

**DETECCIÓN DE MUTACIONES
RESPONSABLES DE LA RESISTENCIA AL
PALIVIZUMAB EN AISLADOS DE VIRUS
RESPIRATORIO SINCITAL**

**Natalia Farina
Orientador: Dr. Juan Arbiza
Coorientadora: Dra. Sandra Frabasile
Sección Virología.
Facultad de Ciencias UdeLaR
Montevideo, Uruguay
2011**

1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	6
2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS INFECCIONES POR VRS.....	8
2.2 VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL	9
2.2.1 GENOMA VIRAL Y TRANSCRIPCIÓN	11
2.2.2 PROTEÍNAS VIRALES.....	13
2.2.3 CICLO REPLICATIVO.....	19
2.3 SUBGRUPOS ANTIGÉNICOS Y DIVERSIDAD.....	21
2.4 EVOLUCIÓN VIRAL: CUASIESPECIES	22
2.5 INMUNIDAD VIRAL	24
2.6 DESARROLLO DE VACUNAS Y TERAPIAS PARA LAS INFECCIONES CON VRS	26
2.7 INMUNOPRFILAXIS CON PALIVIZUMAB	27
2.8 DETECCIÓN DE MUTANTES DE ESCAPE RESISTENTES AL PZ.....	28
3. OBJETIVOS.....	31
4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS	35
Propagación de cepas de VRS en cultivos celulares.....	36
Infección de cultivos celulares de HEp-2.....	36
Recuperación de material a partir de los cultivos celulares infectados	37
Extracción de ARN total correspondientes a las cepas pre-PZ amplificadas en cultivo celular	37
Amplificación por RT-PCR del gen de la proteína N de VRS de extractos de ARN almacenados a -80 °C, de cepas Pre-PZ propagadas en cultivo celular y de muestras post-PZ.....	38
Amplificación por RT-PCR del gen de la proteína F de VRS para cepas pre y post PZ.....	39
Secuenciación del gen de la proteína F de VRS y análisis informático de secuencias para la búsqueda de mutaciones de posible relevancia para la resistencia a PZ	41
Datos clínicos de las muestras post-PZ utilizadas.....	41
Extracción de ARN total a partir de aspirados nasofaríngeos de niños tratados con PZ utilizando un kit de extracción comercial.....	42
Amplificación mediante RT-PCR del gen de la β -globina para testear la calidad de las extracciones de ARN a partir de los aspirados nasofaríngeos correspondientes a las cepas post – PZ.....	43
Inmunofluorescencia a partir de aspirados nasofaríngeos de niños tratados con PZ como profiláctico para verificar la negatividad para VRS de las muestras clínicas ..	44

Amplificación por pcr anidada de la proteína del hexón de Adenovirus.....	45
Electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	45
6. RESULTADOS	46
Propagación de cepas de VRS pre- PZ en cultivos celulares.....	47
Estrategia del pasaje en cultivo celular de las cepas pre-PZ.....	47
Amplificación del gen de la proteína N de VRS de extractos de ARN almacenados a -80 °C de cepas pre-PZ	48
Amplificación del gen de la proteína N de las cepas pre-PZ propagadas en cultivo celular	50
Amplificación del gen de la proteína N de VRS de cepas post –PZ para verificar la positividad para VRS de las muestras.....	51
Amplificación del gen de la β -globina para testear la calidad de las extracciones de ARN a partir de los aspirados nasofaríngeos correspondientes a las cepas post – PZ	52
Amplificación por RT-PCR del gen de la proteína F de VRS para cepas pre y post PZ.....	53
Secuenciación del gen de la proteína F de cepas de VRS pre-PZ y análisis informático de secuencias para la búsqueda de mutaciones de posible relevancia para la resistencia a PZ	54
Inmunofluorescencia a partir de aspirados nasofaríngeos de niños tratados con PZ como profiláctico para verificar la negatividad para VRS de las muestras clínicas..	55
Amplificación de la proteína del hexón de Adenovirus para testear una posible coinfección VRS- Adenovirus.....	57
7. DISCUSIÓN.....	59
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	66
9. REFERENCIAS	69

1. RESUMEN

Las infecciones respiratorias agudas del tracto respiratorio bajo representan un problema significativo de salud a nivel mundial, constituyendo la principal causa de consulta e internación durante los meses de invierno. El virus respiratorio sincitial (VRS) es el principal agente de infecciones respiratorias agudas en lactantes y niños pequeños, desencadenando bronquiolitis o neumonía. Debido a la ausencia de una vacuna efectiva para VRS el tratamiento de estas infecciones se basa en el suministro de Palivizumab. El Palivizumab (PZ) es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra la proteína F de VRS. Existen actualmente escasos trabajos de vigilancia en la aparición de virus resistentes a PZ. Dada la importante tasa mutacional de este virus es altamente esperable la generación de resistencia.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el gen de la proteína F de cepas de VRS de una colección de cepas uruguayas correspondientes a años previos al uso de PZ y establecer una comparación con muestras clínicas extraídas de niños tratados con PZ como profilaxis para infecciones con VRS en busca de posibles mutaciones responsables de la resistencia a PZ.

En algunos trabajos se han aislado mutantes de escape resistente a PZ, en la mayoría de los casos estos mutantes fueron aislados *in vitro*, sin embargo recientemente se han aislado mutantes resistentes a PZ a partir de muestras clínicas.

Las cepa pre-PZ correspondiente al año 1996, reveló una mutación en la posición 814 del gen de la proteína F, está mutación fue reportada como mutación de resistencia al PZ y se aisló a partir de una muestra clínica. En cuanto a las demás posiciones del gen en las cuales se reportaron mutaciones de resistencia, no se encontraron cambios en las cepas estudiadas.

Las cepas post-PZ mostraron ser negativas para VRS asimismo una de estas muestras mostró ser positiva para Adenovirus (AdV).

2. INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas del tracto respiratorio bajo representan un problema significativo de salud a nivel mundial, constituyendo la principal causa de consulta e internación. En ocasiones pueden tener evoluciones graves provocando la muerte o severas lesiones broncopulmonares ^[37].

Los niños menores de 5 años son la población mayoritariamente afectada por estas infecciones, según la OMS aproximadamente el 20% de las muertes en niños menores de 5 años es debida a infecciones agudas del tracto respiratorio bajo.

Dentro de la población pediátrica existen grupos de mayor riesgo como los lactantes pequeños menores de seis semanas, prematuros, niños con enfermedades pulmonares crónicas, trastornos cardiovasculares o inmunosupresión ^[32].

Las causas etiológicas de estas infecciones son tanto bacterianas (*Streptococcus pneumoniae* o *Haemophilus influenzae*) como virales, sin embargo las infecciones respiratorias de causa viral representan el 70-90% ^[38].

El VRS es el principal agente de infecciones respiratorias agudas en lactantes y niños pequeños, desencadenando bronquiolitis o neumonía. En el 30% de los casos del 1 al 3% de los niños requiere internación y aproximadamente el 0.3% fallece. Se estima que el 95% de los niños ha sido infectado por VRS a la edad de dos años ^[2].

Uruguay no escapa a estas estadísticas, en 1999 la tasa de mortalidad en Uruguay por infección respiratoria constituyó un 0.5 de cada mil nacidos vivos, representando la séptima causa de mortalidad infantil y la primera causa excluyendo a los menores de 28 días de vida ^[37].

Las reinfecciones por VRS son comunes en niños mayores, adultos o ancianos, debido a que a diferencia de otras infecciones virales, la infección con VRS no confiere inmunidad protectora duradera ^[44].

La ausencia de una vacuna efectiva contra VRS hace del control de estas infecciones un desafío importante. Se cuenta con tratamientos de inmunización pasiva mediante preparaciones de anticuerpos, de los cuales el más conocido es PZ.

El PZ es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra la proteína F, una de las proteínas transmembrana de VRS ^[32].

El uso de PZ como profilaxis para infecciones del tracto respiratorio bajo data ya de varios años, en Uruguay el Ministerio de Salud Pública (ordenanza ministerial N° 775 del 31 de octubre de 2007) aprobó modificaciones al "Formulario Terapéutico de Medicamentos" con el PZ incluido en la lista de estos fármacos. En esta ordenanza se definió un protocolo de uso de PZ para la prevención de infecciones respiratorias bajas causadas por VRS en niños con alto riesgo de vida.

Hasta el momento no existían estudios basados en el aislamiento in vivo de mutantes resistentes a PZ. Recientemente se ha publicado un trabajo en el cual se aísla in vivo VRS con mutaciones en la proteína F que conllevan a la resistencia al PZ ^[1]. Considerando la alta tasa mutacional de VRS, es de esperarse la existencia de estos mutantes. Existen también trabajos basados en la selección in vitro de VRS resistentes a PZ, o ensayos in vivo en ratones ^{[44] [43]}. Aislamientos in vivo de estos mutantes de escape y de su circulación en la población infectada son de gran importancia.

2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS INFECCIONES POR VRS

El VRS se multiplica en las membranas mucosas de la nariz y garganta, en los grupos de riesgo (niños menores de 18 meses, adultos inmunocomprometidos o ancianos) puede involucrar la tráquea, los bronquios y bronquiolos así como los alvéolos. El período de incubación es de 4 a 5 días, es un virus contagioso transmitido principalmente a través de fomites ^[7].

Las infecciones respiratorias severas por VRS son comunes en pacientes menores de 9 meses. La bronquiolitis puede darse en niños mayores, pero más allá de los 18 meses se da usualmente en niños con enfermedades respiratorias de base como asma.

Las vías aéreas de los niños pequeños son muy angostas y se obstruyen con facilidad tras la inflamación, edema y la acumulación de células necróticas, todos eventos que se dan durante la infección por VRS, de ahí su gravedad en niños. Asimismo existe una base inmunológica para explicar la vulnerabilidad de esta población que cuenta con un sistema inmune inmaduro ^[7].

Los niños inmunocompetentes que se enfrentan al VRS por primera vez entre la edad de 6 a 9 meses sufren generalmente síntomas en el tracto respiratorio alto. En algunos casos (25% al 40% de estas infecciones) también se ve involucrado el tracto respiratorio por debajo de la laringe.

Bronquiolitis y neumonía son las manifestaciones principales de infecciones en el tracto respiratorio bajo.

Los exámenes médicos muestran usualmente taquipnea moderada, ronquidos, estertores, y dificultades en general para respirar. Si la infección no es severa los síntomas generalmente no progresan más allá de los mencionados y la recuperación se da luego de una infección de 7 a 12 días ^[15].

En caso de infecciones más agudas, progresa la tos y los ronquidos, el niño resulta disneico con taquipnea severa inclusive en ausencia de cianosis visible, si la enfermedad avanza la hipoxia se extrema llevando a la falla respiratoria ^[16].

En el caso de adultos mayores con enfermedades de base las infecciones por VRS pueden desencadenar neumonía severa necesitando de internación hospitalaria ^[7].

En personas inmunocomprometidas la infección comienza usualmente en el tracto respiratorio alto, desarrollándose por 5 o 6 días con síntomas similares a los de los huéspedes normales, existe una importante incidencia de infección en el tracto respiratorio bajo, y la infección progresa a neumonía en el 50% de los casos.

La tasa de mortalidad en adultos inmunosuprimidos debido a leucemia o trasplante de médula ósea llega a valores tan altos como el 80 % al 100% ^[7].

El VRS es un virus neumotrópico, no obstante no se limita únicamente a este sitio. En casos fatales de infecciones severas en inmunocomprometidos el virus puede esparcirse a otros órganos incluyendo riñones, hígado y miocardio ^[7].

