó la propagación del virus, se procedió a realizar la titulación en PFU/ml por medio del método TCID₅₀ en infección en células Vero. Para la determinación de la concentración de virus en el stock, una alícuota del stock fue diluida en el rango de 10^{-5} a 10^{-12} , cada dilución fue empleada para infectar 10 pocillos con 10,000 células Vero. Como ejemplo, podemos mencionar que luego de 10 días de incubación se logró observar que el CPE se presentaba en los 10 pocillos de las diluciones 10^{-5} y 10^{-7} (proporción de 1.0), en los pozos de 10^{-6} sólo un pozo no tuvo efecto citopático, dando una proporción de 0.9 para esa serie de datos. A partir de estas diluciones, a medida que se incrementa la dilución del stock, se disminuía la proporción de pocillos con CPE. Estos datos permitieron calcular el número de PFU presentes en el stock viral. En la figura 9 se muestran la distribución de los pocillos de mayor a menor concentración de RSV los cuales presentaron al menos un CPE a lo largo de los 10 días de ensayo, evaluadas con microscopio. También se muestra el pocillo control el cual se mantuvo sin CPE durante el transcurso del tiempo, ya que estos permanecieron sin contacto con el RSV. Finalmente, se realizó el conteo de la proporción de los pozos que presentaron al menos un CPE en cada pozo y en su duplicado.

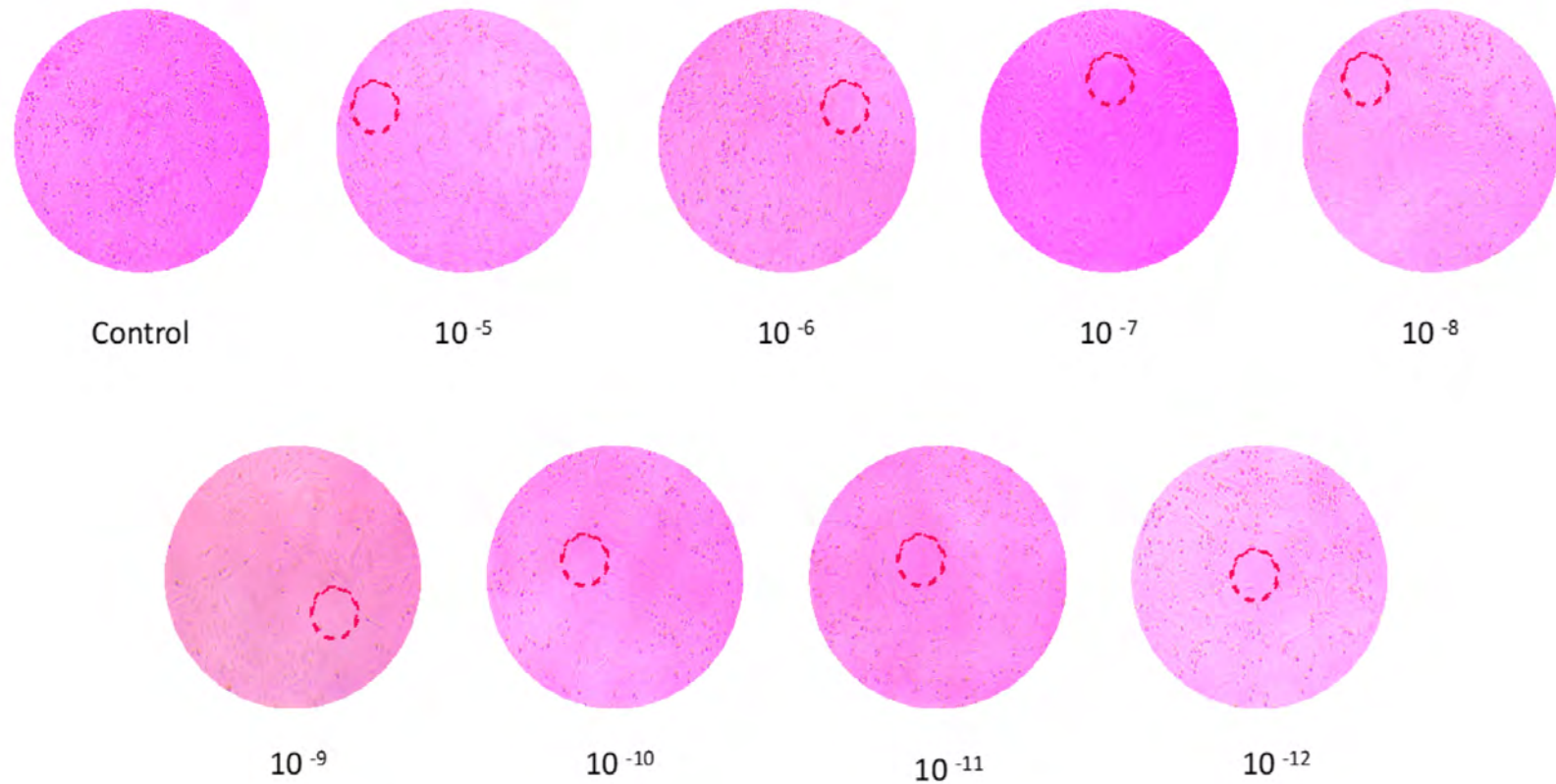


Figura 9. Titulación del RSV por el método TCID₅₀ in vitro. Células Vero incubadas con el RSV a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂, n=10 pozos por dilución. La línea punteada representa el área que presentaba CPE a lo largo de 10 días y se analizaron por el método TCID₅₀ al evaluar la proporción de CPE por pozo obteniendo 4×10^{10} PFU/ml de RSV.

El título de RSV se calculó tomando la proporción de pozos positivos por fila y se incluyeron las diluciones más bajas en los cálculos pero que no se cargaron en la placa de 96 pozos, bajo el supuesto que a menores diluciones también se observaría CPE (Tabla 1). El título de RSV se determinó al observar la última dilución que presentaba CPE en las células Vero.

Tabla 1. Proporción de pozos que presentan CPE para titulación de RSV en células Vero por el método TCID ₅₀ .		
DILUCIÓN	PROPORCIÓN (PLACA 1)	PROPORCIÓN (PLACA 2)
10 ⁻¹²	7/10=0.7	6/10=0.6
10 ⁻¹¹	7/10=0.7	6/10=0.6
10 ⁻¹⁰	7/10=0.7	7/10=0.7
10 ⁻⁹	10/10=1	8/10=0.8
10 ⁻⁸	9/10=0.9	10/10=1
10 ⁻⁷	10/10=1	10/10=1
10 ⁻⁶	10/10=1	9/10=0.9
10 ⁻⁵	10/10=1	10/10=1
10 ⁻⁴	10/10=1	10/10=1
10 ⁻³	10/10=1	10/10=1
10 ⁻²	10/10=1	10/10=1
10 ⁻¹	10/10=1	10/10=1
	S = 11	S = 10.6

Con la siguiente fórmula se despejan los valores de la cantidad de pozos que presentaron CPE.

$$T = 10^{1+d(S-0.5)}$$

D = Log 10 de la dilución (=1 para diez diluciones)

S = la suma de las proporciones (siempre empezando de la dilución 10^{-1}). Se sacó el promedio de la suma de las proporciones de las dos placas analizadas dando como resultado: $(11 + 10.6) / 2 = 10.8$

Se sustituyó este valor S en la fórmula y se obtuvo la dosis de RSV que infecta el 50% del cultivo celular Vero por ml.

$$T = 10^{1+d(S-0.5)}$$

$$T = 10^{1+1(10.8-0.5)}$$

$$T = 10^{1+10.3}$$

$$T = 1 \times 10^{12.3} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$$

El título determinado por TCID_{50} es 0.7 log veces mayor que el determinado por el ensayo de placa. Para transformar $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ en PFU/ml por lo que, se restó 0.7 al log de TCID_{50} .

$$T = 10^{11.3} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$$

$$T = 1 \times 10^{11.3-0.7} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$$

$$T = 1 \times 10^{10.6} \text{ PFU}/\text{ml}$$

$$T = 1 \times 10^{10} \times 10^{0.6} \text{ PFU}/\text{ml}$$

$$T = 4 \times 10^{10} \text{ PFU}/\text{ml}$$

El stock obtenido en el laboratorio tuvo una concentración de $4 \times 10^{10} \text{ PFU}/\text{ml}$, este dato fue empleado posteriormente para calcular la dilución y volumen necesario para infectar células Vero a una MOI determinada, por ejemplo, una MOI de 1 significa que las células se infectan a razón de una PFU por cada célula Vero, en una MOI de 10 se usan 10 PFU para infectar una célula Vero.

Se realizó una estandarización de la infección de células Vero con RSV. En este experimento se observó que las MOI de 10 y 50 induce un CPE dentro de 24 y 48 h.p.i, lo cual resulta no adecuado cuando se quiere evaluar el título y replicación del RSV. La infección con una MOI de 1 permitió observar una progresión lenta de la citopaticidad del virus por al menos 5 días, tiempo recomendado para evaluar su carácter replicativo. Basado

en la condición de MOI de 1, con DMEM2 y 10,000 células Vero, se realizaron los ensayos de inhibición de la replicación viral y titulación de anticuerpos neutralizantes.

6.3 Estandarización de la producción de la proteína recombinante SA-F3X-BBL.

La proteína recombinante fue obtenida en un sistema de expresión procarionte. Las células *E. coli* C43 fueron transformadas con el plásmido pET-SA-F3X-BBL. Luego de la inducción con 1 mM de IPTG, se realizó la extracción de proteínas en sus fracciones solubles, para luego ser purificadas en columna de intercambio iónico. La proteína SA-F3X-BBL contiene en su extremo amino terminal una etiqueta de 6 histidinas y 6 lisinas que favorecieron la purificación de la proteína en columnas con níquel. En la figura 10 se muestra la inmunodetección de la proteína recombinante SA-F3X-BBL con un peso molecular de 84.3 KDa. La concentración de proteína obtenida fue de 0.193 mg/ml, con un rendimiento del 5.6% y fue la que se usó para ser administrada en ratones C57BL/6 bajo el esquema de inmunización establecido en metodología.

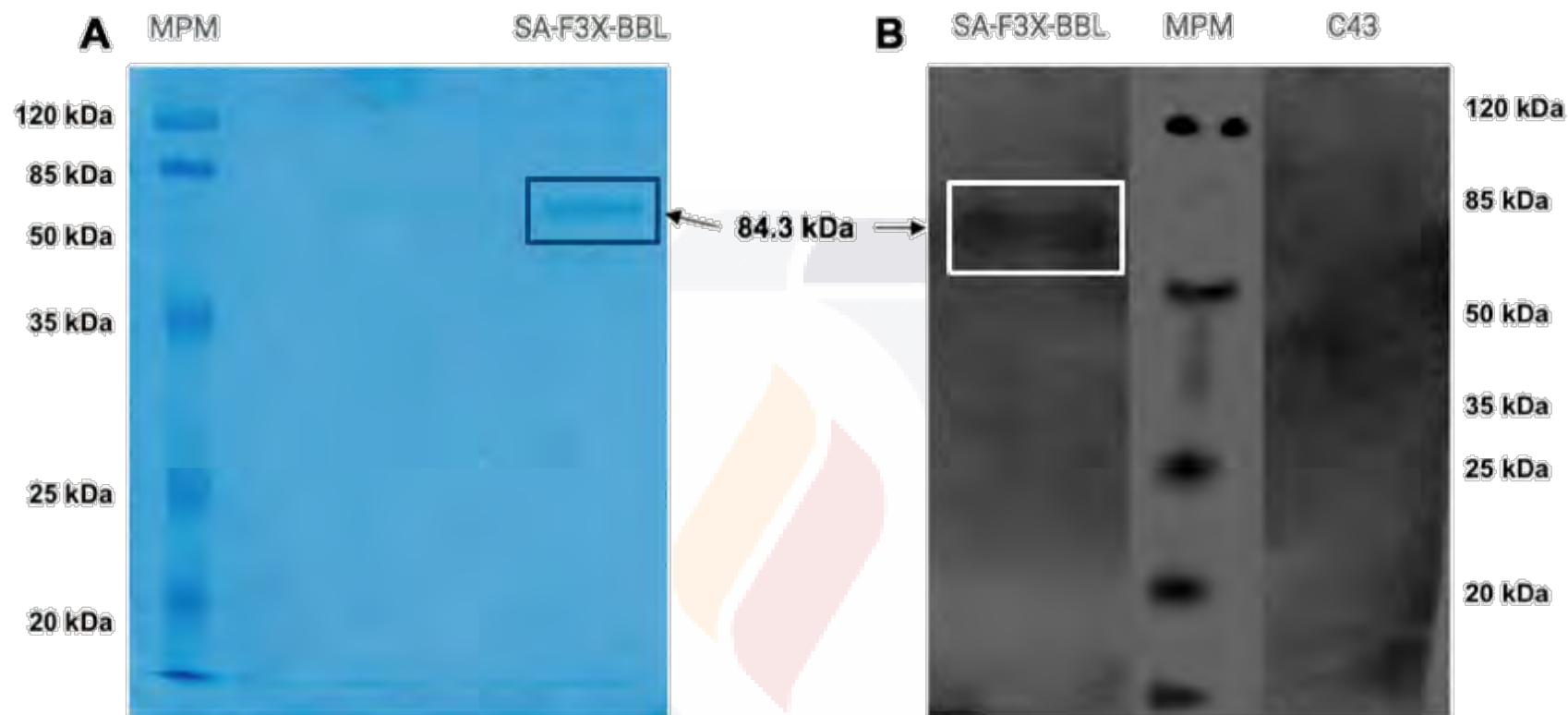


Figura 10. Expresión de la proteína recombinante SA-F3X-BBL por poliacrilamida con SDS-PAGE al 7.5%. A) Tinción de Coomassie B) Western blot. Se realizaron 4 ensayos por separado de la producción de la proteína recombinante con inducción con IPTG 1mM en donde se cargaron muestras purificadas de la fracción soluble y C43 como control negativo, en donde se observa la expresión de la proteína recombinante con un peso de 84.3 KDa. Primer anticuerpo monoclonal anti-RSV (F) Dil 1:500 y segundo anticuerpo proteína de unión (BP) a IgG kappa de ratón m-IgGk BP conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) Dil 1:2500. MPM: Marcador de peso molecular. C43: Cepa C43 de *E.coli*.

6.4. Evaluación de la respuesta de anticuerpos IgG inducida por la proteína SA-F3X-BBL en los ratones por el método de ELISA.

El suero obtenido de los ratones fue empleado para cuantificar los anticuerpos IgG anti-RSV mediante ELISA. El kit empleado contenía placa de microtitulación recubierta con una mezcla de antígenos de RSV. En la figura 11 se muestra la cantidad de anticuerpos IgG específicos de RSV producidos después de la inmunización con la proteína recombinante SA-F3X-BBL y determinados con el método de ELISA. Se muestra que tanto los grupos inmunizados con la proteína recombinante como los controles no presentaron producción de anticuerpos IgG, después de la inmunización con la proteína recombinante administrada por vía intramuscular comparados con el control. Debido a que el control positivo interno del estuche de ELISA si desarrolló la reacción de color, se puede mencionar que la prueba es válida y no hubo interferencias en la técnica.