2.2 VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL

El VRS pertenece a la familia *Paramyxoviridae* dentro del orden *Mononegavirales*. Esta familia incluye algunos de los virus más comunes y ubicuos causantes de enfermedades animales (Newcastle y Rinderpest) y humanas (virus causantes de paperas, sarampión y parainfluenza) ^[23].

Los virus pertenecientes a esta familia son virus envueltos, con un genoma de ARN simple hebra y polaridad negativa.

La familia *Paramyxoviridae* ha sido dividida en base a criterios morfológicos, de organización del genoma, actividad biológica de proteínas y relación de secuencias de las proteínas codificadas en dos subfamilias: *Paramyxovirinae* y *Pneumovirinae*.

Paramyxovirinae incluye tres géneros, Respirivirus, Rubulavirus y Morbillivirus mientras que *Pneumovirinae* contiene a los géneros Pneumovirus y Metapneumovirus.

El VRS fue primeramente aislado en 1956 de un chimpancé de laboratorio durante el desarrollo de una enfermedad similar a un resfriado típico. Poco después el mismo virus fue recuperado de niños con enfermedades respiratorias, estudios serológicos posteriores demostraron que esta infección era común entre los niños ^[7].

Las sucesivas detecciones de VRS como causa etiológica de enfermedades respiratorias convirtió rápidamente a VRS en el agente viral más importante causante de infecciones del tracto respiratorio en la población pediátrica mundial. Posteriormente fue también asociado a infecciones en ancianos, pacientes con transplantes de médula ósea o adultos inmunocomprometidos

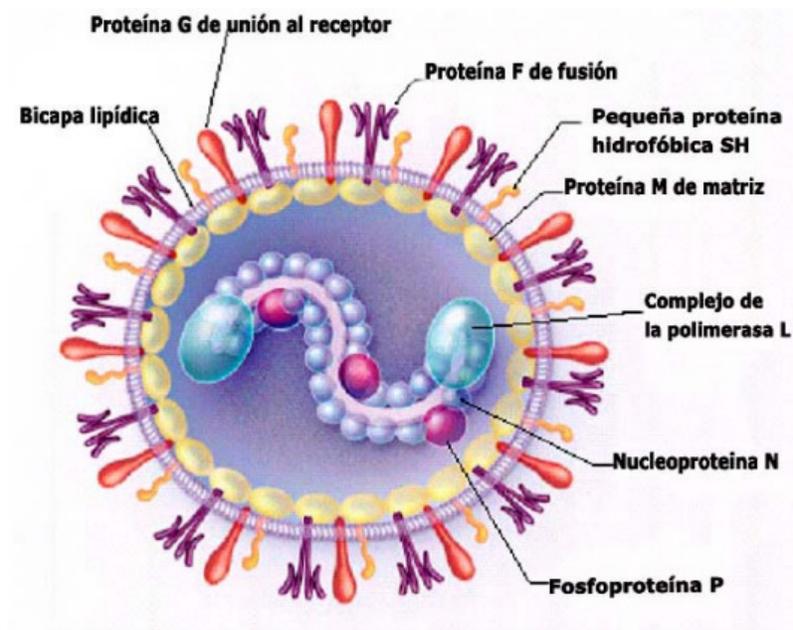


Figura 1: Esquema de la estructura del Virus Respiratorio Sincitial indicando las proteínas virales. Tomado de Hall *et al.* [28]

El VRS posee un genoma de ARN monohebra polaridad negativa, no segmentado que es el molde para la transcripción de 11 ARNm poliadenilados así como también para la replicación del genoma viral.

En general el genoma de los *Paramyxovirus* tiene un tamaño de 15 a 19 kb y consta de seis a diez genes en tándem de acuerdo a los diferentes miembros de la familia [24].

En el caso de VRS, existen proteínas fundamentales como es el caso de la proteína N de nucleocápside, la fosfoproteína P, la proteína L, la proteína M de matriz, la pequeña proteína hidrofóbica y la glicoproteína de fusión F, las cuales también están presentes en otros miembros de la familia. A su vez el genoma de RSV presenta genes exclusivos

codificantes de proteínas accesorias como las proteínas no estructurales 1C (NS1) y 1B (NS2) ^[9].

El genoma se encuentra asociado a proteínas formando una nucleocápside helicoidal proteica resistente a la acción de ARNasas. El virión está recubierto por una envuelta lipídica de origen celular adquirida al emerger de la célula infectada.

Entre la envoltura lipídica y la nucleocápside proteica se encuentra la proteína viral M, proteína de matriz, fundamental para el ensamblaje y la arquitectura del virión.

Anclado a esta envoltura lipídica se encuentran tres glicoproteínas de superficie, la proteína de unión al receptor G, la proteína de fusión F y la pequeña proteína hidrofóbica SH. Estas glicoproteínas se organizan sobre la superficie viral en forma de espículas. (Figura 1)

El VRS tiene cuatro proteínas de nucleocápside empaquetadas en el virión. La proteína mayor de nucleocápside N, la fosfoproteína P, el factor de antiterminación M2-1 y la subunidad mayor de la polimerasa L ^[7].

2.2.1 GENOMA VIRAL Y TRANSCRIPCIÓN

En el genoma de VRS los genes tienen un orden establecido:

3' NS1 – NS2 – N – P – M – SH – G – F – M2 – L – 5'

El ARN genómico contiene en 3' una región extracistrónica de 44 nucleótidos conocida como líder y una región 5' extracistrónica conocida como trailer que flanquean la serie de genes que componen al genoma. Estas regiones son esenciales para el control de la transcripción y replicación ^[7]. (Figura 2)

Las denominadas regiones intergénicas que flanquean los distintos genes varían desde 1-56 nucleótidos. Estas regiones carecen de motivos consenso o estructura secundaria y no están conservadas entre cepas ^[9].

En cuanto a los dos últimos genes M2 y L, estos están solapados en 68 nucleótidos, de modo que la señal de inicio del gen L está localizada dentro del gen M2, esto hace que durante la transcripción la región solapada se transcriba dos veces ^[12].

Debido a la naturaleza del genoma viral, la replicación intracelular de los Paramyxovirus requiere de una polimerasa particular, esta es una ARN polimerasa dependiente de

ARN. La polimerasa esta formada por un homotetrámero de proteína P y un monómero de la proteína L.

Esta polimerasa se encarga de la transcripción del genoma encapsidado para generar ARNm con un residuo de 7 metil guanina (CAP) en 5' y con colas poliadeniladas en 3'.

La polimerasa viral comienza la síntesis de los mensajeros en el extremo 3' del genoma y transcribe los genes de manera secuencial por la terminación y reinicio de cada uno de estos genes en las regiones intergénicas. Estas regiones contienen una secuencia de terminación del gen en la cual ocurre la poliadenilación del ARNm sintetizado y su posterior liberación, así como también una corta región no transcripta y la secuencia de inicio del siguiente gen que especifica la síntesis de un nuevo mensajero.

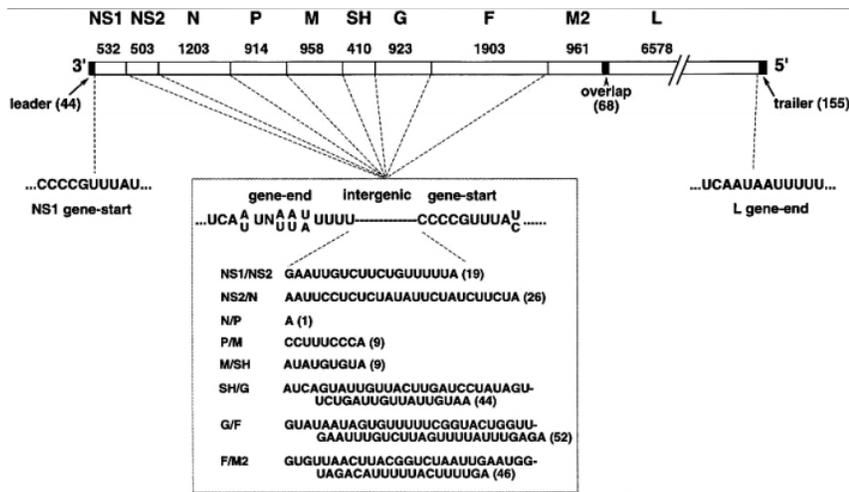


Figura 2: Esquema del genoma de VRS, con la ubicación de cada uno de los genes en tándem. Se indican las regiones intergénicas así como las regiones leader y trailer y el solapamiento en los genes M2 Y L. Tomado de: Fields Virology. 4^{ta} Ed. 2001.

En general la transcripción da lugar a ARNm monocistrónicos, con un único marco abierto de lectura codificando para una única proteína excepto el ARNm transcripto a

partir del gen M2 conteniendo dos marcos abiertos de lectura solapados para las proteínas M2-1 y M2-2 [23].

La transcripción también genera ARNm en los cuales se da la ineficiente terminación en las regiones intergénicas representando aproximadamente el 10% del ARNm total y funcionando como un mecanismo de regulación génica.

En este proceso de síntesis de ARNm de manera secuencial, la ARN polimerasa ocasionalmente falla en el reinicio de la síntesis de mensajeros corriente abajo, generando una disminución en la tasa de transcripción de genes que se ubican hacia el extremo 5' del genoma viral. De este modo se genera un gradiente en la síntesis de ARNm y por tanto de proteínas virales, siendo este el principal mecanismo de control génico para la síntesis proteica [23].

2.2.2 PROTEÍNAS VIRALES

Se han identificado 10 genes y 11 proteínas codificadas para todos los marcos abiertos de lectura significativos [7].

Proteínas no estructurales NS1 y NS2

Las proteínas NS1 y NS2 son detectadas en bajas cantidades en precipitaciones de viriones purificados y son por lo tanto consideradas no estructurales.

Estudios con virus recombinantes con deleciones en las proteínas NS1 y/o NS2 generaron una disminución en la infectividad con efectos aditivos, evidenciando el rol de estas proteínas en promover el crecimiento sin ser esenciales para el mismo [7].

Virus con deleciones en los genes de NS1 o NS2 demostraron un retraso en la acumulación de ARN y proteínas virales, pero su rol como parte del ciclo replicativo no está definido.

Las proteínas accesorias de algunos *paramyxovirus* demostraron ser factores de virulencia in vivo y funcionar como antagonistas para el sistema de interferón. Del mismo modo NS1 y NS2 podrían cumplir un rol similar interactuando con la inmunidad del huésped de algún modo. Existen de hecho trabajos demostrando un rol de NS1 y NS2 suprimiendo la síntesis de IFN así como también sus funciones sin conocer aún sus blancos exactos en esta vía [3].

Proteína de matriz M

La proteína M de VRS es una proteína no glicosilada interna al virión, es más pequeña que en otros paramyxovirus con un total de 256 aminoácidos y carece de regiones similares a otras proteínas de matriz dentro de la familia viral. Comparte con otras proteínas de matriz la presencia de un dominio hidrofóbico en la mitad C- terminal de la molécula, el cual se cree media la interacción con la envoltura viral.

La proteína M dentro del orden mononegavirales tiene dos funciones, mantener la nucleocápside transcripcionalmente inactiva previo a que se ensamblen nuevos viriones así como mediar la asociación de la nucleocápside con la envoltura viral naciente. Estudios demostraron que la no expresión de la proteína M no inhibe la replicación o transcripción del ARN, sin embargo sí es fundamental para la formación de partículas virales^[41].

Estudios sobre la estructura de la proteína M demostraron la presencia de dos dominios compactos, conectados por una región de unión no estructurada. Se encontró también una extensa región que genera una superficie con carga positiva que potencialmente puede interactuar con componentes virales de carga negativa como la nucleocápside. Esta región se complementa por regiones de alta hidrofobicidad que pueden interactuar con la envoltura viral^[31].

Factor regulador M2-2

El ARNm del gen M2 contiene dos marcos abiertos de lectura, el M2-1 5' proximal y el M2-2 corriente abajo que se solapa levemente con el primero. Estos dos marcos abiertos de lectura codifican dos proteínas diferentes, la proteína M2-1 (factor de antiterminación) y la proteína M2-2. La traducción a partir del segundo marco abierto de lectura se da a través de un mecanismo de terminación y reinicio, aquellos ribosomas que completan la traducción de M2-1 pueden reiniciar la síntesis de M2-2 en uno de los tres codones AUG localizados corriente arriba del codón stop de M2-1.

La abundancia de la proteína M2-2 en células infectadas es baja pero aumenta durante la infección.

Debido a que estudios preliminares con virus en los cuales se deleta el gen M2-2 demostraron no generar variaciones en el ciclo replicativo viral se creía que este es un gen no esencial^[7].

Trabajos más recientes en los cuales se deleta el marco abierto de lectura para M2-2 demuestran que la tasa de síntesis de ARN genómico o antígenómico se reduce.

También se ha visto que si es deletada la proteína M2-2 la acumulación intracelular de ARN se reduce 3 a 4 veces o inclusive más en el caso de ARN genómico y aumenta 2 a

4 veces para ARNm. Estos resultados sugieren que M2-2 funciona como un “switch” que permite el pasaje de la transcripción a la replicación del ARN permitiendo un nivel alto de ARNm seguido por un cambio a la síntesis de ARN genómico para el ensamblaje viral ^[19] ^[5].

Proteínas de nucleocápside y polimerasa viral: N, P, M2-1 y L

Las proteínas N, P y L son copurificadas con las nucleocápsides y se encuentran presentes en inclusiones citoplasmáticas densas dentro de las células infectadas ^[7] ^[22].

La proteína N es más pequeña que sus contrapartes en otros Paramyxovirus, con un total de 391 aminoácidos. Tiene como función fundamental unirse estrechamente al ARN genómico o antígenómico viral para formar una nucleocápside resistente a la degradación por ARNasas.

Además de proteger el genoma viral, la proteína N tiene el rol fundamental de mediar la interacción entre el ARN genómico y la ARN polimerasa viral compuesta por la fosfoproteína P, la proteína L y la proteína M2-1. El extremo N- terminal es altamente responsable del ensamblaje de la nucleocápside mientras que el extremo C- terminal contiene elementos necesarios para la interacción con la polimerasa y la proteína de matriz.

Se tienen datos sobre la estructura de la proteína N de VRS, en los cuales se identificó la presencia de estructuras de anillos N –ARN característicos de la estructura de proteínas N de otros Paramyxovirus ^[29].

La proteína P esta altamente fosforilada, es más pequeña que en otros Paramyxovirus pero comparte la función de chaperonina para la proteína N soluble. Se ha demostrado que la sola expresión de la proteína N en ausencia de proteína P da lugar a la formación de agregados de proteína N y se inactiva la encapsidación, mientras que la coexpresión de N y P sí da lugar a una correcta encapsidación ^[7].

La proteína P expresada en bacterias demostró ser inactiva para la transcripción en un sistema *in vitro*, a menos que sea fosforilada, esto evidencia un rol de cofactor de la polimerasa por parte de la proteína P que requiere de su previa fosforilación. ^[4]

La remoción enzimática de el grupo fosfato en la proteína P mostró la producción de una serie de pequeños oligómeros transcritos a partir del extremo 3´ del genoma,

sugiriendo que una de las funciones de la proteína P fosforilada es convertir a la polimerasa que inicia la transcripción de un nuevo gen en un complejo polimerasa ARN estable ^[11].

La proteína L es muy similar en tamaño a sus contrapartes en *Rhabdovirus* y paramyxovirus, contiene seis segmentos discretos con residuos altamente conservados que representan la actividad polimerasa ^[7].

La proteína M2-1 es codificada por el marco abierto de lectura 5' proximal del ARNm de M2. Inicialmente se creía que M2-1 funcionaba como una segunda proteína de matriz, sin embargo hoy se conoce su rol fundamental como factor de antiterminación de la transcripción esencial para la viabilidad del virus. Las proteínas N, L y P son suficientes para dirigir la transcripción pero la procesividad completa de la polimerasa requiere la proteína M2-1. ^[8] En ausencia de M2-1 solo se da la transcripción de los genes NS1 y NS2, cuando se da la coexpresión de M2-1, la expresión de NS1 y NS2 aumenta y se logra la transcripción de genes corriente abajo, demostrando que M2-1 permite la continuidad de la polimerasa a través de las regiones intergénicas.

La proteína M2-1 puede unirse a N y se localiza intracelularmente en las inclusiones citoplasmáticas antes mencionadas con las proteínas N y P.

En cuanto a la estructura de M2-1 se sabe que contiene un dedo de zinc cisteína-histidina cercano al extremo N-terminal esencial para la función de antiterminación.

Estudios de mutaciones en distintas regiones de la estructura de dedo de zinc revelaron la importancia de este motivo de unión a ácidos nucleicos para el rol de antiterminador de M2-1 ^[17].

Pequeña proteína hidrofóbica SH

SH es una proteína integral de membrana, con la región C-terminal expuesta extracelularmente.

La función de la proteína SH permanece desconocida. Trabajos demuestran que VRS recombinantes donde el gen de la proteína SH fue deletado retienen viabilidad en cultivos celulares, con la formación de placas de lisis más grandes y una sutil ventaja de crecimiento en algunas líneas celulares, debidas tanto al menor tamaño del genoma como al menor número de genes a transcribir.

La delección de la proteína SH no genera dificultades para la formación de sincicios *in vitro*, mientras que *in vivo* se observa una atenuación en el tracto respiratorio bajo de ratones [6].

Asimismo trabajos con cultivos celulares con partículas similares a virus y plásmidos expresando las proteínas virales demostraron que plásmidos expresando las proteínas G, F y SH generaban la mayor eficiencia en la formación de sincicios, sugiriendo que SH potencia la función de una o ambas glicoproteínas [18].

La expresión de SH en bacterias demostró un aumento a la permeabilidad para moléculas de bajo peso molecular, esto sugiere que la proteína SH podría cumplir un rol análogo al de la proteína M2 de influenza, formando un canal iónico. De todos modos no se conoce el rol que podría jugar este posible canal iónico en el ciclo replicativo del VRS [35].

Proteína de unión al receptor G

La glicoproteína G fue identificada como la proteína mayor de unión a receptores celulares debido a que anticuerpos específicos contra esta proteína bloqueaban la unión de los viriones a células HeLa, mientras que anticuerpos dirigidos contra F bloqueaban la fusión pero no la unión al receptor [27].

La proteína G de VRS tiene 289 o 299 aminoácidos de longitud, dependiendo de la cepa, es una proteína altamente glicosilada no globular con ectodominios similares a mucinas. Es una proteína transmembrana tipo II con una única región hidrofóbica cercana al extremo N- terminal que sirve como péptido señal de anclaje a la membrana, dejando los dos tercios del extremo C- terminal orientados externamente. [7]

Existen diferencias en el grado de glicosilación de la proteína G, asociadas a diferencias en la antigenicidad, permitiendo el enmascaramiento del virus de la respuesta inmune.

La proteína G presenta una altísima variabilidad antigénica y secuencial entre cepas, que radica fundamentalmente en el ectodominio. Existe sin embargo una región altamente conservada, localizada en la región central del ectodominio, región rica en Cisteína y se cree candidato para la actividad de unión a receptores celulares.

Se tienen datos de esta estructura de la región central conservada de la proteína G de VRS. En este trabajo se estudió la estructura de la región central rica en Cys de la proteína G para estudiar la antigenicidad de esta proteína con el fin de desarrollar una vacuna contra VRS [40].

La proteína G también es sintetizada en su forma secretada que surge del inicio de la traducción en el segundo codón AUG en el mismo marco abierto de lectura. Esto genera una proteína aparentemente truncada que es degradada proteolíticamente. La

proteína G secretada compone el 80% de la proteína G liberada por células infectadas 24 horas post infección.

La utilidad de esta forma secretada de proteína G no es del todo clara, aunque se cree que funcione como un mecanismo de defensa viral con respecto al sistema inmune del huésped, atrapando los anticuerpos neutralizantes producidos contra esta proteína, sin impedimentos para el virión y su diseminación ^[7].

Proteína de fusión F

La proteína F dirige la penetración viral mediante la fusión entre la envoltura viral y la membrana plasmática celular. Permite también la liberación de la nucleocápside en el citoplasma para que luego se inicie el ciclo replicativo del virus.

Más tardíamente en la infección la proteína se expresa en la superficie celular mediando la unión entre células vecinas, generando sincicios. La formación de sincicios es de hecho el efecto citopático característico asociado a las infecciones por VRS y es probablemente un mecanismo de diseminación viral ^[7].

La proteína de fusión fue identificada mediante la utilización de anticuerpos monoclonales específicos. La presencia de estos anticuerpos neutralizaba el virus impidiendo la fusión y formación de sincicios en cultivos celulares. La utilización de anticuerpos monoclonales permitió también conocer la localización de la proteína en cultivos celulares, mediante el uso de inmunofluorescencia indirecta ^[42].

Esta proteína es sintetizada como un precursor F_0 que es procesado proteolíticamente por proteasas celulares a nivel del trans- Golgi para dar lugar a un heterodímero unido por puentes disulfuro $F_1 - F_2$. El sitio de corte del precursor fusogénicamente inactivo F_0 consiste de seis residuos de Arg y Lys en tándem conteniendo el motivo de corte para la proteasa celular furina. Este procesamiento proteolítico permite la liberación del péptido de fusión hidrofóbico en el extremo N- terminal de la subunidad F_1 . La secuencia del péptido de fusión no es muy conservada, sugiriendo que su función no depende de la secuencia. Si bien la proteína F por sí sola puede mediar no solamente el ingreso del virus a la célula, sino también la formación de sincicios, se ha demostrado que la coexpresión de la proteína F, G y SH aumentan la formación de sincicios ^[23].

No se ha obtenido la estructura completa de la proteína F aún, sí están disponibles estructuras de parte esta proteína asociada a distintas moléculas, por ejemplo a Motavizumab (anticuerpo monoclonal dirigido contra proteína F) ^[30].

Otros estudios de estructura de la proteína F de VRS se realizaron trabajando con moléculas inhibitoras de la fusión [36].

Se cuenta sin embargo de la estructura del core proteico obtenido por la técnica de cristalografía de rayos X (Figura 3) Este trabajo demostró la presencia de una estructura de horquilla que permite que la envoltura viral y la membrana celular se encuentren en aposición lo suficientemente cercana para facilitar la fusión y posterior liberación del virión. Se encontró además una similitud estructural importante entre el core de la proteína F de VRS con otras proteínas de fusión virales como lo es la proteína gp41 de HIV [45].

La función vital de la proteína F para la infección y replicación viral, el hecho de que sea una proteína muy conservada así como su exposición en la estructura del virión hace de esta una de las glicoproteínas más inmunógenicas, sobre la cual se dirige gran parte de la inmunidad del huésped [34].