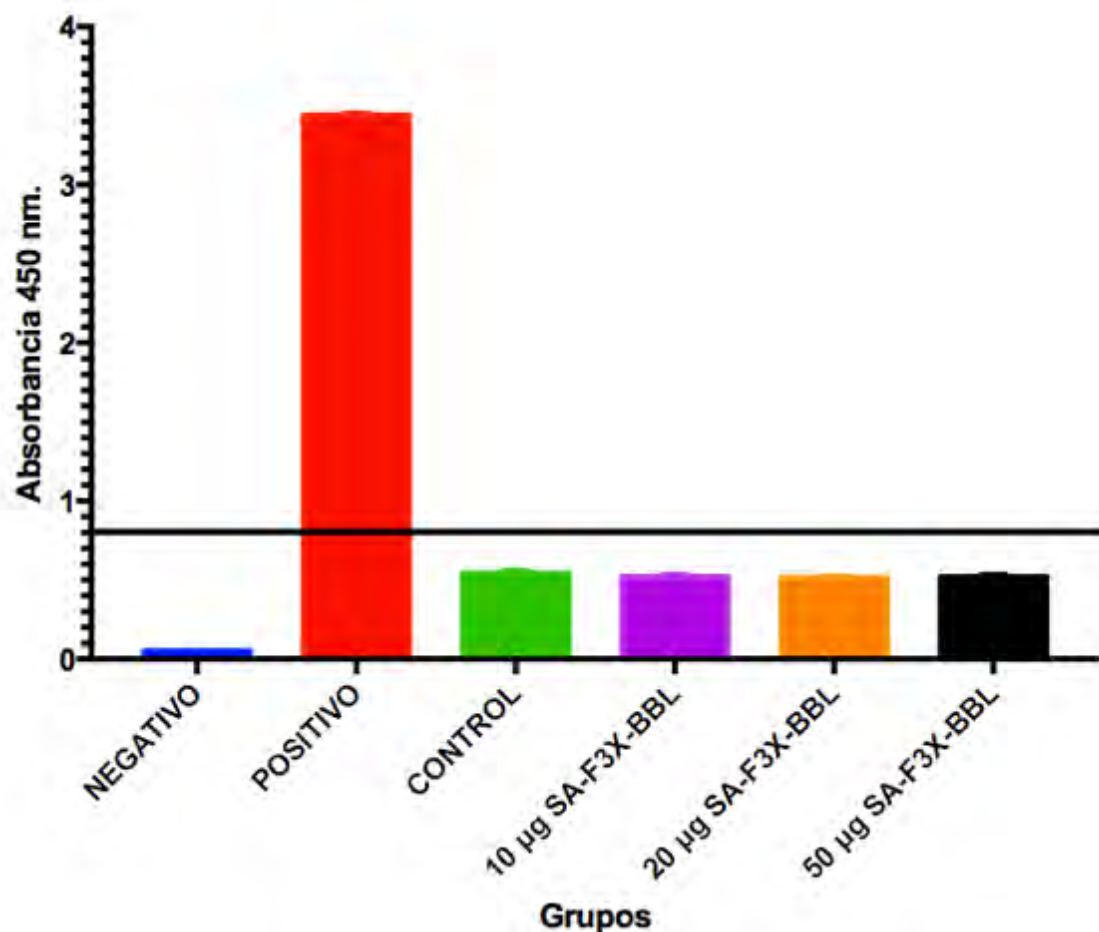


Figura 11. Determinación de los niveles de anticuerpos IgG específicos de RSV cuantificados por ELISA. El número de muestras de sueros de animales evaluadas fue de 5 animales/grupo, analizando cada muestra de suero por duplicado ($n = 10$). ANOVA de 1 vía, post-hoc Dunnet. Un valor $p < 0.05$ es considerado significativo.

6.5 Determinación del título de anticuerpos neutralizantes en suero de animales inmunizados con la proteína SA-F3X-BBL.

Para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes para RSV en el suero de los animales inmunizados, se evaluó la presencia o ausencia de CPE en células Vero a los 5 días post-infección con el RSV ($MOI = 1$) preincubado con las diferentes diluciones de suero (suero puro, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16) de animales no inmunizados y los inmunizados a diferentes concentraciones de la proteína recombinante SA-F3X-BBL (10, 20 y 50 µg).

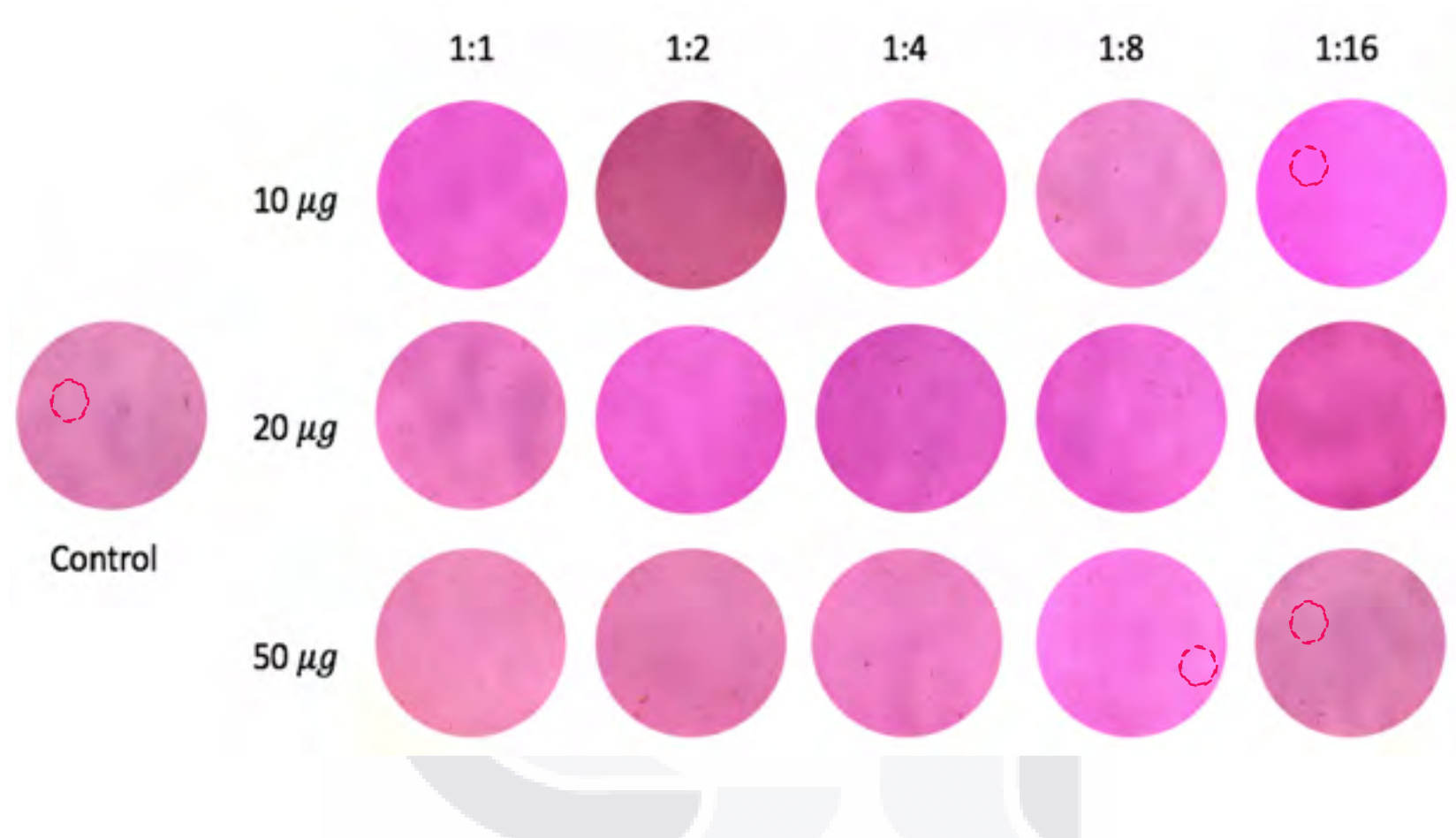


Figura 12. Evaluación de los anticuerpos neutralizantes por medio de CPE frente a RSV in vitro. Se preincubó el RSV a razón de MOI =1 (1×10^4 PFU) con las diluciones de los sueros (suero puro, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16) de 5 animales inmunizados y no inmunizados por vía intramuscular a diferentes concentraciones de proteína recombinante (10, 20 y 50 µg) con una réplica de 2 por cada dilución de suero y concentración de proteína. Los complejos fueron incubados en 10,000 células Vero por 5 días a 37°C/5% CO₂. Los sueros control eran de animales no inmunizados con la proteína recombinante. Se identificó la presencia o ausencia del CPE por medio de un microscopio invertido.

El CPE fue constantemente observado en todos los pozos con células Vero en los que se preincubaron los sueros de los animales control con el RSV, lo que indicó que estos animales no presentaban anticuerpos preexistentes neutralizantes contra el RSV. Los sueros de animales inmunizados con 10 y 50 μg de proteína recombinante neutralizaron la generación de CPE en células Vero desde el suero no diluido hasta la dilución 1:8 sin embargo, a la dilución de 1:16, la cantidad de anticuerpos neutralizantes no fue suficiente para bloquear la infección del RSV en células Vero. De forma remarcable, los sueros de animales inmunizados con 20 μg de proteína bloquearon la infección del RSV incluso a la dilución más alta ensayada (1:16). Este resultado demostró la capacidad de la proteína SA-F3X-BBL para inducir la producción de anticuerpos neutralizantes contra el RSV después de ser administrada a diferentes concentraciones por vía intramuscular (Figura 12).

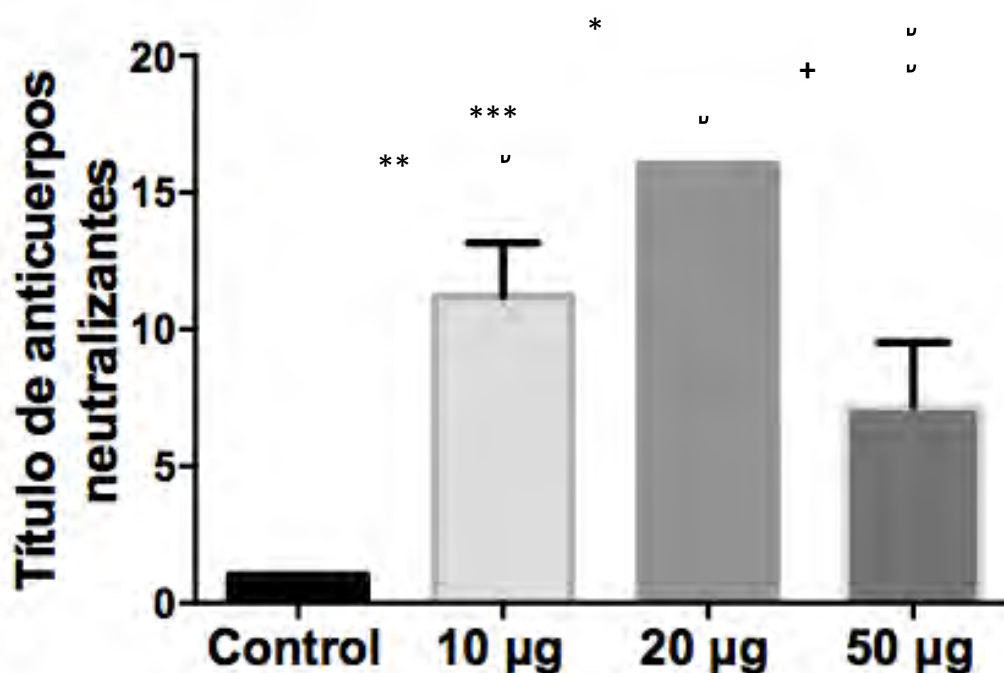


Figura 13. Título de anticuerpos neutralizantes en suero de animales inmunizados con diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. Para definir el título se analizaron los pozos de células Vero que presentaron CPE tras 5 días de infección con RSV y en presencia o ausencia de suero de animales inmunizados con la proteína recombinante SA-F3X-BBL. Se evaluó el suero de 5 animales diferentes por grupo con una réplica de 2 por cada animal ($n = 10$). ANOVA de 1 vía en una comparación múltiple de Tukey $*p = 0.0484$, $**p = 0.0012$, $***p < 0.0001$ vs. control. Y $+p = 0.0043$ entre 20 μg y 50 μg .

En la figura 13 se representa el título de anticuerpos neutralizantes de los sueros de los animales controles o sensibilizados para cada uno de los grupos de animales, y que se obtuvo al analizar la presencia o ausencia de CPE en los pozos con células Vero. El grupo control no presentó anticuerpos neutralizantes frente al RSV, representándose con un título promedio de 1. En cambio, en los sueros de los ratones inmunizados con las diferentes concentraciones de la proteína recombinante se obtuvo un título promedio de 11.2, 16 y 7.2 para la administración de 10, 20 y 50 μg de SA-F3X-BBL, siendo estos títulos significativamente mayores a los de los animales controles. Pero la concentración de proteína recombinante que generó mayor título de anticuerpos neutralizantes fue la de 20 μg de SA-F3X-BBL, siendo este valor significativamente mayor al de 50 μg de SA-F3X-BBL.

6.6 Estandarización de PCR y clonación de fragmento de las proteínas NS1 y NS2.

Se estandarizó la PCR utilizando 3 diferentes concentraciones (22.4, 44.8 y 67.2 $\text{ng}/\mu\text{l}$) de los cDNA obtenidos de la retrotranscripción del RNA del RSV propagado en células Vero. Se observó que en la concentración de 22.4 $\text{ng}/\mu\text{l}$ se presentaba la amplificación del fragmento de 270 pb, que corresponde al fragmento NS1/NS2. En la figura 14 se muestra el gel de electroforesis en agarosa al 1%, en el que se observó que el amplicón se encuentra en el peso correspondiente, lo que comprueba la correcta estandarización de la reacción.

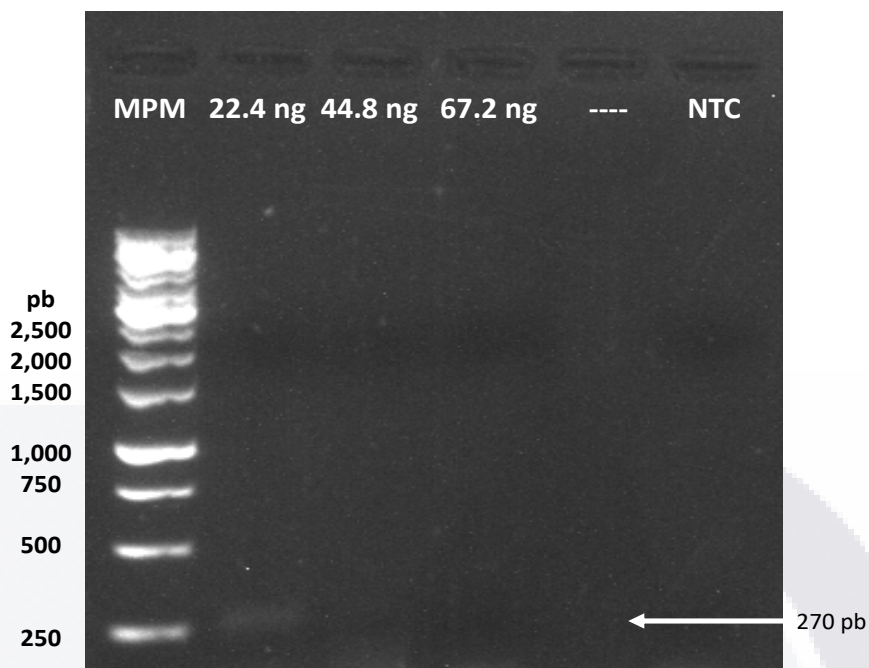


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR de cDNA obtenido de la RT-PCR a diferentes concentraciones (22.4, 44.8 y 67.2 ng/μl). Se muestra la presencia del amplicón NS1/NS2 con un peso molecular de 270 pb. MPM: marcador de peso molecular, NTC: Control sin templado.

Luego de haber confirmado la presencia del amplicón, se repitió la PCR con la enzima Q5® High-Fidelity DNA Polimerasa (NEB) ya que, además de ser una enzima de alta fidelidad, genera extremos romos (blunt ends) en los amplicones, por lo que el proceso de clonación es compatible con el vector de clonación pJET1.2/blunt. Se analizaron 4 clonas por PCR con los mismos oligos para determinar la presencia del fragmento dentro del plásmido (pJET1.2-NS1/NS2). En la figura 15 se muestra la caracterización del amplicón en el vector pJET1.2/blunt de las clonas de las células transformadas. De éstas clonas se seleccionó la clona 4 por ser la que se amplificó con mayor pureza para poder realizar la curva estándar de cuantificación de carga viral.

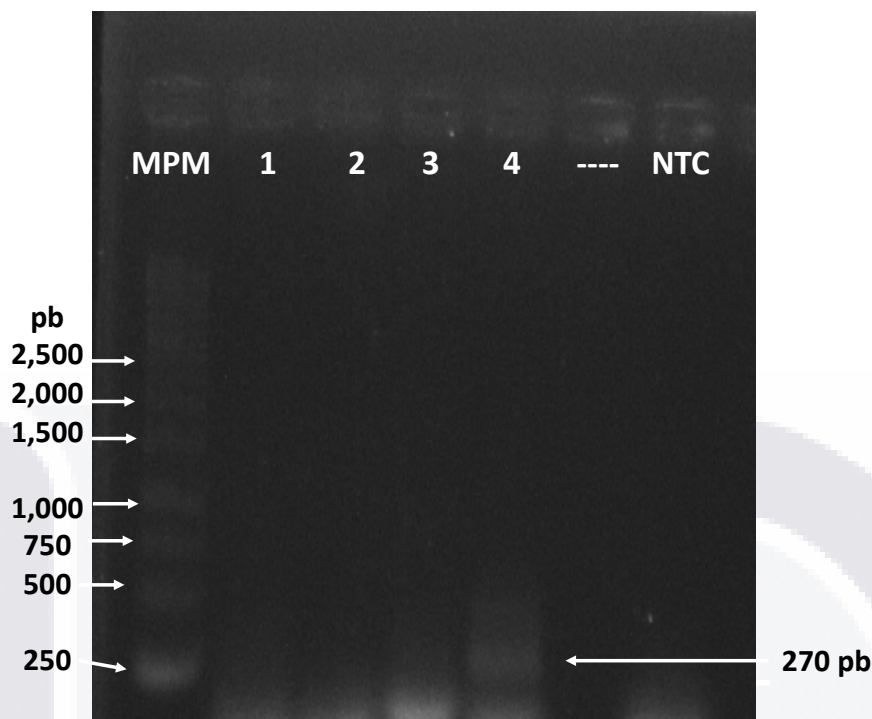


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se muestra el análisis del producto de la PCR para 4 clonas seleccionadas con el plásmido de clonación pJET 1.2/blunt-NS1/NS2. MPM: Marcador de peso molecular, NTC: Control sin templado.

Para generar un stock de plásmido que sería empleado para establecer la curva estándar, se volvió a realizar extracción de DNA, pero empleado un kit basado en columnas de sílica gel para obtener un mayor grado de pureza y evitar contaminantes que interfieran en la qPCR en tiempo real. El plásmido extraído fue cuantificado y se realizó el siguiente cálculo para determinar el número de copias por μl obtenidas: teniendo en cuenta la concentración del plásmido pJET1.2-NS1/NS2 (418.1 ng/ μl) y tamaño total (3,244 pb), se hizo un cálculo con la siguiente fórmula para determinar el número de copias:

$$\text{Número de copias} = (\text{conc.} * 6.022 \times 10^{23}) / (\text{long. plásmido} * 1 \times 10^9 * 650)$$

$$\text{Número de copias} = (418.1 \text{ ng}/\mu\text{l} * 6.022 \times 10^{23}) / (3,244 \text{ pb} * 1 \times 10^9 * 650)$$

por lo que se obtuvieron 1.2×10^{11} copias/ μl .

6.7 Curva estándar del fragmento NS1 y NS2 para determinar la carga viral por qPCR.

Una vez determinado el número de copias por μl del plásmido pJET1.2-NS1/NS2, se realizaron diluciones para establecer una serie de estándares con un número de copias conocido por cada μl . Los estándares fueron establecidos para tener desde 10 hasta 10^8 copias por reacción de qPCR. En la figura 16 se representan los resultados de la curva estándar por qPCR de cada uno de los estándares con números de copias conocidas. La cinética de amplificación obtenida para cada reacción mantuvo su comportamiento logarítmico característico, por lo que se puede observar que conforme va disminuyendo la cantidad de templado en el estándar, la cinética va recorriendo a la derecha y por lo tanto su valor de Ct (ciclo umbral o de detección, *cycle threshold*) va aumentando (figura 16A). Se graficaron las concentraciones en valores $\log_{10}$ vs. la media de las Ct obtenidas para cada estándar, y empleando el software de análisis del equipo StepOne se hizo una regresión lineal para así determinar la eficiencia de amplificación, la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2) de las variables (figura 16B).

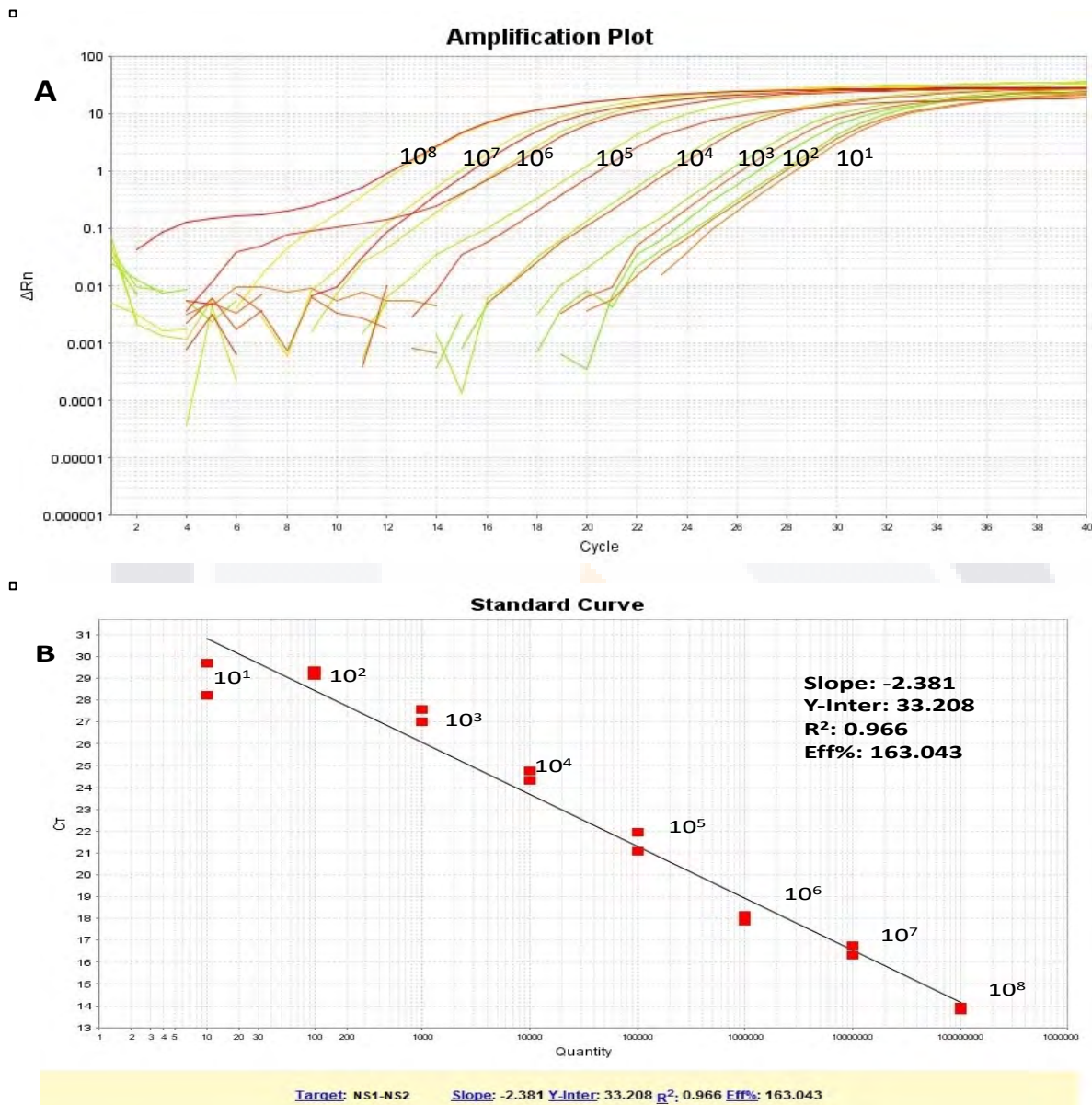


Figura 16. Estandarización de una curva estándar a partir del plásmido que contiene el genoma completo NS1/NS2 para la cuantificación de la carga viral en tejido. A) Cinética de amplificación de cada reacción en la que se observa que la Ct va aumentando conforme el templado va disminuyendo. B) Curva estándar para evaluar carga viral en tejido por qPCR de Log10 del número de copias/ μ l contra media de las Ct en donde se muestra la ecuación de la recta por regresión lineal.

La pendiente m (slope) da un valor de -2.381 y b (intercept) un valor de 31.503. El valor de x se despeja para así determinar la carga viral en cada Ct (y).

$$Y = - 2.381x + 31.503$$

$$x = (y - 31.503) / -2.381$$

En la figura 17 se muestra el análisis de desnaturalización de los amplicones de NS1/NS2 obtenidas de la reacción de qPCR. Se puede observar la presencia de un solo pico de desnaturalización para cada una de las muestras, lo que indica que la especificidad de la PCR es alta pues únicamente se detecta la presencia de un solo amplicón.

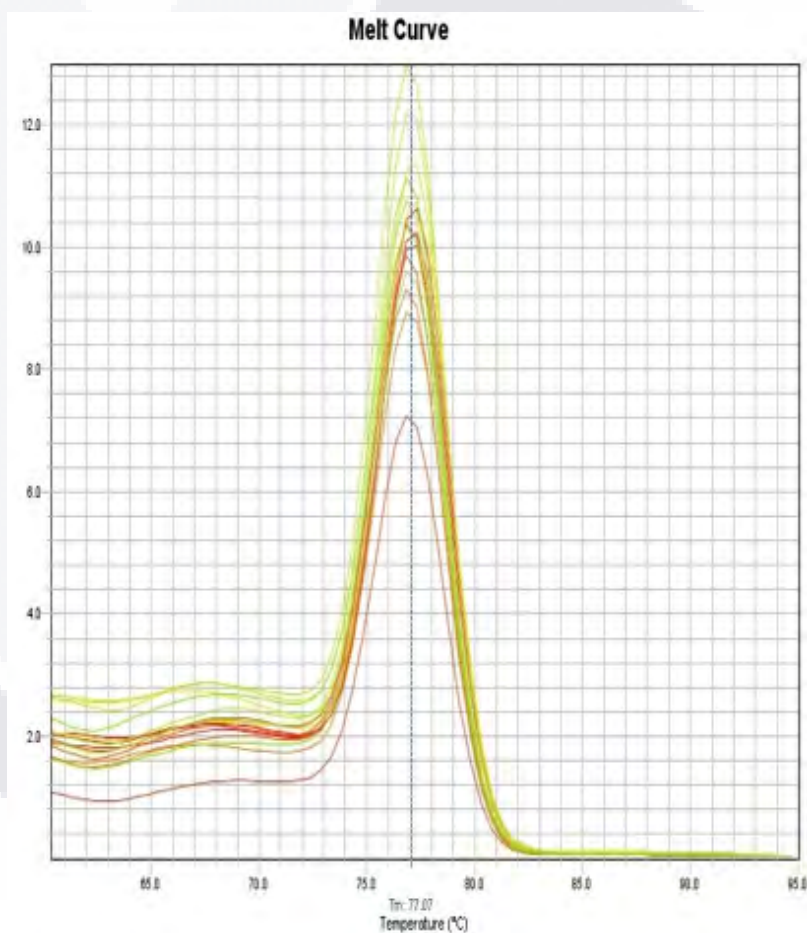


Figura 17. Curva de desnaturalización o de disociación de la curva estándar. Se observan los picos de amplificación que indica la especificidad de la reacción, es decir, que los amplicones de los estándares no presentan inespecificidades entre ellos para la construcción de una curva de calibración para NS1/NS2.

Así mismo, se hicieron los cálculos para determinar la eficiencia de la qPCR y el porcentaje de eficiencia, de acuerdo con lo que describe Whelan *et al.*, 2003.

$$\text{Eficiencia de PCR (Eff)} = 10^{(-1/\text{slope})}$$

2.6296

$$\% \text{ Eficiencia de PCR (\%Eff)} \quad \% \text{ Eff} = (\text{Eff} - 1) * 100$$

$$\% \text{ Eff} = (2.6296 - 1) * 100$$

$$(1.6304) * 100$$

163%

El coeficiente de determinación obtenido de ambas variables (Ct y concentración inicial de templado) fue alto (0.966). Este dato indica la alta relación entre ambas variables, lo cual es útil cuando se pretenda correlacionar el Ct con la carga viral.

6.8 Evaluación por PCR en tiempo real de la carga viral del RSV en células Vero en presencia de suero de animales control y los inmunizados con diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL.

Para poder cuantificar la capacidad inhibitoria de la replicación viral de los sueros de animales inmunizados con la proteína recombinante SA-F3X-BBL, se cuantificó el número de copias del genoma del virus presente en los cultivos de 10,000 células Vero retados con un número constante de PFU (10,000 PFU) de RSV preincubados con diferentes diluciones de sueros de animales inmunizados (suero puro, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16). Para ello se utilizó la curva estándar del fragmento NS1/NS2. Se observó que conforme la dilución de cada uno de los sueros de ratones inmunizados aumentó, la carga viral del RSV en células Vero se incrementó.