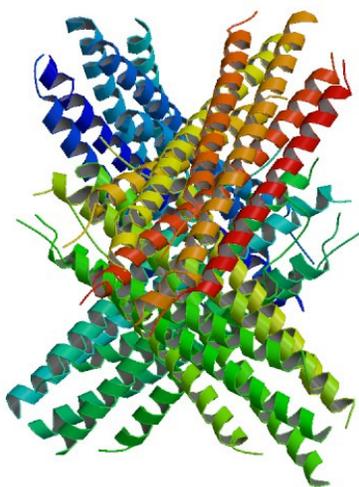


Figura 3: Estructura tridimensional del core proteico de la proteína F de VRS obtenida mediante cristalografía de rayos X. Obtenida de: Zhao *et al.*(2000)

2.2.3 CICLO REPLICATIVO

El ciclo replicativo se inicia con la unión de la proteína G a receptores celulares, esta proteína puede unirse a los denominados glucosaminoglicanos (GAGs), polisacáridos

largos no ramificados componentes de la matriz extracelular y ampliamente representados en las células del epitelio respiratorio ^[13].

El VRS ingresa a la célula por la fusión de la membrana plasmática celular y la envoltura viral, fusión mediada por la proteína de superficie viral F ^[26].

Recientemente se demostró la capacidad de la proteína F de unirse a la proteína celular RhoA. Esta proteína puede asociarse a la cara interna de la membrana celular, de modo que se cree que la interacción con la proteína F puede formar parte de la penetración viral ^[7].

Todos los eventos del ciclo replicativo posterior a la unión del virus en la superficie celular se dan a nivel de citoplasma, sin involucrar el núcleo celular.

La fusión de la envoltura viral con la membrana celular tiene como resultado la liberación de la nucleocápside en el citoplasma celular. A continuación se comienza a dar la síntesis de proteínas virales. Tras la síntesis y acumulación de cantidades suficientes de proteínas virales como para asegurar la correcta formación de nuevos viriones comienza la replicación del genoma viral. En este caso la polimerasa viral genera un ARNm completo de polaridad positiva que se denomina antígenoma, que será utilizado como molde para la síntesis del genoma viral completo de polaridad negativa. Como se mencionó anteriormente el factor regulatorio M2-2 cumple un rol fundamental como interruptor que permite que se de el cambio en la síntesis de mensajeros para que se lleve a cabo la replicación del genoma ^[23].

Posteriormente comienzan a ensamblarse los nuevos viriones, durante el ensamblaje del virión quedan contenidas en la nucleocápside naciente las proteínas de nucleocápside antes mencionadas (N, P y L).

La proteína de matriz se asocia a través de su región básica a la nucleocápside y mediante la región hidrofóbica a la región de la membrana celular que conformará la envoltura viral.

Las glicoproteínas de superficie tras su síntesis son dirigidas hacia la región de la membrana celular que formará la envoltura viral, para lograr el correcto destino de estas proteínas se hace uso del mismo sistema de transporte celular que localiza las proteínas celulares de membrana ^[7].

Resultados obtenidos por microscopía revelaron que la maduración de los viriones de VRS se da en regiones circunscriptas en la superficie celular, los cuales reflejan agrupamientos de componentes virales o la dependencia de estructuras subcelulares localizadas para el posterior brotamiento ^[22].

La salida del virus para su diseminación se da por brotamiento. La disrupción de los filamentos de actina reduce drásticamente la producción de viriones evidenciando un rol del citoesqueleto para el ensamblaje y brotamiento ^[7].

2.3 SUBGRUPOS ANTIGÉNICOS Y DIVERSIDAD

El VRS está representado por dos subgrupos antigénicos A y B. El dimorfismo antigénico entre las cepas de VRS fue reconocido inicialmente por una diferencia de tres a cuatro veces en la neutralización de las cepas A2 y 18537 respectivamente ^[7].

Análisis subsecuentes de reactividad en cepas en los pasados treinta años usando anticuerpos monoclonales murinos producidos contra las diferentes proteínas de VRS indicaron que los aislamientos se asemejan ya sea a la cepa A2 o a la 18537 las cuales han sido tomadas como referencia de los subgrupos antigénicos.

Ambos subgrupos se relacionan antigénicamente en un 25% en general, la proteína F tiene un 50% de similitud y la proteína G un 1% a 7%. La heterogeneidad antigénica es seguramente una de las causas que explican la habilidad de VRS para las reinfecciones.

Las cepas pertenecientes al subgrupo A están generalmente relacionadas con enfermedades más severas pero en algunos estudios las cepas del grupo B resultan más virulentas ^[7].

Las secuencias completas de los ARN genómicos de las cepas A2 y B1 de los subgrupos A y B tienen un 81% de identidad nucleotídica. Las señales de regulación como las señales de inicio y de finalización tienden a estar altamente conservadas con un 90-100% de identidad nucleotídica, mientras que las regiones intergénicas y las regiones de los genes que son no codificantes son relativamente más divergentes con un 32-50% de identidad nucleotídica.

Las proteínas virales varían considerablemente en cuanto a divergencia secuencial entre los subgrupos. La divergencia es mayor en los ectodominios de las proteínas SH y G, las cuales retienen solamente el 50% y 44% de identidad entre los subgrupos ^[21].

La naturaleza de las diferencias en secuencias indica que los dos subgrupos representan dos líneas de evolución divergentes, no son variantes que difieren solamente en algunos sitios antigénicos.

Dentro del mismo subgrupo, el porcentaje de identidad de aminoácidos y nucleótidos es considerable, igualmente se sigue el mismo patrón de diversidad en regiones dadas de las proteínas. Dentro del mismo subgrupo por ejemplo la secuencia aminoacídica para la proteína G puede diferir en un 20% entre cepas. Estos distintos linajes dentro de cada subgrupo han sido identificados y se mostró que co circulan durante las epidemias ^[7].

En cuanto a la variabilidad de la proteína F, un análisis de 18 cepas del subgrupo A y 5 cepas del subgrupo B tomadas de diversas regiones geográficas analizadas con anticuerpos dirigidos contra la proteína F permitió definir 4 sitios antigénicos con un total de 16 epitopes de neutralización. Siete de estas epitopes demostraron estar conservadas en todas menos una de estas cepas.

Los estudios demostraron que la divergencia antigénica en las regiones antigénicas de la proteína F no ha sido extensiva o rápida. No se han acumulado mutaciones que permitan el escape de la respuesta inmune. De modo que si la proteína F sufre deriva antigénica lo hace en una escala de tiempo mucho menor que por ejemplo para el caso de influenza A ^[7].

Se han realizado estudios similares para el gen de la proteína G. El ectodominio de la proteína G es inusual porque un alto porcentaje (51-58%) de las diferencias en la secuencia codificante en cepas del mismo o diferente subgrupo resulta en cambios aminoacídicos comparado con valores del 10-20% para otras proteínas virales.

Las mutaciones no silenciosas se agrupan en las regiones variables del ectodominio de la proteína G.

La proteína G es uno de los mayores antígenos protectivos, su diversidad aminoacídica va de la mano con diversidad antigénica y la diversidad genética se da fundamentalmente en el ectodominio, lo que demuestra que la presión selectiva inmune opera para generar estos cambios ^[7].

Sería esperable que esta misma presión selectiva se generara para con la proteína F, el otro antígeno protector primordial. No obstante la comparación de la proteína F entre cepas pertenecientes a los dos subgrupos demostró un 91% de similitud antigénica.

Esto evidencia que el proceso de plegamiento de la proteína F y su función compleja de fusión de membranas es muy sensible a las sustituciones aminoacídicas, explicando porque esta proteína es tan altamente conservada ^[20].

En los últimos años los dos subgrupos se han mantenido antigénicamente estables y han co circulado en las epidemias anuales, con un predominio general del subgrupo A ^[7].

2.4 EVOLUCIÓN VIRAL: CUASIESPECIES

Pese al pequeño de número de genes con los que constan los distintos virus, las poblaciones virales demuestran una gran diversidad. Es esta diversidad manifestada en

la gran colección de permutaciones genómicas que está presente en cualquier población viral provee al virus de oportunidades constantes para la supervivencia.

Estas fuentes de diversidad son los mecanismos de: mutación, recombinación, reordenamiento y selección.

En la mayoría de las infecciones miles de viriones se producen como resultado de un único ciclo replicativo, debido a errores que se acumulan tras la replicación del genoma, cada nuevo genoma puede diferir con el genoma de los demás viriones.

En el caso de virus con genomas de ARN como lo es VRS, la síntesis de ARN se da con una fidelidad considerablemente menor que en caso de genomas ADN. El promedio de errores generados durante la replicación de un genoma ARN es de un error cada 10^4 o 10^5 nucleótidos adicionados, más de un millón de veces más grande que la tasa de error para la síntesis de ADN. Esto significa que para un genoma de 10Kb se cometería al menos una mutación en cada genoma replicado ^[14] ^[25].

De este modo nace la definición de cuasiespecies, donde el genoma viral no es único y se define como un equilibrio dinámico de mutantes con una alta tasa de emergencia sujetos a una fuerte presión de selección. El genoma viral no puede describirse como una única estructura definida sino como un promedio de un vasto número de secuencias individuales.

La existencia de cuasiespecies ha sido ampliamente validada para el caso de muchas poblaciones virales. Sabemos que dentro de una población viral como es el caso de VRS existen distribuciones dinámicas de replicones no idénticos pero relacionados.

De este modo para una población dada de un virus con genoma ARN, las secuencias genómicas que componen la cuasiespecie se agrupan alrededor de una secuencia consenso promedio, pero virtualmente cada genoma es diferente de los demás.

Una de las variantes de la cuasiespecie puede tener una mutación que lo beneficie en un evento de selección y se convertirá en la variante preponderante. Las mutaciones que se acumulan tras cada ronda de replicación pueden conferir beneficios y aumentar el fitness de esa cuasiespecie, haciendo que la mutación se fije y que cambie la dinámica de la población viral convirtiéndose en la nueva cuasiespecie dominante ^[14].

La existencia de cuasiespecies es fundamental para el desarrollo de terapias antivirales. El conocer la existencia de estas distintas variables genómicas en constante dinamismo permite entender que la presión selectiva generada por un tratamiento antiviral puede repercutir sobre alguna de las variantes, pero a la vez puede seleccionar una variante que contenga una mutación de resistencia.

De esta manera se genera el denominado cuello de botella, que tiene como resultado modificar la dinámica de la población y generar una nueva cuasiespecie dominante que deberá ser atacada con un nuevo método antiviral.

En los últimos años se han desarrollado terapias antivirales combinadas, para poder abarcar un amplio número de variantes genómicas, intentando que las nuevas mutaciones generadas por la presión selectiva induzcan a la población viral a la denominada “catástrofe de error”.

Dada las altas tasas de mutación de los virus ARN, es importante considerar la relación que existe entre la diversidad genética y la adaptabilidad. Es claro que los virus con genomas ARN tienen la capacidad de explorar rápidamente grandes variantes en sus secuencias genómicas, sin embargo es también cierto que el tamaño genómico y la presión selectiva implican limitaciones importantes en la diversidad que realmente puede expresarse.

La mayoría de los virus ARN tienen un genoma pequeño, y hacen uso de estrategias para amplificar la capacidad de codificación como marcos abiertos de lectura solapados, secuencias ambisentido etc. Mutaciones que alteren estas capacidades serían fatales para la supervivencia del virus.

La teoría de cuasiespecies acepta entonces un umbral máximo de variación en el genoma viral, más allá de este las mutaciones acumuladas serían deletéreas, esta cota superior se conoce como catástrofe de error. Las terapias virales combinadas apelan a inducir un gran número de mutaciones que lleven a la población viral a la catástrofe de error ^[25].

Si bien en el caso de VRS no se hace uso de terapias antivirales combinadas, es importante conocer la existencia de una cuasiespecie viral, ya que de esta depende el tratamiento a seguir para controlar el virus.

2.5 INMUNIDAD VIRAL

La respuesta inmune inmediata y encargada de la contención inicial de la infección es la respuesta inmune innata, con participación de diversos mecanismos y células inmunes, sin embargo el sistema inmune adaptativo tiene el rol principal en la recuperación de infecciones por VRS y en la resistencia a la reinfección ^[34].

Dentro de la inmunidad adaptativa se sabe que tanto la respuesta celular como la humoral juegan roles importantes. Estudios con ratones atímicos demostraron dificultades para la eliminación del virus que se solucionaba con el suministro de células

T dirigidas contra VRS. Por otro lado ratones con depleciones de linfocitos B mostraron que los anticuerpos específicos contra VRS no se requieren para la eliminación del virus durante la infección primaria pero son importantes para la resistencia a la replicación y a la reinfección.

Estudios han demostrado que las proteínas G y F son las únicas proteínas virales capaces de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes de vida media larga capaces de desafiar la replicación de VRS.

Estudios de inmunización con VRS que estimulan células T CD8⁺ confirieron resistencia a la infección pero esta respuesta fue de vida corta demostrando la necesidad de generar anticuerpos para mediar la resistencia a largo plazo para las infecciones con VRS.

Los recién nacidos a término típicamente poseen anticuerpos séricos IgG transplacentarios maternos. Estos suministran protección en la severidad de las infecciones por VRS durante las primeras 5 a 6 semanas de vida. La lactancia es también un modo de protección pasiva contra las infecciones con VRS.

Anticuerpos séricos y secretorios son producidos contra ambas glicoproteínas G y F en altos títulos en respuesta a infecciones con VRS en el caso de niños mayores en los cuales los anticuerpos maternos decaen a bajos niveles.

Los anticuerpos secretorios juegan un rol fundamental en la resistencia a las reinfecciones, aunque el efecto no es duradero luego de la infección primaria. Los anticuerpos secretorios producidos por niños en respuesta al VRS a menudo fallan en la neutralización del virus *in vitro*, esto es en parte debido a la incompetencia de la inmunidad natural en el caso de recién nacidos o niños pequeños. En individuos mayores las múltiples reinfecciones inducen altos niveles de IgA y por lo tanto una respuesta inmune secretoria más contenida.

Los anticuerpos contra VRS séricos persisten en altos títulos por mucho más tiempo que los secretorios aunque tienen dificultad para ganar acceso al tracto respiratorio. De modo que ambos, los anticuerpos séricos como los secretorios tienen roles importantes con una mayor eficiencia por parte de los secretorios pero una mayor duración en cuanto a los séricos.

En el caso de niños prematuros con un sistema inmune inmaduro y con desventajas en cuanto a la transferencia de anticuerpos séricos maternos o a través de la lactancia la inmunidad contra infecciones con VRS esta comprometida, configurando a esta población pediátrica como una población con mayor riesgo de infecciones severas.

No obstante como se mencionó anteriormente no es solo la población pediátrica la afectada por infecciones con VRS, las reinfecciones con VRS son comunes y no solo en las poblaciones más vulnerables^[7].

2.6 DESARROLLO DE VACUNAS Y TERAPIAS PARA LAS INFECCIONES CON VRS

Más allá de los esfuerzos continuos para el desarrollo de una vacuna efectiva y segura contra VRS, y con 40 años de investigación en este campo no se han obtenido resultados hasta el momento.

Las dificultades básicas para el desarrollo de una vacuna incluyen el hecho de que la infección natural con VRS confiere solamente inmunidad parcial y transiente a la reinfección del tracto respiratorio alto.

Muchas de las vacunas estudiadas son inefectivas en los primeros 6 meses de vida, y es en este momento cuando la mayoría de los niños sufren bronquiolitis causada por VRS.

Las vacunas estudiadas hasta el momento se basan en el pasaje de virus vivo, proteínas purificadas, y vacunas ADN convencionales ^[33].

En la década del 60 niños tratados con una vacuna contra VRS inactivada con formalina manifestaron una potenciación en los mecanismos patogénicos de VRS potenciando las complicaciones respiratorias, se ha demostrado que la falla de esta vacuna se debió a la pobre maduración de afinidad por parte de los anticuerpos anti- VRS generados ^[10].

Las dificultades fundamentales para el desarrollo de una vacuna segura son principalmente las que siguen: el curso de la infección es relativamente rápido, sobrepasando la respuesta inmune secundaria explicando las fallas en la protección contra la reinfección. El tropismo de VRS hace que replique en células del epitelio respiratorio en el cual el mayor mediador de resistencia a la infección es la IgA, la cual tiene una vida media corta. Por otra parte la protección por IgG sérico es inefectiva. Asimismo VRS esta representado por dos subgrupos antigénicos con diversidad antigénica considerable inclusive dentro del mismo subgrupo especialmente a nivel de la proteína G. La diversidad antigénica es importante particularmente en el caso de niños pequeños que responden mejor a la proteína G. Además la proteína G tiene un patrón de glicosilación inusual que induce anticuerpos levemente neutralizantes. Finalmente, la infección con VRS interfiere con mecanismos inmunológicos pudiendo hacer uso del propio sistema inmune del hospedador para promover su patogénesis ^[33].

De este modo el desarrollo de una vacuna efectiva y segura es un desafío importante que impuso la necesidad de nuevas estrategias para el tratamiento de estas infecciones. Entre estos se encuentra la inmunización pasiva, que ha dado resultados auspiciosos.

La profilaxis efectiva de las infecciones con VRS esta dada por el uso de un anticuerpo monoclonal humanizado, dirigido contra la proteína F, PZ, el cual es administrado mensualmente de manera intramuscular y ha demostrado ser efectivo para prevenir infecciones severas.

Existen pocos estudios de evaluación de efectividad de PZ, teniendo en cuenta la alta tasa mutacional de VRS, podría esperarse la emergencia de mutantes resistentes a esta droga.

2.7 INMUNOPROFILAXIS CON PALIVIZUMAB

El Palivizumab (PZ) es un anticuerpo monoclonal genéticamente modificado en las porciones Fc del anticuerpo para su humanización, dirigido contra la proteína de fusión de VRS. El uso de PZ demostró una disminución en las hospitalizaciones por causa de infecciones con VRS. Fue aprobado para su uso en pacientes considerados de alto riesgo de infecciones severas en Estados Unidos en 1999, hoy en día está aprobado para su uso en más de 45 países ^[39].

Debido a los problemas en el desarrollo de vacunas efectivas contra VRS durante la década de los 80 la inmunoprofilaxis pasiva fue estudiada como una alternativa para estas infecciones. Las preparaciones estándar de inmunoglobulinas no protegían adecuadamente el tracto respiratorio bajo fundamentalmente debido a los bajos títulos alcanzados.

Se desarrollaron a continuación preparaciones con concentraciones mayores de anticuerpos neutralizantes. Estudios prospectivos, multicéntricos durante 1989 y 1992 demostraron que los niños tratados con estas preparaciones manifestaban una reducción en el desarrollo de infecciones del tracto respiratorio bajo por VRS.

Un estudio de mayores dimensiones denominado PREVENT demostró que las hospitalizaciones se redujeron en un 41% y que estas preparaciones mostraron ser seguras y bien toleradas ^[39].

Unos años después surgieron problemas con estas preparaciones de anticuerpos, revelando que no son efectivos en niños con enfermedades cardíacas congénitas debido a su hiperviscosidad. Además el suministro de estas preparaciones mostró consumir demasiado tiempo involucrando 3 a 4 horas de infusiones intravenosas.

Se desarrollaron luego anticuerpos monoclonales para solucionar los problemas con las preparaciones anteriores. Las primeras preparaciones de anticuerpos monoclonales se suministraban de manera intranasal. Las pruebas con anticuerpos monoclonales del subtipo IgA mostraron buenos resultados a priori, pero posteriormente la vida media

corta de este isotipo de inmunoglobulinas generó dificultades. Las pruebas con anticuerpos IgG suministrados de manera intramuscular no arrojó resultados favorables.

No fue hasta el desarrollo de un anticuerpo monoclonal humanizado que los resultados obtenidos fueron promisorios.

Como se mencionó anteriormente PZ (Synagis ®) es un anticuerpo monoclonal humanizado del subtipo IgG1 dirigido contra una epitope de la glicoproteína de fusión de VRS. Su mecanismo de acción se basa en la neutralización e inhibición de la actividad de fusión en ambos subtipos de VRS, A y B. PZ no deriva de sangre humana y por tanto no requiere de un suministro intravenoso, esto resulta mucho más seguro y conveniente con respecto a las preparaciones de Ig antes usadas. Se suministra previo a las epidemias anuales como profiláctico para individuos de alto riesgo de desarrollo de infecciones severas de manera mensual intramuscular ^[39].

En Uruguay el 11 de Julio de 2008 el Ministerio de Salud Pública emitió la resolución del protocolo 061 que incluye al PZ dentro del “Formulario Terapéutico de medicamentos” y establece un protocolo de uso de PZ para la prevención e infecciones respiratorias bajas causadas por el VRS en niños con alto riesgo, definiendo a esta población de alto riesgo como sigue: niños con enfermedad pulmonar crónica dependientes de oxígeno que tengan menos de 24 meses al inicio de la epidemia. Niños nacidos con menos de 32 semanas de edad gestacional y menores de 6 meses al inicio de la epidemia. Niños nacidos con menos de 28 semanas de edad gestacional, menores de 12 meses al inicio de la epidemia. Finalmente niños con cardiopatía congénita no solucionada quirúrgicamente y que requieren medicación crónica, que tengan menos de 24 meses al inicio de la epidemia. En Uruguay se considera el 1 de mayo como inicio de la epidemia y el 31 de octubre como la finalización.

2.8 DETECCIÓN DE MUTANTES DE ESCAPE RESISTENTES AL PZ

Como se mencionó anteriormente la naturaleza del genoma viral y la existencia de cuasiespecies permiten la emergencia rápida de virus con ventajas selectivas que lo hacen resistentes al tratamiento con PZ. El amplio uso de PZ y particularmente su uso en pacientes inmunosuprimidos componen oportunidades de generación de mutantes de resistencia.

En algunos trabajos se han aislado mutantes de escape resistentes a PZ, en uno de estos casos un virus resistente a PZ fue seleccionado por pasaje en cultivos celulares en presencia de PZ, el virus seleccionado mostró ser completamente resistente a esta

droga en ratas que fueron tratadas con PZ como profiláctico. Los análisis de secuencias de este mutante de escape revelaron un cambio de nucleótido en el gen de la proteína F en la posición 828, este cambio fue de una A por una T comparado con una cepa referencia del subtipo A2. Este cambio nucleotídico implicó un cambio en la secuencia proteica en la posición 272 de Lys a Met. Asimismo en la posición 1591 del gen de F existe una ambigüedad entre las bases G/T para la cepa referencia mientras que en el caso del mutante se encontró una T, si la base en el caso de la secuencia patrón fuera una T, no habrían cambios mientras que en el caso de una G, se daría un cambio aminoacídico en la posición 526 de Met a Ile. Sin embargo la cepa de referencia mostró ser sensible al PZ, sugiriendo que el nucleótido en la posición 1591 no es determinante para la resistencia.