En la figura 18, se observa que el grupo control no inmunizado con la proteína recombinante, permitió la replicación del RSV en células Vero, toda vez que el número de copias por cada 10 ng de RNA se mantuvo en el rango de 40,066.6 a 95,735.8 genomas (diluciones 1:8 y 1:16 de suero control, respectivamente). Los sueros de animales inmunizados con 10 μ g de la proteína recombinante disminuyeron significativamente la replicación viral desde el suero puro sin diluir hasta la dilución 1:4, y aunque en la dilución 1:8 se observó un incremento significativo de la replicación viral, aun la dilución 1:16 mantuvo la inhibición de la replicación viral. El suero de los animales inmunizados con 20 μ g de la proteína tuvo un comportamiento similar a lo observado en el grupo inmunizado con 10 μ g. Los sueros sin diluir, y a las diluciones 1:2 y 1:4 previnieron significativamente la replicación del RSV en células Vero; sin embargo, la dilución 1:8 no tuvo diferencias significativas con el suero control a esa misma dilución, aunque con el suero diluido 1:16 si hubo una disminución de la replicación viral. En el grupo inmunizado con 50 μ g de la proteína se encontró que el suero promovió una inhibición de la replicación viral desde el suero sin diluir, en el cual se detectaron en promedio 646 copias de genomas/10 ng de RNA, en el suero diluido 1:2 no hubo detección de RNA genómico viral, en el suero diluido 1:4 la media de genomas detectados fue de 475 copias de genomas/10 ng de RNA, el suero diluido 1:8 permitió la replicación del RSV a razón de 1305 copias de genomas virales/10 ng de RNA, por último la dilución 1:16 aunque permitió un incremento de la replicación en 27,267 copias de genomas del virus/10 ng de RNA aun así se mantuvo significativamente disminuida con respecto al control en esa misma dilución. La comparación entre grupos inmunizados arrojó que efectivamente el suero de animales inmunizados con 50 μ g de proteína recombinante a una dilución 1:8 resultó en una mayor inhibición de la replicación viral al compararlo con los grupos de 10 y 20 μ g.

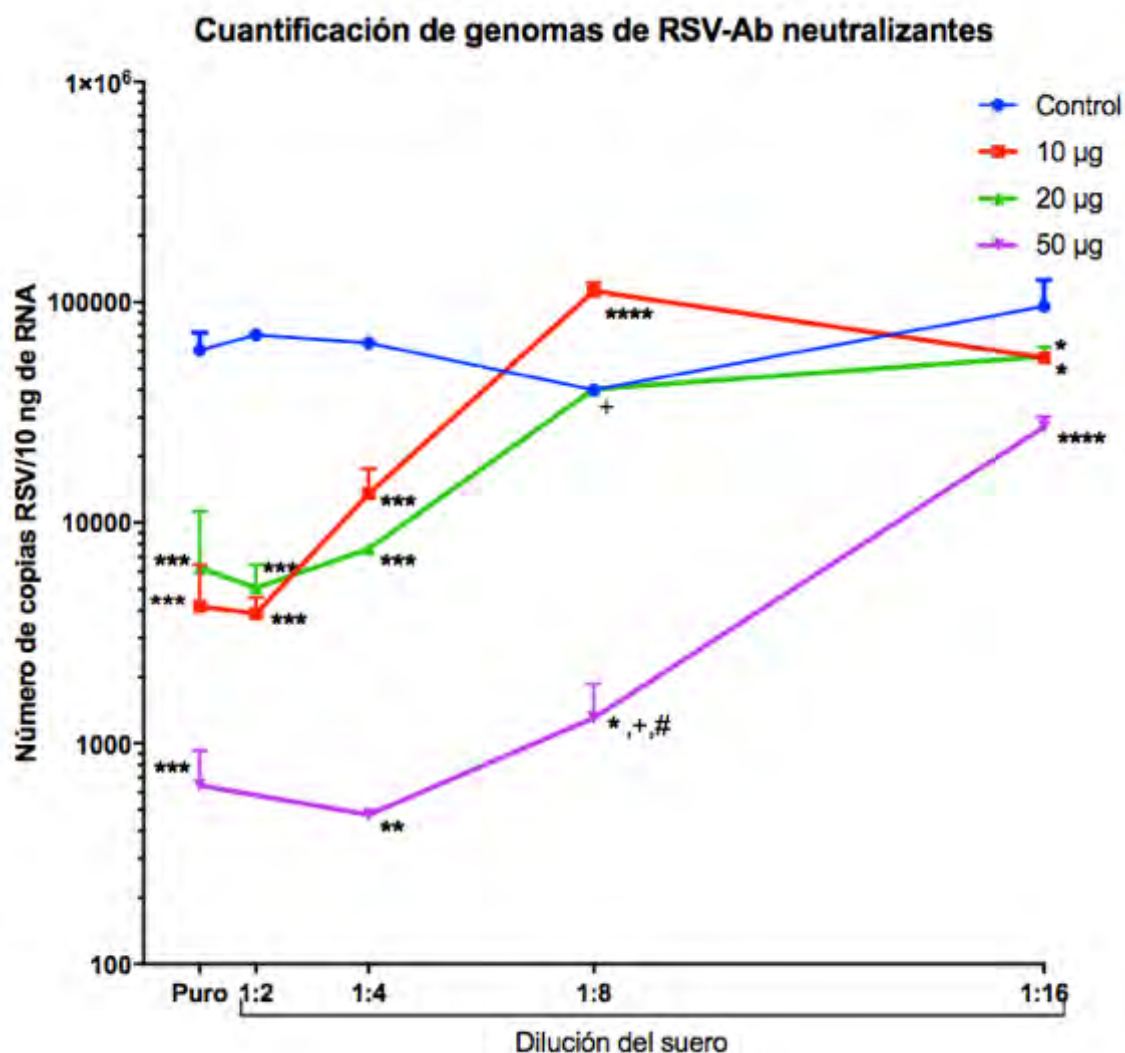


Figura 18. Para el ensayo de inhibición de la replicación viral se hicieron diluciones de los sueros obtenidos al día 14 de la inmunización (suero puro, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16) y a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL (10, 20 y 50 µg) y de los grupos no inmunizados. Estos sueros fueron empleados para incubarse con RSV a razón de MOI=1 (1×10^4 PFU/ml) y posteriormente infectar a 10,000 células Vero y se evaluaron por qPCR 5 días después de la infección. Los datos se representan como la media $\pm$ el error estándar de la media. El número de animales para este ensayo quedó como sigue: control no inmunizado n=5; diferentes concentraciones de proteína recombinante: 10, 20 con una n=5 y 50 µg n=4 con una réplica de 2 por cada animal y para cada dilución. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 y p<0.0001 vs. control. +p<0.0001 vs 10 mg a la misma dilución. #p<0.05 vs 20 mg a la misma dilución.

7. DISCUSIÓN

A lo largo del tiempo, el Virus Sincitial Respiratorio ha cobrado gran importancia alrededor del mundo ya que es un virus que tiene una alta morbilidad y que es causa hospitalizaciones en niños menores de 2 años y personas mayores de 65 años asociados principalmente a comorbilidades como: prematuros, enfermedad crónica o cardiopatías e inmunodeprimidos (Hall *et al.*, 2009; Collins *et al.*, 2013). Es un virus que causa enfermedades del sistema respiratorio inferior como bronquiolitis y actualmente no existe vacuna segura y eficaz frente a la infección por RSV.

El RSV se propaga a través de extensiones intercelulares entre dos células o a través de la transmisión de célula a célula, y en ambos casos, la célula infectada es la que transmite el virus a la célula objetivo (Cifuentes-Muñoz *et al.*, 2018). Los virus dependen de la célula infectada para poder llevar a cabo su replicación la cual comienza por la unión del virus libre a la célula huésped. Según Walsh *et al.* (2015), el virus libre puede demostrarse en el medio de cultivo, pero hasta el 90% del virus permanece asociado a células. La presencia de moco y de las cilias colaboran en impedir el ingreso de partículas virales a los pulmones. Estos elementos, junto con las células epiteliales respiratorias (CER) que recubren la parte interna de los alveolos, funcionan como blanco de las enfermedades respiratorias agudas causadas por RSV y representan la primera línea de defensa contra los virus. La infección por RSV se presenta naturalmente después de la inhalación de gotitas en aerosol que contienen partículas virales, lo que resulta en la propagación de la infección en CER apicales (Johnson *et al.*, 2007). Los cultivos de CER han servido como modelo para el estudio de numerosos virus respiratorios, incluidos RSV, virus de parainfluenza, virus de influenza humana / aviar y coronavirus, y se consideran un modelo *in vitro* ideal de interacción viral con el epitelio respiratorio *in vivo* (Johnson *et al.*, 2015).

Debido a que las CER primarias son difíciles de obtener, tienen un tiempo de vida muy corto *in vivo* y pueden variar de persona a persona, se usa una línea celular de carcinoma alveolar inmortalizadas A549 y una línea de células epiteliales de riñón Vero para un modelo de respuesta inmune innata frente a la infección por el virus, además de que son más susceptibles a la infección por RSV (Hillyer *et al.*, 2018). La línea celular Vero es la principal

productora de IFN de tipo 1, como IFN- α e IFN- β , en respuesta a la infección por RSV (Jin *et al.*, 2000, 2003; Spann *et al.*, 2004, 2005; Teng y Collins 1998, Teng *et al.*, 2000).

Con el aislamiento primario en cultivos de células sensibles, el CPE característico puede detectarse por primera vez después de un promedio de 3 a 5 días. Los sincitios típicos se desarrollan alrededor de 10 a 24 h después y progresan hasta que la monocapa celular se destruye por completo, lo que suele ocurrir en 4 días (Collins & Crowe, 2007). El RSV no es un virus altamente citopático (Johnson *et al.*, 2007), pero *in vitro* se han observado la presencia de sincitios en líneas celulares como A549 y Vero tal como se muestra en este trabajo. Así, a persistencia de la infección se puede observar en cada uno de los pasajes de la infección con el virus RSV en células A549 y Vero. Existen pruebas convincentes de que el nivel de replicación del RSV se correlaciona con la gravedad de la enfermedad en modelos humanos (de Vincenzo *et al.*, 2010; El Saleeby *et al.*, 2011).

Ya que actualmente no existen tratamientos antivirales específicos dirigidos para bloquear la replicación del virus, es por ello que resulta de suma importancia el diseño de estrategias preventivas contra la infección por RSV. La mayoría de las reinfecciones por virus depende de una corta respuesta humoral y celular en los individuos (Habibi *et al.*, 2015), además de una pobre respuesta inmune de memoria. La configuración de la proteína recombinante SA-F3X-BBL producida en este proyecto, tiene la finalidad de promover una respuesta T citotóxica a través de la activación de linfocitos Th1 (Christiaansen *et al.*, 2014; Shaw *et al.*, 2013), además de incrementar la capacidad neutralizante para limitar la replicación del virus y permitir así su eliminación. Se prefirió el uso de la proteína F del RSV debido a su sitio II inmunodominante y que junto con el core de estreptavidina y la tetramerización del coestimulador como 4-1BBL desencadenan una respuesta citotóxica permitiendo el sesgo a la respuesta de tipo 1 favorable para la eliminación del RSV en el organismo al usarla como inmunógeno por vía intramuscular en ratones. Estudios de Cheon *et al.*, 2019 mostraron que la inmunización sublingual con un polipéptido recombinante de la fracción G del RSV mostraba una tendencia por la respuesta tipo 2, demostrando así que tal fragmento exacerba la enfermedad. Por otro lado, la administración terapéutica de anticuerpos neutralizantes redujo significativamente el nivel de replicación del RSV en los pulmones de ratas algodóneras y monos búho, pero mostró solo una ligera tendencia de

efectos beneficiosos en un número limitado de niños infectados por RSV (Hemming & Prince, 1990).

Los resultados de IgG sérico específico de RSV después del refuerzo de la inmunización a diferentes concentraciones con la proteína recombinante SA-F3X-BBL por vía intramuscular en un modelo de ratón de la cepa C57BL/6, muestran que en el día 14 los animales no han desarrollado un título de anticuerpos IgG significativos en comparación con los controles. Esto puede ser debido a que la vía de inmunización intramuscular usada o que el tiempo de análisis de resultados en este ensayo no fue el adecuado. Estudios recientes muestran que la presencia de IgG, derivada de la circulación sistémica, que contribuye a la defensa ante el RSV en la porción inferior del aparato respiratorio, se presenta después de 20 a 30 días después de la primera inmunización (Ruuskanen & Ogra, 1993). Aunque un bajo título de anticuerpos representa una mayor susceptibilidad frente a infecciones virales (Bagga, 2015), estudios alternos muestran que en ratones Balb/c, a pesar de que presentan linfocitos T citotóxicos y niveles de IgG sérico específico de RSV, éstos no determinan la latencia (RNA genómico) ni la persistencia (RNA mensajero) del RSV después de la infección (Schwarze & Schauer 2004). Por lo tanto, la presencia de los anticuerpos IgG específicos de RSV no provee de completa protección frente a infección o reinfecciones por RSV.

Se ha demostrado que a mayor concentración de anticuerpos neutralizantes, menor serán el efecto citopático y la carga viral en tejidos celulares (Glezen *et al.*, 1981; Falsey *et al.*, 2005). Nuestros resultados muestran la presencia de anticuerpos neutralizantes en los animales, generados por la primo-inmunización y el refuerzo con la proteína SA-F3X-BBL. La proteína recombinante a una concentración de 10 y 50 μg mostró una gran capacidad neutralizante protectora frente a la infección por RSV *in vitro*. Pero a una concentración de 20 μg de la proteína recombinante, se observó que impide completamente la replicación del virus representada como el CPE en la línea celular Vero. Se ha reportado que lactantes menores a 6 meses de edad producen menos anticuerpos contra la proteína F y, por lo tanto, presentan una respuesta neutralizante deficiente al RSV (Noor & Krilov, 2018; Nadal *et al.*, 1990). Además, las concentraciones de anticuerpo no neutralizantes o subneutralizantes pueden potenciar la infección al formar complejos con el virus y luego poner el virus acomplejado en contacto con los receptores Fc de la superficie celular; esto

presumiblemente facilita la entrada del virus en la célula (Halstead, 1982). Por lo tanto, el uso de un tratamiento que sea capaz de alcanzar un título de anticuerpo de umbral protector mínimo a través de la inmunización activa puede reducir significativamente la hospitalización asociada al RSV entre sujetos de todas las edades. En base a los resultados eficientes de neutralización obtenidos en este trabajo, se propone el uso de la proteína SA-F3X-BBL para ser probada en ensayos clínicos en un futuro en humanos y proponerla como vacuna en contra de la infección por RSV.

De acuerdo a nuestros resultados que muestran presencia de anticuerpos con actividad neutralizantes y niveles no detectables de IgG específico de RSV, se propone que los anticuerpos neutralizantes que se están produciendo en los animales por la inmunización con SA-F3X-BBL sean de isotipo IgM o IgA. La respuesta temprana de IgM usualmente es la primera en aparecer, después de 5 a 10 días tras del contacto con partículas virales, y persiste en la sangre después de 1 a 3 meses para activar la respuesta inmune adaptativa cuando el huésped se enfrenta a reinfecciones (Ruuskanen & Ogra, 1993). Por otro lado la respuesta de IgA nasal específica del RSV se correlaciona más fuertemente con la protección, ya que una deficiencia de este isotipo puede aumentar el riesgo de desarrollar infecciones a este nivel, en comparación con las mediciones de anticuerpos neutralizantes en suero en adultos (Habibi *et al.*, 2015). Por lo que se recomienda, en estudios posteriores a este proyecto, aumentar el tiempo de extracción de suero de los animales inmunizados con la proteína recombinante, recomendable entre 21 y 28 días después de la primera dosis e identificar el isotipo de la inmunoglobulina presente a los 14 días después de la inmunización con la proteína recombinante capaz de neutralizar el RSV *in vitro*. Se ha demostrado que el RSV es neutralizado por anticuerpos, incluida la IgA, y la eliminación del RSV corresponde a la aparición de IgA específica del RSV detectable en las secreciones respiratorias de los lactantes infectados de forma natural (McIntosh *et al.*, 1979).