El crecimiento del mutante resistente en células HEp-2 fue normal, así como la formación de sincicios mostrando que la actividad de fusión estaba operante. Ensayos de reactividad mostraron la pérdida de reactividad antigénica de PZ para el caso del mutante ^[44].

Estudios posteriores con aislamientos de más mutantes demostraron que la resistencia al PZ es en realidad variable y que la aparición de mutaciones no avala un único patrón de resistencia.

Se encontraron nuevos mutantes dos de los cuales poseen el mismo cambio nucleotídico en la posición 828 del gen de la proteína F, un tercer mutante mostró una sustitución A por C en la posición 827 del gen F resultando en un cambio de aminoácidos en la posición 272 de la proteína de Lys a Gln. Un cuarto mutante mostró un cambio A por T en la posición 816 del gen generando un cambio de Asn por Ile en la posición 268 de la proteína.

La resistencia al PZ evaluada para estos mutantes evidenció que en algunos casos existía resistencia inclusive a muy altas concentraciones de PZ, mientras que para el último mutante descrito la resistencia fue parcial, los ensayos *in vitro* en ratas llevaron al mismo resultado, con una resistencia parcial al PZ en el caso de este mutante. ^[43]

Existen también estudios de selección *in vivo* de VRS resistentes a PZ. En estos casos se trabajó con ratas inmunosuprimidas a las cuales se les administró PZ y se inocularon intranasalmente con VRS, posteriormente se recuperan muestras extraídas de los pulmones de las ratas para buscar la presencia de VRS mutantes resistentes a PZ. Las ratas del ensayo mostraron poblaciones mixtas de VRS, con más del 50% de los VRS recuperados conteniendo mutaciones en el gen de la proteína F. Se aisló además un virus completamente resistente a la neutralización por PZ, implicando entonces un aislamiento *in vivo* de un virus mutante resistente a PZ que fue seleccionado *in vitro* ^[46].

Si bien existen diversos estudios que relacionan mutaciones en el gen de la proteína F con la resistencia de PZ, hasta el momento no existían estudios en los cuales VRS resistentes a PZ se aislaban in vivo directamente de muestras clínicas. Recientemente se ha publicado un trabajo en el cual se aíslan VRS resistentes a PZ a partir de niños tratados con esta droga que revelan mutaciones en las posiciones 827 y 814 del gen generando una pérdida en la unión de la proteína F a PZ ⁽¹⁾.

El estudio y aislamiento de mutantes de escape y su circulación en la población es de vital importancia debido a las implicancias que puede tener sobre la efectividad de PZ como estrategia para el tratamiento de las infecciones respiratorias por VRS.

3. OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar el gen de la proteína F de cepas de VRS de una colección de cepas uruguayas almacenadas correspondientes a años previos al uso de Palivizumab y establecer una comparación con el gen de la proteína F de virus aislados a partir de muestras clínicas extraídas de niños tratados con Palivizumab como profilaxis para infecciones con VRS.

Objetivos específicos:

- Propagación en cultivos celulares de cepas de VRS pre- PZ (años previos al uso de PZ).
- Extracción de ARN total correspondientes a las cepas pre-PZ amplificadas en cultivo celular.
- Extracción de ARN total a partir de aspirados nasofaríngeos de niños tratados con PZ como profiláctico (muestras post-PZ).
- Amplificación por RT-PCR del gen de la proteína F de VRS para cepas pre y post PZ.
- Secuenciación del gen de la proteína F de VRS y análisis informático de secuencias para la búsqueda de mutaciones de posible relevancia para la resistencia a PZ.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados se programó seguir una estrategia experimental que involucró el uso de distintas técnicas para arribar a los resultados esperados.

En primer lugar cepas pre-PZ almacenadas en el laboratorio se propagaron en cultivos celulares de células susceptibles y permisivas para infecciones con VRS. Una vez llevadas a cabo las distintas infecciones se obtuvo el material necesario para proseguir con las extracciones de ARN total. (Ver materiales y métodos)

Además para aumentar el número de muestras se propuso trabajar con extractos de ARN correspondientes a cepas pre – PZ almacenados a -80°C. Se evaluó previo a la amplificación del gen de la proteína F la amplificación del gen de la proteína más abundante de VRS, la proteína N.

Para el caso de las muestras post- PZ, se ideó llevar a cabo una extracción de ARN total utilizando una columna de extracción comercial que permitiría una mayor tasa de recuperación de ARN ya que en el caso de estas muestras contábamos con volúmenes muy escasos (200 µL aproximadamente). Se evaluó la positividad de las muestras con la amplificación del gen de la proteína N, que como se mencionó anteriormente es la más abundantemente transcrita del virus y por ende la de más fácil amplificación.

Para evaluar la calidad de las extracciones de ARN realizadas se llevó a cabo la amplificación del gen celular de la β - globina.

Posteriormente se amplificó el gen de la proteína F de las cepas pre y post PZ, se obtuvieron secuencias y se analizaron las mismas.

Las muestras post-PZ fueron inoculadas en cultivos celulares y se realizó una inmunofluorescencia utilizando anticuerpos dirigidos contra la proteína F de VRS.

Finalmente dado los resultados negativos obtenidos para las muestras post-PZ y para intentar definir el agente etiológico de estas muestras se amplificó el gen de la proteína N de Metapneumovirus y la proteína del hexón de Adenovirus, virus respiratorios abundantes en las infecciones respiratorias invernales.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Propagación de cepas de VRS en cultivos celulares

Se trabajó con cultivos celulares de células HEp-2 las cuales fueron crecidas en un medio de cultivo D-Mem (Gibco®) suplementado con 10% de suero fetal bovino estéril (SFB) (Gibco®) y un antibiótico. antimicótico compuesto por penicilina 10 U/mL, estreptomycin 10µg/mL y anfotericina 0.25 µg/mL (Gibco®).

Se prepararon placas p60 y de 12 wells para las cepas pre – PZ, mientras que las cepas post-PZ fueron propagadas en placas de 48 wells.

Se incubaron las células en estufa a 37 °C con 5% de CO₂.

Se dejó crecer hasta alcanzar un 80% de confluencia para la posterior infección de los cultivos celulares.

Infección de cultivos celulares de HEp-2

Se inocularon 19 cepas pre-PZ correspondientes a los años 1993 hasta 1999, así como 3 muestras correspondientes a las cepas post-PZ.

Se procedió a infectar los cultivos celulares para lo cual se descartó el medio de cultivo de crecimiento (D-Mem @10% SFB).

Se realizaron tres lavados con 1 mL de medio de cultivo sin SFB.

Posteriormente se inocularon los cultivos celulares con distintas cepas pre- PZ almacenadas en N₂. El volumen del inóculo fue de 500 µL en el caso de las placas de p60, 200 µL para las placas de 12 wells y 20 µL para el caso de las cepas post-PZ en las placas de 48 wells.

Se agregó 0.5 mL, 200µL y 20 µL para las placas p60 de 12 wells y de 48 wells respectivamente de medio de cultivo 2% para prevenir el secado de la monocapa y se incubo en estufa durante 2 horas con agitación.

Pasadas las dos horas se agregó el volumen correspondiente de medio de cultivo 2% SFB para completar los 5 mL en el caso de las p60 los 2 mL en el caso de las placas de 12 wells y los 400 µL para las placas de 48 wells.

Se incubó nuevamente en estufa a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Periódicamente se observaron los cultivos celulares mediante microscopía óptica en búsqueda de la formación de sincicios (efecto citopático característico de las infecciones por VRS).

Recuperación de material a partir de los cultivos celulares infectados

Tras la generación de efecto citopático característico y considerable se procedió a recuperar el material para proseguir a partir de los cultivos celulares.

Para la recuperación a partir de los cultivos celulares se procedió a raspar la monocapa con la ayuda de un raspador de plástico estéril o un *tip* estéril en el caso de las placas de 48 wells, se traspasó el contenido de la placa a un tubo falcon o eppendorf, y en el caso de las placas p 60 se guardó 1 mL de su contenido en un criotubo para almacenar en N₂.

Se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos.

Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con buffer PBS estéril.

Se volvió a centrifugar y se guardaron los *pellet* a -80 ° C para utilizarlos posteriormente en la extracción de ARN y en el caso de las cepas post-PZ para el montaje de la lámina de inmunofluorescencia.

Extracción de ARN total correspondientes a las cepas pre-PZ amplificadas en cultivo celular

La extracción del ARN total a partir de las cepas propagadas en cultivo celular se realizó mediante el método de Trizol Gibco® siguiendo las especificaciones del fabricante.

Se agregó a cada pellet 500 µL de Trizol, se resuspendió el pellet mediante pipeteo y vórtex, se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 mL y se dejó 5 minutos en reposo a temperatura ambiente (TA).

Se añadió 0.2 mL de cloroformo y se dio vórtex durante 15 segundos. Se dejó reposar 3 minutos a TA.

Se centrifugó a 14.000 revoluciones por minuto (RPM) y 4 °C durante 15 minutos y se recuperó la fase superior sin recoger la interfase.

Se añadió 0.5 mL de isopropanol se mezcló y se dejó 10 minutos a TA.

Se centrifugó nuevamente a 14.000 RPM durante 10 minutos y 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol 75% a cada pellet.

Se centrifugó a 14.000 RPM y 4 °C durante 2 minutos.

Se retiró el sobrenadante y se secó el pellet aproximadamente 30 minutos en estufa.

Se resuspendió el pellet en 50 µL de H₂O estéril mediante pipeteo y vórtex y se calentó a 60 °C no más de 15 minutos.

Para preservar la integridad del ARN se almacenó a -80 °C.

Amplificación por RT-PCR del gen de la proteína N de VRS de extractos de ARN almacenados a -80 °C, de cepas Pre-PZ propagadas en cultivo celular y de muestras post-PZ

En el caso de los extractos almacenados a -80 °C la RT se realizó para un volumen final de 20 µL utilizando el *primer* N2: 5´- CTT CTG CTG TCA AGT CTA GTA CAC TGT AGT – 3´ en una concentración de 500 ng/µL. Partiendo de una alícuota de 3 µL del extracto de ARN total se adicionó una primera mezcla de reacción conteniendo 1 µL de un mix de desoxirribonucleótidos (dNTPs) 10 mM (Fermentas ®), 5µL del *primer* especificado y 4 µL de agua estéril ultrapura Gibco ®.

Se incubó a 65 °C durante 5 minutos y luego se mantuvo en hielo por 2 minutos.

Una segunda mezcla de reacción compuesta por 4 µL de buffer 5X first strand (Invitrogen ®) y 2µl de DTT 0.1M (Invitrogen ®) fue adicionada e incubada durante 2 minutos a 42 °C. Finalmente se agregó 1 µL de enzima RT Superscript II (Invitrogen ®) en una concentración de 200 U/µL y se incubó por 50 minutos a 42 °C seguido de una etapa de 15 minutos de inactivación a 70 °C.

La PCR fue realizada en un volumen final de 50 µL utilizando los *primers* N1: 5´- GGA ACA AGT TGT TGA GGT TTA TGA ATA TGC- 3´ y N2: 5´- CTT CTG CTG TCA AGT CTA GTA CAC TGT AGT – 3´ en concentraciones de 10 µM ambos. Partiendo de una alícuota de 2 µL de ADNc se adicionó una mezcla de reacción conteniendo 5 µL de buffer 10X (Invitrogen ®); 1.5 µL de MgCl₂ 50mM (Invitrogen ®); 1 µL de dNTPs 10mM (Fermentas ®) 1 µL de cada uno de los *primers* especificados y 0.4 µL de enzima Recombinant Taq Polimerasa (Invitrogen ®) 5U/µL. Para completar el volumen de reacción se agregaron 37.9 µL de agua ultrapura estéril (Gibco ®).