La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR), proporciona un método simple para determinar la cantidad de una secuencia o gen que está presente en una muestra y es usada tanto en investigación como en diagnóstico clínico (Dhanasekaran *et al.*, 2010). Además, la relación entre la replicación viral y la gravedad de la enfermedad por RSV es importante en la determinación de la utilidad potencial de las estrategias de tratamiento antivírico (DeVicenzo *et al.*, 2005). En este trabajo se construyó una curva estándar de los

fragmentos de las proteínas NS1/NS2 del RSV para cuantificar la carga viral. Se considera que dicha curva es adecuada, confiable y permite interpolar directamente los valores de Ct de las muestras de cada grupo experimental y obtener así las copias de RSV presentes en cada muestra.

La eficiencia de la PCR depende del ensayo, el rendimiento y sensibilidad de una reacción y la calidad de la muestra. La eficiencia, también puede afectar al Ct. En general, una eficiencia entre 90 y 160% se considera aceptable (Whelan *et al.*, 2003). En base a nuestros resultados, la eficiencia obtenida del plásmido pJET1.2/NS1-NS2 de la curva estándar junto con los grupos experimentales fue de 90-100%, por lo que se puede predecir que el DNA templado fue amplificado en condiciones de alta eficiencia. El coeficiente de determinación indica una muy buena correspondencia entre las variables empleadas en la curva estándar (Ct y número inicial de templado). Lo anterior se puede corroborar con la R^2 con resultado del plásmido pJET1.2/NS1-NS2 de 0.966-0.989, la cual proporciona una buena confianza de que nuestra curva estándar puede predecir la carga viral de las muestras problema de tejido, haciendo uso de su valor de Ct por qPCR.

En este trabajo también se determinó la capacidad del virus para replicarse en una línea celular Vero en presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes, resultado de la inmunización con la proteína recombinante. Se observó que las muestras control (sueros de animales control) presentaban una mayor carga viral de RSV en cada una de las diluciones del suero no inmunizado ya que no contenían anticuerpos neutralizantes preexistentes previos a la inmunización capaces de eliminar el virus. Por otro lado, los grupos experimentales que fueron inmunizados a diferentes concentraciones de la proteína recombinante por vía intramuscular y retados con el virus *in vitro* disminuían la carga viral evaluados por qPCR. Se puede determinar que la concentración de 50 μ g de proteína recombinante usada como inmunógeno en ratones y retada con el virus RSV *in vitro* fue la que presentó menor carga viral de manera significativa con respecto a los controles, por lo que se puede decir que la inmunización con la proteína recombinante SA-F3X-BBL permite el desarrollo de anticuerpos neutralizantes capaces de bloquear la replicación del RSV en las células Vero.

Evaluando conjuntamente los resultados obtenidos en la cuantificación de los títulos de anticuerpos neutralizantes en suero y los datos del efecto neutralizante de los sueros de los

animales sobre la infección de células Vero por RSV observamos que mientras que el título mayor de anticuerpos neutralizantes se detectaron en animales inmunizados con 20 µg de SA-F3X-BBL, fueron los sueros de los animales inmunizados con 50 µg de SA-F3X-BBL los que inhibieron la replicación del RSV de manera significativa. Esto nos permite inferir que identificar microscópicamente la presencia o ausencia de áreas con efecto citopático generados por el RSV sobre monocapas de células Vero es un método poco preciso para determinar si un suero es adecuado para evitar la propagación del virus y su posterior eliminación. Para ello es necesario el análisis de la carga viral por el método de PCR cuantitativa, el cual es un método muy sensible para determinar el número de copias de RSV reales presentes en las células Vero incubadas con los sueros de animales inmunizados, usando la curva estándar del plásmido pJET1.2 NS1/NS2, que es el fragmento que representa el genoma del virus completo y nos permite determinar el número de copias de RSV presentes en cada muestra.

8. CONCLUSIONES

En este trabajo se obtuvieron las siguientes conclusiones:

La inmunización de ratones con la proteína recombinante SA-F3X-BBL por vía intramuscular más un refuerzo 7 días después no muestra una respuesta de anticuerpos IgG específicos de RSV en el día 14.

La proteína recombinante SA-F3X-BBL a una concentración de 20 µg fue capaz de generar un título de anticuerpos neutralizantes de 4×10^{10} PFU/ml frente al RSV por el método TCID₅₀.

A una concentración de 50 µg, la proteína recombinante SA-F3X-BBL fue capaz de neutralizar el virus casi en su totalidad en comparación con el grupo no inmunizado con la proteína recombinante al evaluar la carga viral por qPCR.

La proteína recombinante puede ser usada como propuesta novedosa de vacuna frente a la infección por RSV por su alta capacidad neutralizante y de disminuir la carga viral cuando ya está establecida la infección.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Hendry RM, Fernie BF & Stone Y. (1985). Antigenic Characterization of Respiratory Syncytial Virus Strains with Monoclonal Antibodies. *151*(4), 626–633.
- Aoki-Utsubo C, Chen M, & Hotta H. (2018). *www.bio-protocol.org/e2855*. 8, 1–12. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2855>.
- Arribillaga L, Sarobe P, Arina A, Gorraiz M, Borrás-Cuesta F, Ruiz J, Prieto J, Chen L, Melero I. & Lasarte JJ. (2005). Enhancement of CD4 and CD8 immunity by anti-CD137 (4-1BB) monoclonal antibodies during hepatitis C vaccination with recombinant adenovirus. Pp 3493-3499.
- Bagga, B., Cehelsky, J. E., Vaishnav, A., Wilkinson, T., Meyers, R., Harrison, L. M., Roddam, P. L., Walsh, E. E., & DeVincenzo, J. P. (2015). Effect of Preexisting Serum and Mucosal Antibody on Experimental Respiratory Syncytial Virus (RSV) Challenge and Infection of Adults. *The Journal of infectious diseases*, 212(11), 1719–1725. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv281>
- Bajorek M, Caly L, Tran KC, Maertens GN, Tripp RA, Bacharach E, Teng MN, Ghildyal R, Jans DA. (2014). The Thr205 phosphorylation site within respiratory syncytial virus matrix (M) protein modulates M oligomerization and virus production. *J Virol*. Jun;88(11):6380-93. doi: 10.1128/JVI.03856-13. Epub 2014 Mar 26.
- Barcia C, Thomas CE, Curtin JF, King GD, Wawrowsky K, Candolfi M, Xiong W, Liu C, Kroeger K, Boyer O, Kupiec-Weglinski J, Klatzmann D, Castro MG & Lowenstein PR (2006). In vivo mature immunological synapses forming SMACs mediate clearance of virally infected astrocytes from the brain. *J Exp Med*. Pp 2095-2107.
- Barr, R., Green, C. A., Sande, C. J., & Drysdale, S. B. (2019). Respiratory syncytial virus: diagnosis, prevention and management. *Therapeutic advances in infectious disease*, 6, 2049936119865798. <https://doi.org/10.1177/2049936119865798>.
- Battles MB, McLellan JS. (2019). Respiratory syncytial virus entry and how to block it.

Nat Rev Microbiol. Apr;17(4):233-245. doi: 10.1038/s41579-019-0149-x. PMID: 30723301; PMCID: PMC7096974.

Baum A & Garcia-Sastre A (2010). Induction of type I interferon by RNA viruses: cellular receptors and their substrates. *Amino acids*. Pp 1283-1299.

Beem M. et al. (1960). Association of chimpanzee coryza agent with acute respiratory disease in children. *J Med.* Pp 523-530.

Bergeron HC, Murray J, Nuñez Castrejón AM, DuBois RM, Tripp RA. (2021). Respiratory Syncytial Virus (RSV) G Protein Vaccines With Central Conserved Domain Mutations Induce CX3C-CX3CR1 Blocking Antibodies. *Viruses*; 13(2):352. <https://doi.org/10.3390/v13020352>.

Blondot M, Dubloscard V, Fix J, Lassoued S, Aumont-Nicaise M, Bontems F, Eléouët J & Sizun C (2012). Structure and functional analysis of the RNA and viral phosphoprotein-binding domain of respiratory syncytial virus M2-1 protein. *PLoS Pathog.* 8(5): e1002734.

Bohmwald, K., Gálvez, N., Canedo-Marroquín, G., Pizarro-Ortega, M. S., Andrade-Parra, C., Gómez-Santander, F., & Kalergis, A. M. (2019). Contribution of Cytokines to Tissue Damage During Human Respiratory Syncytial Virus Infection. *Frontiers in immunology*, 10, 452. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00452>

Borchers AT, Chang C, Gershwin ME, Gershwin LJ. (2013). Respiratory syncytial virus- a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol.* Dec;45(3):331-79. doi: 10.1007/s12016-013-8368-9. PMID: 23575961; PMCID: PMC7090643.

Bossert B & Conzelmann K (2002). Respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural (NS) proteins as host range determinants: a chimeric bovine RSV with NS genes from human RSV is attenuated in interferon-competent bovine cells. *J Virol.* Pp 4287-4293.

Bukreyev (1997). Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. *J Virol.* Pp 8973-8982.

Céspedes PF, Bueno SM, Ramírez BA, Gomez RS, Riquelme SA, Palavecino CE, Mackern-Oberti JP, Mora JE, Depoil D, Sacristán C, Cammer M, Creneguy A, Nguyen TH, Riedel CA, Dustin ML & Kalergis AM (2014). Surface expression of the hRSV nucleoprotein impairs immunological synapse formation with T cells. Pp E3214-E3223.

Chanock R & Finberg. (1957). Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent. Pp 291-300.

Chatterjee, A., Mavunda, K. & Krilov, L.R. (2021). Current State of Respiratory Syncytial Virus Disease and Management. *Infect Dis Ther* 10, 5–16. <https://doi.org/10.1007/s40121-020-00387-2>.

Cheng X, Park H, Zhou H & Jin H (2005). Overexpression of the M2-2 protein of respiratory syncytial virus inhibits viral replications. *J Virol*. Pp 13943-13952.

Cheon, I. S., Kim, J. Y., Choi, Y., Shim, B. S., Choi, J. A., Jung, D. I., Kim, J. O., Braciale, T. J., Youn, H., Song, M. K., & Chang, J. (2019). Sublingual Immunization With an RSV G Glycoprotein Fragment Primes IL-17-Mediated Immunopathology Upon Respiratory Syncytial Virus Infection. *Frontiers in immunology*, 10, 567. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00567>

Cho N, Feng P, Lee S, Lee B, Liang X, Chang H & Jung JU. (2004). Inhibition of T cell receptor signal transduction by tyrosine kinase-interacting protein of herpesvirus saimiri. *J Exp Med*. Pp 681-687.

Christiaansen AF, Knudson CJ, Weiss KA & Varga SM (2014). The CD4 T cell response to respiratory syncytial virus infection. *Immunol Res*. Pp 1-9. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8540-1>.

Cifuentes-Muñoz N, Dutch RE, Cattaneo R (2018) Direct cell-to-cell transmission of respiratory viruses: The fast lanes. *PLOS Pathogens* 14(6): e1007015. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007015>

Collins PL, Camargo E & Hill MG (1999). Support plasmids and support proteins required for recovery of recombinant respiratory syncytial virus. *Virology*. Pp 251-255.

Collins PL, Fearn R & Graham BS (2013). Respiratory Syncytial Virus: Virology, reverse genetics and pathogenesis of disease. Pp 3-38.

Collins PL, Hill MG, Cristina J & Grosfeld H. (1996). Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci*. Pp 81-85.

Coverstone, A. M., Wang, L., & Sumino, K. (2019). Beyond Respiratory Syncytial Virus and Rhinovirus in the Pathogenesis and Exacerbation of Asthma: The Role of Metapneumovirus, Bocavirus and Influenza Virus. *Immunology and allergy clinics of North America*, 39(3), 391–401.

DeVincenzo, J. P., El Saleeby, C. M., & Bush, A. J. (2005). Respiratory syncytial virus load predicts disease severity in previously healthy infants. *The Journal of infectious diseases*, 191(11), 1861–1868. <https://doi.org/10.1086/430008>

DeVincenzo JP, Wilkinson T, Vaishnav A, Cehelsky J, Meyers R, Nochur S, Harrison L, Meeking P, Mann A, Moane E, Oxford J, Pareek R, Moore R, Walsh E, Studholme R, Dorsett P, Alvarez R & Lambkin-Williams R (2010). Viral load drives disease in humans experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Am J Respir Crit Care Med*. Pp 1305-1314.

Dhanasekaran, S., Doherty, T. M., Kenneth, J., & TB Trials Study Group (2010). Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *Journal of immunological methods*, 354(1-2), 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.01.004>

Domurat F, Roberts NJ, Walsh EE & Dagan R. (1985). Respiratory syncytial virus infection of human mononuclear leukocytes in vitro and in vivo. *J Inf Dis*. Pp 895-902.

Durbin JE, Johnson TR, Durbin RK, Mertz SE, Morotti RA, Stokes Peebles R & Graham BS (2002). The role of IFN in respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Immunol*. Pp 2944-2952.

Durbin RK, Kotenko SV & Durbin JE (2013). Interferon induction and function at the mucosal surface. *Immunol Rev*. Pp 25-39.

- El Saleeby, C. M., Bush, A. J., Harrison, L. M., Aitken, J. A., & Devincenzo, J. P. (2011). Respiratory syncytial virus load, viral dynamics, and disease severity in previously healthy naturally infected children. *The Journal of infectious diseases*, 204(7), 996–1002. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir494>
- Elena SF & Sanjuan R (2005). Adaptive value of high mutation rates of RNA viruses: separating causes from consequences. *J Virol*. Pp 11555-11558.
- Espinoza JA, Bohmwald K, Céspedes PF, Riedel CA, Bueno SM & Kalergis A (2014). Modulation of host adaptive immunity by hRSV proteins. *5:7*, 740-751.
- Falsey AR, Hennesey PA, Formica MA, Cox C & Walsh EE. (2005). Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *New Eng J of Med*. Pp 1749-1759.
- Frogel M, Nerwen C, Cohen A, VanVeldhuisen P, Harrington M & Boron M (2008). Prevention of hospitalization due to respiratory syncytial virus: results from the Palivizumab outcomes registry. *J Perinato*. Pp 511-517.
- Gan SW, Tan E, Lin X, Yu D, Wang J, Tan GM, Vararattanavech A, Yeo CY, Soon CH, Soong TW, Pervushin K, Torres J. (2012). The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. *J Biol Chem*. Jul 13;287(29):24671-89. doi: 10.1074/jbc.M111.332791. Epub 2012 May
- García-Barreno B, Palomo C, Peñas C, Delgado T, Pérez-Breña P & Melero JA. (1989). Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J Virol*. Pp 925-932.
- García-García ML, Calvo C, Moreira A, Cañas JA, Pozo F, Sastre B, Quevedo S, Casas I & Del Pozo V. (2017). Thymic stromal lymphopoietin, IL-33, and periostin in hospitalized infants with viral bronchiolitis. *Medicine*. Pp 1-7.
- Garofalo RP, Hintz KA, Hill V, Patti J, Ogra PL & Welliver RC (2005). A comparison of epidemiologic and immunologic features of bronchiolitis caused by influenza virus and respiratory syncytial virus. *J Med Virol*. Pp 282-289.
- Garofalo R, Kimpen JLL, Welliver RC & Ogra PL. (1992). Eosinophil degranulation in the respiratory tract during naturally acquired respiratory syncytial virus infection. *J*

Pediatr. Pp 28-32.