Se incubó durante 2 minutos a 94 °C, seguido de 25 ciclos de 45 segundos a 94 °C (desnaturalización), 45 segundos a 54 °C (*annealing*), y 45 segundos a 72 °C (extensión). La extensión final se llevó a cabo durante 5 minutos a 72 °C.

Para el caso de las cepas pre-PZ propagadas en cultivo celular, la amplificación del gen de la proteína N de VRS se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo anteriormente especificado.

En el caso de las cepas post-PZ la RT se realizó siguiendo el mismo protocolo con la salvedad que el volumen final en este caso fue de 10 μ L, de modo que los volúmenes de cada reactivo utilizado se redujeron a la mitad y por otra parte se partió de 4 μ L de extracto de ARN debido a la menor concentración de ARN viral esperada en una muestra clínica.

En cuanto a la PCR, se realizó en un volumen final de 50 μ L utilizando los mismos *primers* y en las concentraciones especificados para la amplificación de la proteína N de extractos almacenados. Se partió de una alícuota de 2 μ L de ADNc y se adicionó una mezcla de reacción conteniendo 5 μ L de buffer PCR 10X (SBS Genetech ®), 1 μ L de mix de dNTPs (Fermentas ®) 10 mM, 1.5 μ L de cada uno de los *primers* en las concentraciones especificadas, 0.3 μ L de enzima Taq polimerasa en una concentración de 5U/ μ L (SBS Genetech ®). Para completar el volumen final se adicionó 38.7 μ L de agua ultrapura estéril (Gibco ®). Se mantuvo el mismo ciclado anteriormente mencionado para la amplificación de la proteína N de VRS de extractos de ARN almacenados.

Amplificación por RT-PCR del gen de la proteína F de VRS para cepas pre y post PZ

Para la RT - PCR de la proteína F fueron probadas diferentes enzimas correspondientes a distintas firmas comerciales, obteniendo buenos resultados con algunas de las enzimas testeadas.

En algunos casos la RT se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L se utilizó el *primer* ECORI 1899 5'- CGG AAT TCG ATA TAA CTA TAA ACT AGG- 3' en concentración de 10 μ M. Partiendo de 1 μ L de la extracción de ARN total se adicionó una primera muestra de reacción compuesta por 2 μ L del *primer* en la concentración especificada, y 9 μ L de agua ultrapura estéril (Gibco ®). Se incubó a 70 °C durante 5 minutos y luego se mantiene en hielo durante 2 minutos.

Una segunda mezcla de reacción compuesta por 4 μ L de buffer 5X, 1 μ L de agua ultrapura estéril (Gibco ®) y 2 μ L del mix de dNTPs 10 mM (Fermentas ®) fue adicionada e incubada a 37°C durante 5 minutos. Finalmente se adicionó 1 μ L de

enzima H- Minus 200U/ μ L (Fermentas ®). Se incubó a 42°C durante 60 minutos con una etapa final de inactivación de 70°C durante 10 minutos.

En el caso de otras cepas la RT se realizó en un volumen final de 9.5 μ L. Partiendo de 1 μ L de los extractos de ARN total se agregó una mezcla de reacción compuesta por 0.5 μ L de mix de dNTPs (Fermentas ®) 10 mM, 0.5 μ L del *primer* ECO 1899 en una concentración de 500 η g/ μ L y 5 μ L de agua ultrapura estéril (Gibco ®). Se incubó por 5 minutos a 65°C y luego se mantuvo en hielo por 2 minutos. Se agregó una segunda mezcla de reacción conteniendo 2 μ L de buffer 5X (Invitrogen ®), 1 μ L de DTT 0.1 M (Invitrogen ®) y se incubó a 42°C durante 2 minutos. Finalmente se adicionó 0.5 μ L de enzima RT Superscript II (Invitrogen ®) en una concentración de 200 U/ μ L y se incubó a 42°C durante 50 minutos seguido de una etapa de inactivación de 15 minutos a 70°C.

La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L utilizando los *primers* ECORI 1899 5'- CGG AAT TCG ATA TAA CTA TAA ACT AGG- 3' y F1BamHI 5'- CGG GAT CCC GGG GCA AAT AAC AAT GG-3' en concentraciones de 10 μ M. Partiendo de una alícuota de 2 μ L de ADNc se adicionó una mezcla de reacción compuesta por 5 μ L de buffer 10X PCR (Invitrogen ®), 1.5 μ L de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen ®), 1 μ L de mix de dNTPs, 1 μ L de cada uno de los *primers* en las concentraciones especificadas y 0.4 μ L de enzima Recombinant Taq DNA polimerasa (Invitrogen ®) 5 U/ μ L. Para completar el volumen de reacción se adicionaron 38.1 μ L de agua ultrapura estéril (Gibco ®). Se incubó durante 5 minutos a 94°C seguido de 25 ciclos de 1 minuto y medio a 94°C (desnaturalización), 1 minuto y medio a 65°C (*annealing*) y 1 minuto y medio a 72°C (extensión) seguido de una etapa de extensión final de 7 minutos a 72°C.

La PCR en otros casos se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L utilizando los mismos *primers* antes mencionados en concentraciones de 10 mM. A partir de 2 μ L de ADNc se agregó una mezcla de reacción compuesta por 10 μ L de 5 X HF buffer (Finnzymes ®), 1 μ l de mix de dNTPs 10mM (Fermentas ®), 2.5 μ l de cada uno de los *primers* 31.5 μ L de agua ultrapura estéril (Gibco ®) y 0.5 μ L de la enzima de alta procesividad Phusion Hot Start 2U/ μ L (Finnzymes ®). El ciclado fue igual al utilizado en el caso anterior.

Para el caso de las cepas post-PZ la RT se llevó a cabo utilizando la enzima Superscript II (Invitrogen ®) tal cual fue descrito anteriormente y la PCR se realizó utilizando la enzima Taq polimerasa en una concentración de 5U/ μ L (SBS Genetech

®) utilizando los mismos *primers* anteriormente mencionados y siguiendo las especificaciones del fabricante que fueron indicadas para el caso de la amplificación del gen de la proteína N.

Secuenciación del gen de la proteína F de VRS y análisis informático de secuencias para la búsqueda de mutaciones de posible relevancia para la resistencia a PZ

Los fragmentos amplificados por RT-PCR para el gen de la proteína F de VRS fueron secuenciados en un secuenciador automático ABI 3730 XL o ABI 3700 (Macrogen, Corea). Las reacciones de secuenciación se realizaron utilizando los siguientes *primers*: F597 5'- GGT CTA ACA CTT TGC TGG – 3'; F844 5'- TGT CTA ACT ATT TGA ACA – 3'; F1306 5'- GAT TCC ACG ATT TTT ATT GG – 3' y F1899 5'- CGG AAT TCG ATA TAA CTA TAA ACT AGG 3'.

Previo a la secuenciación se llevó a cabo un paso de purificación utilizando el kit comercial QIAquick extraction kit (Quiagen ®) siguiendo el protocolo especificado por el fabricante.

Las secuencias obtenidas fueron corregidas y editadas mediante el uso del programa informático BioEdit 7.0.5.3. Las secuencias obtenidas fueron sometidas a un alineamiento múltiple utilizando el programa ClustalW del pack BioEdit 7.0.5.3.

Posteriormente se analizaron estos alineamientos en busca de posibles mutaciones.

Datos clínicos de las muestras post-PZ utilizadas

Los aspirados nasofaríngeos utilizados para este trabajo fueron obtenidos con el aval del comité de ética, con su correspondiente consentimiento informado en el Centro Hospitalario Pereira Rosell. Dichos aspirados fueron procesados como positivos para VRS mediante el uso de un kit rápido de diagnóstico (Check 1 Rapid Immunocromatography tests ® Laboratorio Veda)

Muestra 12: Niño de 73 días de edad al cual se le suministró una dosis de PZ debido a prematuridad.

Ingreso al nosocomio debido a un motivo diferente de infección respiratoria, a los 11 días de internación desarrolla una infección respiratoria intrahospitalaria.

La muestra tomada resulta positiva para VRS mediante la utilización de kit rápido diagnóstico.

Muestra 74: Niño de 2 meses y 22 días de edad al cual se le suministraron 2 dosis de PZ debido a prematurez.

En el momento de ingreso contaba con 5 días de enfermedad, requirió asistencia ventilatoria mecánica.

La primera muestra tomada el día de ingreso dio positiva para VRS mediante la utilización de un kit rápido de diagnóstico.

Muestra 104: Niña de 1 mes y 25 días de edad. Recibe una dosis de PZ debido a prematurez.

Ingresa debido a una causa diferente a infección respiratoria con pase a CTI. La muestra tomada el día de ingreso es positiva para VRS y se toma una segunda muestra 8 días después que es negativa para VRS.

Extracción de ARN total a partir de aspirados nasofaríngeos de niños tratados con PZ utilizando un kit de extracción comercial

En el caso de las muestras post Palivizumab las extracciones de ARN a partir de los aspirados nasofaríngeos se realizaron utilizando una columna de extracción de ARN comercial Qlamp Viral RNA Quiagem ® debido al escaso volumen de muestra así como al bajo porcentaje de recuperación con el que cuenta el método de extracción Trizol- cloroformo para el caso de muestras clínicas en comparación con columnas de extracción comerciales.

El procedimiento de extracción de ARN se llevo a cabo siguiendo las especificaciones del fabricante, para lo cual se partió de 140 µL de aspirado nasofaríngeo al cual se le adicionó 560 µL de buffer de lisis AVL más *carrier* y se mezcló por vórtex durante 15 segundos. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifugó brevemente para remover gotas de la tapa y se agregó 560 µL de etanol, se mezcló por vórtex 15 segundos.

Se agregó 630 µL de la solución anterior en la columna Qlamp Viral RNA con tubo de recolección de 2 mL. Se centrifugó a 8.000 RPM por un minuto. Se descartó el filtrado y se centrifugó nuevamente a 8.000 RPM hasta que toda la solución pasó por la columna de extracción.

Se abrió la columna y se repitió la adición de 630 μL de solución y se centrifugó nuevamente.

Se agregó 500 μL de buffer de lavado AW1 y se centrifugó a 8.000 RPM durante un minuto y se descartó el filtrado. Se transfirió la columna a un nuevo tubo de recolección y se agregó 500 μL de buffer de lavado AW2, se centrifugó a 14.000 RPM durante 3 minutos. Se descartó el filtrado y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto.

Se transfirió la columna a un tubo eppendorf y se descartó el filtrado. Se agregó 50 μL de buffer de elución AVE equilibrado a temperatura ambiente, se incubó durante 1 minuto y se procedió a la elución por centrifugación a 8.000 RPM durante 1 minuto.

Amplificación mediante RT-PCR del gen de la β -globina para testear la calidad de las extracciones de ARN a partir de los aspirados nasofaríngeos correspondientes a las cepas post – PZ

La β -globina es una de las cadenas de la proteína globina, que conforma la parte proteica de la hemoglobina. Es un gen celular que mediante su amplificación permite testear la calidad de una extracción de ARN total.

Se llevó a cabo la amplificación por RT-PCR de este gen celular con el fin de evaluar la calidad de la extracción de ARN total llevada a cabo con la columna comercial antes mencionada.