Garofalo RP, Patti J, Hintz KA, Hill V, Ogra PL & Welliver RC (2001). Macrophage inflammatory protein-1 α (not T helper type 2 cytokines) is associated with severe forms of Respiratory Syncytial Virus bronchiolitis. Pp 393-399.

Ghildyal R, Ho A, Jans DA. (2006). Central role of the respiratory syncytial virus matrix protein in infection. *FEMS Microbiol Rev.* Sep;30(5):692-705. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00025.x. PMID: 16911040.

Gilman MSA, Liu C, Fung A, Behera I, Jordan P, Rigaux P, Ysebaert N, Tcherniuk S, Sourimant J, Eléouët JF, Sutto-Ortiz P, Decroly E, Roymans D, Jin Z, McLellan JS. (2019). Structure of the Respiratory Syncytial Virus Polymerase Complex. *Cell.* 2019 Sep 19;179(1):193-204.e14. doi: 10.1016/j.cell.2019.08.014. Epub Sep 5. PMID: 31495574; PMCID: PMC7111336.

Giménez HB, Chisholm S, Dornan J & Cash P. (1996). Neutralizing and Enhancing Activities of Human Respiratory Syncytial Virus-Specific Antibodies. 3(3), 280–286.

Glezen WP, Taber LH, Frank AL & Kasel JA (1986). Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Arch Ped Adolesc Med.* Pp 543-546.

González PA, Bueno SM, Carreño LJ, Riedel CA & Kalergis AM. (2012). Respiratory Syncytial virus infection and immunity. Pp 230-244.

González PA, Prado CE, Leiva ED, Carreño LJ, Bueno SM, Riedel CA & Kalergis AM. (2008). Respiratory Syncytial virus impairs T cell activation by preventing synapse assembly with dendritic cells. Pp 14999-15004.

Goritzka M, Pereira C, Makris S, Durant LR & Johansson C (2015). T cell responses are elicited against respiratory syncytial virus in the absence of signalling through TLRs, RLRs and IL-1R/IL-18R. *Nature.* Pp 1-9.

Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM & Dustin ML (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science.* Pp 221-227.

Gramaglia I, Cooper D, Miner KT, Kwon BS & Croft M. (2000). Co-stimulation of antigen-

- specific CD4 T cells by 4-1BB ligand. Pp 392-402.
- Griffiths C, Drews SJ, Marchant DJ. (2017). Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. *Clin Microbiol Rev.* Jan;30(1):277-319. doi: 10.1128/CMR.00010-16. PMID: 27903593; PMCID: PMC5217795.
- Groskreutz DJ, Monick MM, Powers LS, Yarovinsky TO, Look DC & Hunninghake GW (2006). Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells. *J Immunol.* Pp 1733-1740.
- Guerrero-Plata A, Ortega E, Ortiz-Navarrete V & Gomez B. (2004). Antigen presentation by a macrophage-like cell line persistently infected with respiratory syncytial virus. Pp 95-100.
- Guo-Parke H, Canning P, Douglas I, Villenave R, Heaney LG, Coyle PV, Lyons JD, Shields MD & Power UF. (2013). Relative respiratory syncytial virus cytopathogenesis in upper and lower respiratory tract epithelium. *Am J Respir Crit Care Med.* Pp 842-851.
- Habibi, M. S., Jozwik, A., Makris, S., Dunning, J., Paras, A., DeVincenzo, J. P., de Haan, C. A., Wrammert, J., Openshaw, P. J., Chiu, C., & Mechanisms of Severe Acute Influenza Consortium Investigators (2015). Impaired Antibody-mediated Protection and Defective IgA B-Cell Memory in Experimental Infection of Adults with Respiratory Syncytial Virus. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 191(9), 1040–1049. <https://doi.org/10.1164/rccm.201412-2256OC>
- Hall CB, Douglas RG & Geiman JM (1980). Possible transmission by fomites of respiratory syncytial virus. *J infect Dis.* Pp 98-102.
- Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW & Anderson LJ (1990). Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *J Inf Dis.* Pp 162(1283-1290).
- Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, Auinger P, Griffin

- MR, Poehling KA, Erdman D, Grijalva CG, Zhu Y, Szilagyi P (2009). The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Eng J Med*. Pp 588-598.
- Halstead SB (1982). Immune enhancement of viral infection. *Prog Allergy*. Pp 301-364.
- Hancock GE, Speelman DJ, Heers K, Bortell E, Smith J & Cosco C (1996). Generation of atypical pulmonary inflammatory responses in BALB/c mice after immunization with the native attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Virol*. Pp 7783-7791.
- Harris J & Werling D. (2003). Binding and entry of respiratory syncytial virus into host cells and initiation of the innate immune response. *Cell Micro*. Pp 671-680.
- Harrison AM, Bonville CA, Rosenberg HF & Domachowske JB. (1999). Respiratory syncytial virus induced chemokine expression in the lower airways. *Am J Respir Crit Care Med*. Pp 1918-1924.
- He R & Geha RS (2010). Thymic stromal lymphopoietin. *Ann N Y Acad Sci*. Pp 13-24.
- Hemming, V. G., & Prince, G. A. (1990). Immunoprophylaxis of infections with respiratory syncytial virus: observations and hypothesis. *Reviews of infectious diseases*, 12 Suppl 4, S470–S475. https://doi.org/10.1093/clinids/12.supplement_4.s470
- Henderson G, Murray J & Yeo RP. (2002). Sorting of the Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein into Detergent-Resistant Structures Is Dependent on Cell-Surface Expression of the Glycoproteins. *Virology*. 300:244-254.
- Hillyer, P., Shepard, R., Uehling, M., Krenz, M., Sheikh, F., Thayer, K. R., Huang, L., Yan, L., Panda, D., Luongo, C., Buchholz, U. J., Collins, P. L., Donnelly, R. P., & Rabin, R. L. (2018). Differential Responses by Human Respiratory Epithelial Cell Lines to Respiratory Syncytial Virus Reflect Distinct Patterns of Infection Control. *Journal of virology*, 92(15), e02202-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.02202-17>
- Hu B, Li G, Chen Y, Guan X, Fang Z, Jiang J, Jiang Y. (2014). Development of a reverse genetics system for respiratory syncytial virus long strain and an immunogenicity study of the recombinant virus. *Virology Journal*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1743-422x-11-142>

Hua Y, Jiao Y-Y, Ma Y, Peng X-L, Fu Y-H, Zhang X-J, He J-S. (2017). Enhanced humoral and CD8+ T cell immunity in mice vaccinated by DNA vaccine against human respiratory syncytial virus through targeting the encoded F protein to dendritic cells. *Int Immunophar*, 46, 62–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.02.023>.

Hurwitz JL (2011). Respiratory Syncytial virus vaccine development. Pp 1415-1433.

Ianello A, Debbeche O, Martin E, Attalah LH, Samarani S & Ahmad A. (2006). Viral strategies for evading antiviral cellular immune responses of the host. Pp 16-35. Jaberolansar N, Chappell KJ, Watterson D, Bermingham IM, Toth I, Young PR & Skwarczynski M. (2017). Induction of high titred , non- neutralising antibodies by self-adjuvanting peptide epitopes derived from the respiratory syncytial virus fusion protein. *Scientific Reports*, (May), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10415-w>.

Jaberolansar, N., Chappell, K. J., Watterson, D., Bermingham, I. M., Toth, I., Young, P. R., & Skwarczynski, M. (2017). Induction of high titred, non-neutralising antibodies by self-adjuvanting peptide epitopes derived from the respiratory syncytial virus fusion protein. *Scientific reports*, 7(1), 11130. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10415-w>.

Jin, H., Cheng, X., Traina-Dorge, V. L., Park, H. J., Zhou, H., Soike, K., & Kemble, G. (2003). Evaluation of recombinant respiratory syncytial virus gene deletion mutants in African green monkeys for their potential as live attenuated vaccine candidates. *Vaccine*, 21(25-26), 3647–3652. doi:10.1016/s0264-410x(03)00426-2.

Jin, H., Zhou, H., Cheng, X., Tang, R., Munoz, M., & Nguyen, N. (2000). Recombinant respiratory syncytial viruses with deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 genes are attenuated in vitro and in vivo. *Virology*, 273(1), 210–218. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0393>.

Johnson SM, McNally BA, Ioannidis I, Flano E, Teng MN, Oomens AG, Walsh EE & Peeples ME (2015). Respiratory syncytial virus uses CX3CR1 as a receptor on primary human airway epithelial cultures. *PLoS Pathog*. 11(12): e1005318.

- Johnson, J. E., Gonzales, R. A., Olson, S. J., Wright, P. F., & Graham, B. S. (2007). The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 20(1), 108–119.
- Jonasson P, Nygren H, Sta S & Liljeqvist S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. 105, 91–105.
- Kakuk TJ, Soike K, Brideau RJ, Zaya RM, Cole SL, Zhang J, Wathen MW. (1993). A Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) Primate Model of Enhanced Pulmonary Pathology Induced with a Formalin-Inactivated RSV Vaccine but Not a Recombinant FG Subunit Vaccine. Pp 553–561.
- Kapikian AZ, Mitchell RH, Chanock RM, Shvedoff RA & Stewart CE (1969). An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am J Epidemiol*. Pp 405-421.
- Khan IU, Ahmad F, Zhang S, Lu P, Wang J & Zhu N. (2018). Respiratory syncytial virus F and G proteins core fragments fused to HBsAg-binding protein (SBP) induce Th1 dominant immune response without vaccine-enhanced disease.
- Killikelly AM, Kanekiyo M & Graham BS. (2016). Pre-fusion F is absent on the surface of formalin-inactivated respiratory syncytial virus. *Nature Publishing Group*, (September), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep34108>
- Kim, H. W., Canchola, J. G., Brandt, C. D., Pyles, G., Chanock, R. M., Jensen, K., & Parrot, R. H. (1969). Respiratory Syncytial Viruses Disease In Infants Despite Prior Administration Of Antigenic Inactivated Vaccine 12. *American Journal of Epidemiology*, 89(4), 422–434. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a120955
- Kim, H. W., Leikin, S. L., Arrobio, J., Brandt, C. D., Chanock, R. M., & Parrott, R. H. (1976). Cell-mediated immunity to respiratory syncytial virus induced by inactivated vaccine or by infection. *Pediatric research*, 10(1), 75–78. <https://doi.org/10.1203/00006450-197601000-00015>
- Kiss G, Holl JM, Williams GM, Alonas E, Vanover D, Lifland AW, Wright ER. (2014).

- Structural Analysis of Respiratory Syncytial Virus Reveals the Position of M2-1 between the Matrix Protein and the Ribonucleoprotein. 88(13), 7602–7617. <https://doi.org/10.1128/JVI.00256-14>.
- Krarpur A, Furmanova-hollenstein P, Bogaert L, Bouchier P, Bisschop IJM, Widjoatmodjo, MN, Langedijk JPM. (2015). A highly stable prefusion RSV F vaccine derived from structural analysis of the fusion mechanism. <https://doi.org/10.1038/ncomms9143>.
- Krzyzaniak MA, Zumstein MT, Gerez JA, Picotti P & Helenius A (2013). Host cell entry of respiratory syncytial virus involves macropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein. *PLoS Pathog*. 9(4): e1003309.
- Kruijsen D, Bakkers MJ, van Uden NO, Viveen MC, van der Sluis TC, Kimpen JL, Leusen JH, Coenjaerts FE & van Bleek GM. (2010). Serum antibodies critically affect virus specific CD4+/CD8+ T cell balance during respiratory syncytial virus infections. *J Immunol*. Pp 6489-6498.
- Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman LW, Golenbock DT, Anderson LJ & Finberg RW (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature*. Pp 398-401.
- Kutsaya A, Teros-Jaakkola T, Toivonen L, Peltola V, Waris M & Julkunen I (2016). Prospective clinical and serological follow-up in early childhood reveals a high rate of subclinical RSV infection and a relatively high reinfection rate within the first 3 years of life. *Epidemiol Infect*. Pp 1622-1633.
- Lambert L, Sagfors AM, Openshaw PJM & Culley FJ. (2014). Immunity to RSV in early-life. *Frontiers in Immunology*, 5(SEP). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00466>.
- Lay MK, González PA, León MA, Céspedes PF, Bueno SM, Riedel CA & Kalergis AM (2013). Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response. *Micro Inf*. Pp 230-242.
- Lee, Y. T., Kim, K. H., Hwang, H. S., Lee, Y., Kwon, Y. M., Ko, E. J., Jung, Y. J., Lee, Y.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

N., Kim, M. C., & Kang, S. M. (2015). Innate and adaptive cellular phenotypes contributing to pulmonary disease in mice after respiratory syncytial virus immunization and infection. *Virology*, 485, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.07.001>.

Levine S, Klaiber-Franco R & Paradiso PR. (1987). Demonstration that Glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J gen Virol*. Pp 2521-2524.

Liljeroos L, Krzyzaniak MA, Helenius A & Butcher SJ (2013). Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. *PNAS*. 11133-11138.

Lindquist ME, Lifland AW, Utley TJ, Santangelo PJ, Crowe JE Jr. (2010). Respiratory syncytial virus induces host RNA stress granules to facilitate viral replication. *J Virol*. Dec;84(23):12274-84. doi: 10.1128/JVI.00260-10. Epub 2010 Sep 15. PMID: 20844027; PMCID: PMC2976418.

Littel-van den Hurk, S van D, Garg R, Theaker M & Martinez EC. (2006). A single intranasal immunization with a subunit vaccine formulation induces higher mucosal IgA production than live respiratory syncytial virus. *Virology*, 499, 288–297. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.09.023>.

Lotz & Peebles. (2012). Mechanisms of Respiratory Syncytial Virus Modulation of Airway Immune Responses. 380–387. <https://doi.org/10.1007/s11882-012-0278-z>.

Mastrangelo P & Hegele RG. (2013). RSV Fusion: Time for a new model. *Viruses*. Pp 873-885.

McIntosh, K., McQuillin, J., & Gardner, P. S. (1979). Cell-free and cell-bound antibody in nasal secretions from infants with respiratory syncytial virus infection. *Infection and immunity*, 23(2), 276–281. <https://doi.org/10.1128/iai.23.2.276-281.1979>

McLellan JS, Yang Y, Zhang B, Chen L, Srivatsan S, Chuang G, Todd J. (2013). *HHS Public Access*. 342(6158), 592–598. <https://doi.org/10.1126/science.1243283>. Structure-Based

McNamara PS, Flanagan BF, Baldwin LM, Newland P, Hart CA & Smyth RL (2004). Interleukin 9 production in the lungs of infants with severe respiratory syncytial virus

- bronchiolitis. *Lancet*. Pp 1031-1037.
- McNamara PS, Flanagan BF, Hart CA & Smyth RL (2005). Production of chemokines in the lungs of infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Inf Dis*. Pp 1225-1232.
- Melero JA, Mas V, McLellan JS. (2016). Structural, antigenic and immunogenic features of respiratory syncytial virus glycoproteins relevant for vaccine development. *Vaccine*. 2017 Jan 11;35(3):461-468. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.09.045. Epub Sep 28. PMID: 27692522; PMCID: PMC5189713.
- Miller RE, Lynch DH, Gliniak B, Le T, Jones J, Whitmore J & Boiani N. (2002). 4-1BB-Specific Monoclonal Antibody Promotes the Generation of Tumor-Specific Immune Responses by Direct Activation of CD8 T Cells in a CD40-Dependent Manner. *J Immuno*, 169(4), 1792–1800. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.4.1792>
- Mitra R, Baviskar P, Duncan-decocoq RR, Patel D & Oomens AGP. (2012). The Human Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Required for Maturation of Viral Filaments. (M), 4432–4443. <https://doi.org/10.1128/JVI.06744-11>.
- Morris JA, Blount RE & Savage RE. (1956). Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. Pp 544-549.
- Moyle, P. M. (2017). Biotechnology approaches to produce potent, self-adjuvanting antigen-adjuvant fusion protein subunit vaccines. *Biotechnology Advances*, 35(3), 375–389.doi:10.1016/j.biotechadv.2017.03.005
- Müller N, Avota E, Schneider-Schaulies J, Harms H, Krohne G & Schneider-Schaulies S. (2006). Measles virus contact with T cells impedes cytoskeletal remodeling associated with spreading, polarization and CD3 clustering. Pp 849-858.
- Muniyandi S, Pangratiou G, Edwards TA, Barr JN. (2018). Structure and Function of the Human Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein. *Subcell Biochem*. 88:245-260. doi: 10.1007/978-981-10-8456-0_11. PMID: 29900500.
- Muralidharan A, Russell M, Larocque L, Caroline G, Li C, Chen W, Li X. (2018). Targeting CD40 enhances antibody- and CD8-mediated protection against respiratory

syncytial virus infection. (October), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34999-z>

Murphy BR, Prince GA, Walsh EE, Kim HWA, Robert H, Hemming VALG, Chanock RM. (1986). Dissociation between Serum Neutralizing and Glycoprotein Antibody Responses of Infants and Children Who Received Inactivated Respiratory Syncytial. *Virus Vaccine*. 24(2), 197–202.

Nadal D & Ogra PL (1990). Development of local immunity: role in mechanisms of protection against or pathogenesis of respiratory syncytial viral infections. *Lung*. Pp 379-387.

Nam HH, Ison MG.(2019). Respiratory syncytial virus infection in adults. *BMJ*. 2019;366:l5021. Published. Sep 10. doi:10.1136/bmj.l5021.

Noor A & Krilov LR (2018). Respiratory syncytial virus vaccine: where are we now and what comes next?. *Expert opinion on biological therapy*. Pp 1-10.

Oh S, Hodge JW, Ahlers JD, Burke DS, Schlom J & Berzofsky JA. (2019). Selective induction of high avidity CTL by altering the balance of signals from APC. 2523-2530.

Okabayashi T, Kojima T, Masaki T, Yokota S, Imaizumi T, Tsutsumi H, Himi T, Fujii M & Sawada N (2011). Type III interferon, not type I, is the predominant interferon induced by respiratory viruses in nasal epithelial cells. *Virus Research*. Pp 360-366.

Openshaw PJM. (1995). Immunity and Immunopathology to respiratory syncytial virus. The mouse model. *Am J Respir Crit Care Med*. Pp 559-562.

Openshaw PJM & Tregoning JS. (2005). Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. *Clin Micro Rev*. Pp 541-555.

Osiowy C, Horne D & Anderson R (1994). Antibody-dependent enhancement of respiratory syncytial virus infection by sera from young infants. *Clin Diag Lab Immunol*. Pp 670-677.

Patton K, Aslam S, Shambaugh C, Lin R, Heeke D, Frantz C, Lambert SL. (2015). Enhanced immunogenicity of a respiratory syncytial virus (RSV) F subunit vaccine formulated with the adjuvant GLA-SE in cynomolgus macaques. *Vaccine*, 33(36),

- 4472–4478. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.025>
- Pepini T, Pulichino A, Carsillo T, Carlson AL, Sari-sarraf F, Ramsauer K, Maruggi G. (2017). Self-Amplifying RNA Vaccine: Implications for Vaccine Design. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601877>
- Pickles, R. J., & DeVincenzo, J. P. (2015). Respiratory syncytial virus (RSV) and its propensity for causing bronchiolitis. *The Journal of pathology*, 235(2), 266–276. <https://doi.org/10.1002/path.4462>
- Piedmonte G & Perez MK (2014). Respiratory syncytial virus and bronchiolitis. *Pediatrics in review*. Pp 519-530.
- Piedra, P. A., Hause, A. M., & Aideyan, L. (2016). Respiratory Syncytial Virus (RSV): Neutralizing Antibody, a Correlate of Immune Protection. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1442, 77–91. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3687-8_7
- Polack FP, Teng MN, Collins PL, Prince GA, Exner M, Regele H, Karron RA. (2002). A Role for Immune Complexes in Enhanced Respiratory Syncytial Virus Disease. 196(6), 859–865. <https://doi.org/10.1084/jem.20020781>.
- Pyle, C. J., Uwadiae, F. I., Swieboda, D. P., & Harker, J. A. (2017). Early IL-6 signalling promotes IL-27 dependent maturation of regulatory T cells in the lungs and resolution of viral immunopathology. *PLoS pathogens*, 13(9), e1006640. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006640>.
- Román M, Calhoun WJ, Hinton KL, Avendaño LF, Simon V, Escobar AM, Gaggero A & Díaz PV. (1997). Respiratory Syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th-2-like response. Pp 190-195.
- Ruuskanen O & Ogra PL (1993). Respiratory syncytial virus. *Curr Problems Pediat*. Pp 50-79.
- Sanchez-Paulete AR, Labiano S, Rodriguez-Ruiz ME, Azpilikueta A, Etxeberria I, Bolaños E, Melero I. (2016). Deciphering CD137 (4-1BB) signaling in T-cell costimulation for translation into successful cancer immunotherapy. *European Journal of Immunology*, 46(3), 513–522. <https://doi.org/10.1002/eji.201445388>

- Saravia J, You D, Shrestha B, Jaligama S, Siefker D, Lee GI, Harding JN, Jones TL, Rovnaghi C, Bagga B, DeVicenzo JP & Cornier SA. (2015). Respiratory syncytial virus disease is mediated by age-variable IL-33. *PLoS Pathog*. Pp 1-17.
- Schmidt ME & Varga SM. (2018). Cytokine Cytokines and CD8 T cell immunity during respiratory syncytial virus infection. *Cytokine*, (July), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.07.012>
- Schneider-Ohrum K, Ren K, McTamney P, O'Day T, McCarthy MP, Rajani GM, Hostetler L. (2017). Immunization with Low Doses of Recombinant Postfusion or Prefusion Respiratory Syncytial Virus F Primes for Vaccine-Enhanced Disease in the Cotton Rat Model Independently of the Presence of a Th1-Biasing (GLA-SE) or Th2-Biasing (Alum) Adjuvant. *J Viro*, 91(8), 1–19. <https://doi.org/10.1128/jvi.02180-16>.
- Scott PD, Ochola R, Ngama M, Okiro EA, Nokes DJ, Medley GF & Cane PA. (2008). Molecular analysis of respiratory syncytial virus reinfections in infants from coastal Kenya. *J Infect Dis*. Pp 59-67.
- Sedeyn K, Schepens B, Saelens X. (2019). Respiratory syncytial virus nonstructural proteins 1 and 2: Exceptional disrupters of innate immune responses. *PLoS Pathog*. Oct 17;15(10):e1007984. doi: 10.1371/journal.ppat.1007984. PMID: 31622448; PMCID: PMC6797084.
- Shadman KA & Wald ER. (2011). A review of palivizumab and emerging therapies for respiratory syncytial virus. *Expert Opinion on Biological Therapy*. Pp 1455-1467.
- Shaikh FY, Crowe JE Jr. (2013). Molecular mechanisms driving respiratory syncytial virus assembly. *Future Microbiol*; 8(1):123-131. doi:10.2217/fmb.12.132
- Shao Z & Schwarz H. (2011). CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(1), 21–29. <https://doi.org/10.1189/jlb.0510315>.
- Shaw CA, Galarneau J, Bowenkamp KE, Swanson KA, Palmer GA, Palladino G, Markovits JE, Valiante NM, Dormitzer PR & Otten GR (2013). The role of non-viral antigens in the cotton rat model of respiratory syncytial virus vaccine. enhanced disease. *Vaccine*. Pp 306-312.

- Shay DK, Children AUS, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Page P. (2015). *Bronchiolitis-Associated Hospitalizations Among US Children, 1980-1996*. 30333.
- Shi T, Balsells E, Wastnedge E, Singleton R, Rasmussen ZA, Zar HJ, Rath BA, Madhi SA, Campbell S, Cheyenne Vacari L, Bulkow LR, Thomas ED, Barnett W, Hoppe C, Campbell H & Nair H (2015). Risk factors for respiratory syncytial virus associated with acute lower respiratory infection in children under five years: systematic review and meta-analysis. *J Global Health*. Pp 235-247.
- Shuford WW, Klussman K, Tritchler DD, Loo DT, Chalupny J, Siadak AW, Brown J, Emswiler J, Roecho H, Larsen CP, Pearson TC, Ledbetter JA, Aruffo A & Mittler RS. (1997). 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8⁺ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxicity T cell response. Pp 47-55.
- Schwarze, J., & Schauer, U. (2004). Enhanced virulence, airway inflammation and impaired lung function induced by respiratory syncytial virus deficient in secreted G protein. *Thorax*, 59(6), 517–521. <https://doi.org/10.1136/thx.2003.017343>
- Sigurs N, Aljassim F, Kjellman B, Robinson PD, Sigurbergsson F, Bjarnason R, Gustafsson PM (2010). Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life. *Thorax*. Pp 1045-1052.
- Spann KM, Tran KC, Chi B, Rabin RL & Collins PL (2004). Suppression of the induction of alpha, beta and gamma interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages. *J Virol*. Pp 4363-4369.
- Spann KM, Tran KC & Collins PL (2005). Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kB, and proinflammatory cytokines. *J Virol*. Pp 5353-5362.
- Srikiatkachorn, A., & Braciale, T. J. (1997). Virus-specific CD8⁺ T lymphocytes downregulate T helper cell type 2 cytokine secretion and pulmonary eosinophilia during experimental murine respiratory syncytial virus infection. *The Journal of experimental medicine*, 186(3), 421–432.
- Stark JM, Stark MA, Colasurdo GN & LeVine AM (2006). Decreased bacterial clearance

from the lungs of mice following primary respiratory syncytial virus infection. *J Med Virol.* Pp 829-838.

Swedan S, Andrews J, Majumdar T, Musiyenko A & Barik S. (2011). Multiple functional domains and complexes of the two nonstructural proteins of human respiratory syncytial virus contribute to interferon suppression and cellular location. *J Virol.* Pp 10090-10100.

Tan JT, Whitmire JK, Ahmed R, Pearson TC & Larsen CP. (1999). 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. Pp 4859-4868.

Tang, R. S., MacPhail, M., Schickli, J. H., Kaur, J., Robinson, C. L., Lawlor, H. A., Guzzetta, J. M., Spaete, R. R., & Haller, A. A. (2004). Parainfluenza virus type 3 expressing the native or soluble fusion (F) Protein of Respiratory Syncytial Virus (RSV) confers protection from RSV infection in African green monkeys. *Journal of virology*, 78(20), 11198–11207. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.20.11198-11207.2004>

Teng MN & Collins PL. (1998). Identification of the Respiratory Syncytial Virus Proteins Required for Formation and Passage of Helper-Dependent Infectious Particles. 72(7), 5707–5716.

Teng MN & Collins PL. (2002). The central conserved cystine noose of the attachment G protein of human respiratory syncytial virus is not required for efficient viral infection in vitro or in vivo. *J Viro.* Pp 6164-6171.

Teng, M. N., Whitehead, S. S., Bermingham, A., St Claire, M., Elkins, W. R., Murphy, B. R., & Collins, P. L. (2000). Recombinant respiratory syncytial virus that does not express the NS1 or M2-2 protein is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees. *Journal of virology*, 74(19), 9317–9321.

Terrosi, C., Di Genova, G., Savellini, G. G., Correale, P., Blardi, P., & Cusi, M. G. (2007). Immunological characterization of respiratory syncytial virus N protein epitopes recognized by human cytotoxic T lymphocytes. *Viral immunology*, 20(3), 399–406. <https://doi.org/10.1089/vim.2007.0041>

- Thornhill, E. M., Salpor, J., & Verhoeven, D. (2020). Respiratory syncytial virus: Current treatment strategies and vaccine approaches. *Antiviral chemistry & chemotherapy*, 28, 2040206620947303. <https://doi.org/10.1177/2040206620947303>.
- Thoulouze MI, Sol-Foulon N, Blanchet F, Dautry-Varsat A, Schwartz O & Alcover A (2006). Human Immunodeficiency virus type-1 infection impairs the formation of the immunological synapse. *Immunity*. Pp 547-561.
- Tripp RA, Jones LP, Haynes LM, Zheng H, Murphy PM & Anderson LJ. (2001). CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nature*. Pp 732-738.
- van Erp EA, Luytjes W, Ferwerda G, van Kasteren PB (2019). Fc-mediated antibody effector functions during respiratory syncytial virus infection and disease. *Front Immunol*. Pp 1-20.
- van Mechelen L, Luytjes W, de Haan CAM & Wicht O (2016). RSV neutralization by palivizumab, but not by monoclonal antibodies targeting other epitopes, is augmented by Fc gamma receptors. *Antiv Res*. Pp 1-5.
- Ventre K & Randolph A (2007). Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. Cochrane database of systematic review. Issue 1. Art No. CD000181.
- Vigerust DJ, Sheperd VL (2007). Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends in Microb*. Pp 211-218.
- Walsh, E. E., & Hall, C. B. (2015). Respiratory Syncytial Virus (RSV). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 1948–1960.e3. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00160-0>
- Walsh EE & Hruska J. (1983). Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. *J Viro*. Pp 171-177.
- Wang G, Deval J, Hong J, Dyatkina N, Prhavc M, Taylor J, Fung A, Jin Z, Stevens SK, Serebryany V, Liu J, Zhang Q, Tam Y, Chanda SM, Smith DB, Symons JA, Blatt LM, Beigelman L (2015). Discovery 4'-chloromethyl -2'-deoxy-3',5'-di-O-isobutyryl-2'-

fluorocytidine (ALS-8176), a first in class RSV polymerase inhibitor for treatment of human respiratory syncytial virus infection. *J Med Chem*. Pp 1862-1878.

Watts TH. (2005). TNF/TNFR Family members in costimulation of T cell responses. Pp 23-68.

Welliver RC. (2003). Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 22(SUPPL. 2), 6–12. <https://doi.org/10.1097/00006454-200302001-00002>

Whelan, J. A., Russell, N. B., & Whelan, M. A. (2003). A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of immunological methods*, 278(1-2), 261–269. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(03\)00223-0](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(03)00223-0)

Wright PF. (2014). Progress in the Prevention and Treatment of RSV Infection. <https://doi.org/10.1056/NEJMe1405776>.

Wright PF, Ikizler MR, Gonzales RA, Carrol KN, Johnson JE & Werkhaven JA. (2005). Growth of respiratory syncytial virus in primary epithelial cells from the human respiratory tract. *J Virol*. Pp 8651-8654.

Ye Q, Song D, Poussin M, Yamamoto T, Best A, Li C, Coukos G & Powell Jr DJ. (2014). CD137 accurately identifies and enriches for naturally-occurring tumor-reactive T cells in tumors. Pp 44-55.

ANEXO A

Ensayo de IgG específico de RSV de sueros de animales control e inmunizados con SA-F3X-BBL

Lecturas de absorbancia 450 nm (630 nm de referencia) y resultados obtenidos tras ensayo de determinación de IgG específico de RSV en sueros de animales inmunizados con SA-F3X-BBL. A cada lectura se le restó el valor blanco.

1. Se definió un valor de corte como el valor medio de control negativo más 0.055.
 2. Los resultados experimentales deben cumplir las siguientes condiciones:
 - DO en blanco no debe ser superior a 0.08
 - DO en control positivo superior a 0.8
 - El valor medio de DO de control negativo inferior a 0.1
- o Mientras DO muestra $\geq$ valor de corte: Positivo
- o Mientras DO muestra $<$ valor de corte: Negativo

Blanco	Negativo	Positivo	Control	10 μ g	20 μ g	50 μ g
0.055	0.1043	3.441	0.57	0.55	0.53	0.55
			0.515	0.495	0.505	0.525
			0.56	0.52	0.495	0.5
			0.515	0.51	0.525	0.52
			0.545	0.53	0.515	0.51



Análisis estadístico de los datos obtenidos de los ensayos de análisis de anticuerpos IgG producidos tras la inmunización con SA-F3X-BBL en suero a los 14 días de refuerzo con la proteína recombinante. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad 7.0.

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons								
1	Number of families	1						
2	Number of comparisons per family	3						
3	Alpha	0.05						
4								
5	Dunnnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	C-?	
6								
7	CONTROL vs. 10 µg SA-F3X-BBL	0.02	-0.01313 to 0.05313	No	ns	0.3050	D	10 µg SA-F3X-BBL
8	CONTROL vs. 20 µg SA-F3X-BBL	0.027	-0.006125 to 0.06013	No	ns	0.1228	E	20 µg SA-F3X-BBL
9	CONTROL vs. 50 µg SA-F3X-BBL	0.02	-0.01313 to 0.05313	No	ns	0.3050	F	50 µg SA-F3X-BBL
10								
11								
12	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q
13								DF
14	CONTROL vs. 10 µg SA-F3X-BBL	0.541	0.521	0.02	0.01278	5	5	1.565
15	CONTROL vs. 20 µg SA-F3X-BBL	0.541	0.514	0.027	0.01278	5	5	2.113
16	CONTROL vs. 50 µg SA-F3X-BBL	0.541	0.521	0.02	0.01278	5	5	1.565

Ensayo del título de anticuerpos neutralizantes

Análisis estadístico de los datos obtenidos de los ensayos del título de anticuerpos neutralizantes tras la inmunización con SA-F3X-BBL en células Vero. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad 7.0.

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons								
1	Number of families	1						
2	Number of comparisons per family	6						
3	Alpha	0.05						
4								
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
6								
7	Control vs. 10 µg	-10.2	-16.36 to -4.037	Yes	**	0.0012	A-B	
8	Control vs. 20 µg	-15	-21.16 to -8.837	Yes	****	<0.0001	A-C	
9	Control vs. 50 µg	-6.2	-12.36 to -0.03717	Yes	*	0.0484	A-D	
10	10 µg vs. 20 µg	-4.8	-10.96 to 1.363	No	ns	0.1577	B-C	
11	10 µg vs. 50 µg	4	-2.163 to 10.16	No	ns	0.2845	B-D	
12	20 µg vs. 50 µg	8.8	2.637 to 14.95	Yes	**	0.0043	C-D	
13								
14								
15	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q
16								DF
17	Control vs. 10 µg	1	11.2	-10.2	2.154	5	5	6.897
18	Control vs. 20 µg	1	16	-15	2.154	5	5	9.848
19	Control vs. 50 µg	1	7.2	-6.2	2.154	5	5	4.07
20	10 µg vs. 20 µg	11.2	16	-4.8	2.154	5	5	3.151
21	10 µg vs. 50 µg	11.2	7.2	4	2.154	5	5	2.626
22	20 µg vs. 50 µg	16	7.2	8.8	2.154	5	5	5.777

Determinación de la carga viral en animales no inmunizados y los inmunizados con SA-F3X-BBL y retos con RSV in vitro por qPCR.

Cálculo de la cantidad de genomas de RSV presentes en los sueros de ratones control y los inmunizados con SA-F3X-BBL por qPCR y normalizados a 10 ng.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
	ng/μl de RNA	μl de RNA	ng de muestra	entre 20 μl de rx. PCR	x 2μl usados en PCR en tiempo real	Ct	sustituyendo x en curva		Número de copias/10 ng		
control 1:1	7.7	3.5	26.95	1.3475	2.695	31.88 32.07 31.1	4.14 4.09 4.36	1.38E+04 1.23E+04 2.29E+04	5.12E+04 4.57E+04 8.49E+04	Gráfica de c y 10 m -3.603 b 46.807	
control 1:2	4.1	14	57.4	2.87	5.74	31.75 32.62 33.06	3.62 3.94 3.82	4.21E+03 8.66E+03 6.54E+03	7.33E+03 1.51E+04 1.14E+04		
control 1:4	4	14	56	2.8	5.6	27.2 27.33 27.35	5.44 5.41 5.40	2.77E+05 2.55E+05 2.51E+05	4.94E+05 4.55E+05 4.49E+05		
control 1:8	5.7	14	79.8	3.99	7.98	30.51 30.57 30.65	4.52 4.51 4.48	3.34E+04 3.21E+04 3.05E+04	4.18E+04 4.02E+04 3.82E+04		
control 1:16	4.9	14	68.6	3.43	6.86	31.13 31.01 31.12	4.35 4.38 4.35	2.24E+04 2.42E+04 2.26E+04	3.27E+04 3.53E+04 3.29E+04		
10ug 1:1	3.9	14	54.6	2.73	5.46	34.02 35.95	3.55 3.01	3.54E+03 1.03E+03	6.48E+03 1.89E+03		
10ug 1:2	4.1	14	57.4	2.87	5.74	35.21 34.27 34.91	3.22 3.48 3.30	1.65E+03 3.02E+03 2.00E+03	2.88E+03 5.26E+03 3.49E+03		
10ug 1:4	4.7	14	65.8	3.29	6.58	32.98 31.84 33.31	3.84 4.15 3.75	6.88E+03 1.43E+04 5.57E+03	1.05E+04 2.17E+04 8.47E+03		
10ug 1:8	4.1	3.5	14.35	0.7175	1.435	31.5 31.98 31.51	4.25 4.12 4.25	1.77E+04 1.30E+04 1.76E+04	1.23E+05 9.09E+04 1.23E+05		
10ug 1:16	15.3	14	214.2	10.71	21.42	35.53	3.13	1.35E+03	6.30E+02		
20ug 1:1	6	14	84	4.2	8.4	34.81 34.24 30.77	2.92 3.09 4.14	8.29E+02 1.23E+03 1.37E+04	9.86E+02 1.47E+03 1.63E+04		
20ug 1:2	5.7	14	79.8	3.99	7.98	33.48 32.5 31.97	3.32 3.61 3.77	2.09E+03 4.12E+03 5.95E+03	2.61E+03 5.16E+03 7.46E+03	Gráfica de 20 y 50 m -3.317 b 44.49	
20ug 1:4	6	14	84	4.2	8.4	31.76 31.87 31.97	3.84 3.80 3.77	6.88E+03 6.38E+03 5.95E+03	8.19E+03 7.59E+03 7.08E+03		
20ug 1:8	7	3.5	24.5	1.225	2.45	31.1 31.32 31.29	4.04 3.97 3.98	1.09E+04 9.34E+03 9.54E+03	4.44E+04 3.81E+04 3.89E+04		
20ug 1:16	13.6	14	190.4	9.52	19.04	34.71 35.51 34.06	2.95 2.71 3.14	8.88E+02 5.10E+02 1.39E+03	4.64E+02 2.68E+02 7.32E+02		
50ug 1:1	5	14	70	3.5	7	35.16 36.51	2.81 2.41	6.50E+02 2.55E+02	9.28E+02 3.64E+02		
50ug 1:2	10.1	14	141.4	7.07	14.14						
50ug 1:4	11.3	14	158.2	7.91	15.82						
50ug 1:8	4.1	14	57.4	2.87	5.74	34.95 36.35 34.1	2.88 2.45 3.13	7.52E+02 2.84E+02 1.36E+03	4.75E+02 4.96E+02 2.36E+03		
50ug 1:16	6	3.5	21	1.05	2.1	35.26 31.82 32.38	2.78 3.82 3.65	6.06E+02 6.60E+03 4.48E+03	1.06E+03 8.14E+04 2.13E+04		
rep c 1:4	6	14	84	4.2	8.4	31.93 16.72 17.56	3.79 9.44 9.12	6.12E+03 2.77E+09 1.31E+09	2.91E+04 3.30E+09 1.56E+09		
rep 10ug 1:8	4.9	14	68.6	3.43	6.86	16.98 22.71 23.02	9.34 7.12 7.00	2.20E+09 1.33E+07 1.01E+07	2.61E+09 1.93E+07 1.47E+07		
rep 20ug 1:8	6	14	84	4.2	8.4	23 22.85 22.97	7.01 7.07 7.02	1.02E+07 1.17E+07 1.05E+07	1.49E+07 1.39E+07 1.25E+07	Gráfica de repeticiones m -2.582 b 41.1	
						23.31	6.89	7.76E+06	9.24E+06		

Análisis estadístico de los datos obtenidos de los ensayos de análisis de anticuerpos neutralizantes tras la inmunización con SA-F3X-BBL sobre la carga viral en tejido al ser retados con RSV. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad 8.0.

2way ANOVA						
Multiple comparisons						
3	Number of families	5				
4	Number of comparisons per family	6				
5	Alpha	0.05				
6						
7	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
8						
9	Row 1					
10	Control vs. 10 µg	56415	20100 to 92730	Yes	***	0.0010
11	Control vs. 20 µg	54348	21867 to 86829	Yes	***	0.0004
12	Control vs. 50 µg	59954	23639 to 96269	Yes	***	0.0004
13	10 µg vs. 20 µg	-2067	-38382 to 34248	No	ns	0.9987
14	10 µg vs. 50 µg	3539	-36242 to 43320	No	ns	0.9951
15	20 µg vs. 50 µg	5606	-30709 to 41921	No	ns	0.9754
16						
17	Row 2					
18	Control vs. 10 µg	67173	34692 to 99654	Yes	****	<0.0001
19	Control vs. 20 µg	65973	33492 to 98454	Yes	****	<0.0001
20	Control vs. 50 µg	71049	38568 to 103530	Yes	****	<0.0001
21	10 µg vs. 20 µg	-1200	-33681 to 31281	No	ns	0.9996
22	10 µg vs. 50 µg	3877	-28604 to 36358	No	ns	0.9883
23	20 µg vs. 50 µg	5077	-27404 to 37558	No	ns	0.9745
				</		

41	Row 5								
42	Control vs. 10 µg	39755	7274 to 72236	Yes	*	0.0113			
43	Control vs. 20 µg	39067	6586 to 71548	Yes	*	0.0131			
44	Control vs. 50 µg	68469	35988 to 100950	Yes	****	<0.0001			
45	10 µg vs. 20 µg	-687.7	-33169 to 31793	No	ns	>0.9999			
46	10 µg vs. 50 µg	28714	-3767 to 61195	No	ns	0.0991			
47	20 µg vs. 50 µg	29402	-3079 to 61883	No	ns	0.0879			
48									
49									
50	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
51									
52	Row 1								
53	Control vs. 10 µg	60600	4185	56415	13484	3	2	5.917	36.00
54	Control vs. 20 µg	60600	6252	54348	12060	3	3	6.373	36.00
55	Control vs. 50 µg	60600	646.0	59954	13484	3	2	6.288	36.00
56	10 µg vs. 20 µg	4185	6252	-2067	13484	2	3	0.2168	36.00
57	10 µg vs. 50 µg	4185	646.0	3539	14771	2	2	0.3388	36.00
58	20 µg vs. 50 µg	6252	646.0	5606	13484	3	2	0.5880	36.00
59									
60	Row 2								
61	Control vs. 10 µg	71049	3877	67173	12060	3	3	7.677	36.00
62	Control vs. 20 µg	71049	5077	65973	12060	3	3	7.736	36.00
63	Control vs. 50 µg	71049	0.000	71049	12060	3	3	8.331	36.00
64	10 µg vs. 20 µg	3877	5077	-1200	12060	3	3	0.1407	36.00
65	10 µg vs. 50 µg	3877	0.000	3877	12060	3	3	0.4546	36.00
66	20 µg vs. 50 µg	5077	0.000	5077	12060	3	3	0.5953	36.00
67									
68	Row 3								
69	Control vs. 10 µg	65298	13557	51741	12060	3	3	6.067	36.00
70	Control vs. 20 µg	65298	7620	57678	12060	3	3	6.763	36.00
71	Control vs. 50 µg	65298	475.0	64823	17056	3	1	5.375	36.00
72	10 µg vs. 20 µg	13557	7620	5937	12060	3	3	0.6961	36.00
73	10 µg vs. 50 µg	13557	475.0	13082	17056	3	1	1.085	36.00
74	20 µg vs. 50 µg	7620	475.0	7145	17056	3	1	0.5924	36.00
75									
76	Row 4								
77	Control vs. 10 µg	40067	112300	-72233	12060	3	3	8.470	36.00
78	Control vs. 20 µg	40067	40467	-400.0	12060	3	3	0.04690	36.00
79	Control vs. 50 µg	40067	1305	38761	12060	3	3	4.545	36.00
80	10 µg vs. 20 µg	112300	40467	71833	12060	3	3	8.423	36.00
81	10 µg vs. 50 µg	112300	1305	110995	12060	3	3	13.02	36.00
82	20 µg vs. 50 µg	40467	1305	39161	12060	3	3	4.592	36.00
83									
84	Row 5								
85	Control vs. 10 µg		39755	12060	3	3	4.662	36.00	
86	Control vs. 20 µg		39067	12060	3	3	4.581	36.00	
87	Control vs. 50 µg		68469	12060	3	3	8.029	36.00	
88	10 µg vs. 20 µg		-687.7	12060	3	3	0.08064	36.00	
89	10 µg vs. 50 µg		28714	12060	3	3	3.367	36.00	
90	20 µg vs. 50 µg		29402	12060	3	3	3.448	36.00	