La RT se llevó a cabo en un volumen final de 15 μL se utilizó el *primer* $\beta 25$ 5'-GGT GAG GAT CTT CAT GAG GT-3' en concentración de 100 μM . Partiendo de 5 μL de la extracción de ARN total se adicionó una primera mezcla de reacción compuesta por 1 μL de primer $\beta 25$ en la concentración mencionada, y 5 μL de agua estéril ultrapura (Gibco®). Se incubó por 5 minutos a 70 °C y se puso en hielo durante 2 minutos.

Una segunda mezcla de reacción compuesta por 5 μL de buffer 5X (Fermentas®), 2 μL de mix de dNTPs (Fermentas®) 10mM, 2 μL de agua ultrapura estéril (Gibco®) y 1 μL de la enzima RT MMLV 200 U/ μL (Fermentas®) fue adicionada. Se incubó durante 1 hora a 42 °C seguido de una etapa de inactivación de 15 minutos a 70 °C.

La PCR se realizó en un volumen final de 50 μL utilizando los *primers* $\beta 25$ y $\beta 15$ 5'-TCC TAC AAT GAG CTG CGT GTG-3' en concentraciones de 10 μM . Partiendo de una alícuota de 5 μL de ADNc se adicionó una mezcla de reacción conteniendo 15 μL de buffer 10 X (SSB Genetech®), 1 μL de mix de dNTPs (Fermentas®) 10mM, 3 μL

de cada uno de los primers en las concentraciones especificadas, 0.5 μ L de Taq y se completó el volumen final con la adición de 27.5 μ L de agua ultrapura estéril (Gibco®).

Se incubó durante 3 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturalización), 1 minuto a 55°C (*annealing*) y 1 minuto a 72°C (extensión). Seguido de una etapa de extensión final de 5 minutos a 72°C.

Inmunofluorescencia a partir de aspirados nasofaríngeos de niños tratados con PZ como profiláctico para verificar la negatividad para VRS de las muestras clínicas

Cultivos celulares de HEp-2 en placas de 48 *wells* fueron infectados con 20 μ L de los aspirados nasofaríngeos correspondientes a los pacientes tratados con Palivizumab. Luego de 36 horas de incubación se transfirieron 20 μ L de cada infección a un pocillo en la lámina de inmunofluorescencia.

Luego del secado se procedió a fijar las muestras. Una de las láminas fue fijada con metanol y acetona, sumergiendo la lámina en metanol preenfriado a -20°C durante 5 minutos y a continuación 30 segundos en acetona preenfriada a -20°C.

El duplicado se fijó con paraformaldehído, se sumergió la lámina en formaldehído y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Ambas láminas se dejaron secar.

A continuación se bloquearon las láminas con buffer PBS seroalbúmina bovina 1% durante 10 minutos a TA.

Se incubó durante 30 minutos a TA con un anticuerpo monoclonal (2F) dirigido contra la proteína F cedido por el Dr. Melero del Instituto de Salud Carlos III de Madrid, se agregaron 50 μ L por pocillo del anticuerpo sin diluir por ser sobrenadante de hibridomas. Se lavó 3 veces durante 5 minutos con PBS sumergiendo el porta con agitación.

Se incubó 30 minutos a TA con el anticuerpo conjugado diluido 1% en seroalbúmina bovina – PBS, el anticuerpo conjugado Alexa Fluor anti-mouse IgG (Molecular Proben®) en una concentración de 2 mg/mL es dirigido contra la porción Fc de los anticuerpos de ratón y esta conjugado a un fluorocromo. Se utilizó en una dilución 1:10.

Se lavó 3 veces durante 5 minutos sumergiendo el porta en PBS con agitación.

Se agregó a cada pocillo el colorante de núcleos Azul de Evans 1:30000 durante 5 minutos, se enjuagó con agua destilada y se dejó secar. Se montó con anti-fade

Dabco y se observó en un microscopio de fluorescencia utilizando los filtros característicos para la emisión de cada fluoróforo.

Amplificación por pcr anidada de la proteína del hexón de Adenovirus

Para la amplificación del gen de la proteína del hexón se llevó a cabo una PCR anidada. El primer round se realizó en un volumen final de 50 μ L. Se partió de 5 μ L de extracción de ADN y se adicionó una mezcla de reacción compuesta por 5 μ L de buffer 10X PCR, 1 μ L de mix de dNTPs 10 mM (Fermentas ®), 1 μ L de los *primers* AD1F y AD1R en concentraciones de 20 pmol, 0.3 μ L de enzima Taq y 36.7 μ L de agua ultrapura estéril (Gibco ®). Se incubó durante 2 minutos a 94 °C, seguido de 45 ciclos de 30 segundos a 94 °C (desnaturalización), 2 minutos a 50 °C (annealing), 1 minuto a 68 °C (extensión).

El segundo round se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L. Partiendo de 2 μ L del producto del primer round se adicionó una mezcla de reacción formada por 5 μ L de buffer 10X PCR, 1 μ L de mix de dNTPs 10mM (Fermentas ®), 1 μ L de los *primers* AD2F y AD2R en una concentración de 20 pmol, 0.3 μ L de enzima Taq y 39.7 μ L de agua ultrapura estéril (Gibco ®). Se incubó durante 5 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C (desnaturalización), 1 minuto a 55 °C (*annealing*), y 30 segundos a 72 °C (extensión).

Electroforesis en gel de agarosa al 1%

En todos los casos los productos de amplificación fueron corridos en un gel de agarosa en una concentración al 1%. Se corrió a 125V en buffer TBE 1X aproximadamente por 40 minutos. Una vez que el frente de corrida avanzó la distancia suficiente como para resolver las bandas del tamaño esperado se terminó la corrida.

6. RESULTADOS

Propagación de cepas de VRS pre- PZ en cultivos celulares

Se propagaron en cultivo de células HEp-2 19 cepas de VRS pre-PZ. La apariencia de las células HEp-2 sin infectar es similar a la de otras líneas celulares epiteliales (Figura 4A). Las células infectadas por VRS desarrollaron un efecto citopático (ECP) característico de formación de sincicios como se puede ver en las figuras 4B y 4C.

La aparición de este efecto citopático fue variable en el tiempo para el caso de las distintas cepas pre-PZ propagadas debido a que se desconocía la carga viral de cada una de las muestras.

En algunos casos el ECP apareció tras 48 horas de infección, en otros casos se requirió de más tiempo de incubación así como pasajes en ciego para intentar lograr la amplificación. (Tabla 1)

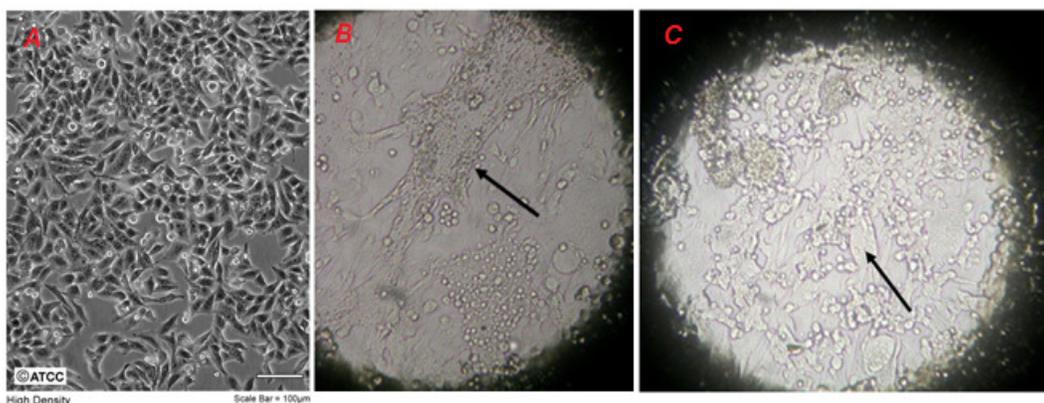


Figura 4: A) Fotografía que muestra la morfología epitelial típica de las células HEp-2 disponible desde: [<http://www.atcc.org/>] B y C) Fotografías tomada a partir de las infecciones de células HEp-2 con cepas de VRS pre-PZ en las cuales se puede ver claramente la aparición de los característicos sincicios, efecto citopático particular de VRS.

Estrategia del pasaje en cultivo celular de las cepas pre-PZ

La propagación en cultivo celular de las cepas pre-PZ se representa en la tabla 1, se indica el año correspondiente a cada muestra, el tipo de placa utilizada, el tiempo de incubación, si hubo una segunda infección y pasaje en ciego y la aparición de ECP.

Los pasajes en ciego se realizan para intentar propagar el virus inclusive aunque en la primera infección el título viral no haya sido suficiente para generar ECP o cuando la generación del ECP no mostró ser demasiado clara.

Como resultado de la propagación en cultivo celular de las cepas pre-PZ se obtuvo material para la extracción de ARN total de las muestras indicadas con una flecha en la tabla 1.

Cepas pre-PZ	Año de la muestra	Tipo de placa	Tiempo de incubación	ECP	Segunda infección	ECP
Long		P60	48 hrs.	✓✓
→93N/638	1993	P60	48 hrs.	✓✓
→94N/230	1994	P60	48 hrs.	✓✓
→95N/506	1995	12 wells	5 días	X	Pasaje ciego	X
→9506241	1995	P60	48 hrs.	✓✓
→96B/461	1996	12 wells	48 hrs.	✓	Pasaje ciego	✓
→96N/408	1996	12 wells	48 hrs.	✓	Pasaje ciego	✓
→96N/655	1996	12 wells	48 hrs.	✓
→96B/445	1996	12 wells	5 días	X
→97N/625	1997	12 wells	5 días	X
→97012	1997	12 wells	48 hrs.	✓✓
→97B/148	1997	12 wells	5 días	X	Pasaje ciego	X
→97N/633	1997	P60	48 hrs.	✓✓
→97N/625	1997	12 wells	48 hrs.	✓✓
→98B/701	1998	P60	48 hrs.	✓✓
→98B/752	1998	12 wells	48 hrs.	✓
→98B/700	1998	12 wells	5 días	X	Pasaje ciego	X
→98B/702	1998	12 wells	48 hrs.	✓	Pasaje ciego	X
→99N/733	1999	12 wells	5 días	X	Pasaje ciego	X

Tabla 1: Cepas pre-PZ propagadas en cultivo celular. Los símbolos ✓ y X representan la generación y no generación de ECP respectivamente, mientras que los doble ✓ indican que el ECP generado fue característico y prominente.

Las flechas a la izquierda indican aquellos casos en los cuales fue posible proseguir con la extracción de ARN total para la posterior amplificación del gen de la proteína F.

Amplificación del gen de la proteína N de VRS de extractos de ARN almacenados a -80 °C de cepas pre-PZ

Los extractos de ARN testeados mediante la amplificación del gen de la proteína N y los resultados de la amplificación se representan en la tabla 2.

Muestra	Producto de amplificación
93/161	✓
94N/018	✓
94N/246	✓
95B/304	✗
95N/638	✓
96N/451	✓
96N/506	✓
97B/650	✓
97N/613	✓
99B/806	✗
99B/780	✗

Tabla 2: Se representan los resultados obtenidos para la amplificación del gen de la proteína N de VRS en el caso de los extractos de ARN almacenados a -80°C para el caso de cepas pre-PZ. El símbolo ✓ indica que se obtuvo producto de amplificación mientras que el signo ✗ indica lo contrario.

La figura 5 muestra una electroforesis en gel de agarosa al 1% realizado para observar los productos de amplificación de las distintas RT-PCR del gen de la proteína N de los extractos de ARN almacenados. Se cargaron 8 µL de muestra y 2 µL de buffer de carga en cada caso. El marcador de peso molecular es de 100 pb (Fermentas®), El tamaño del producto de amplificación del gen de la proteína N de VRS es de 280 pb.

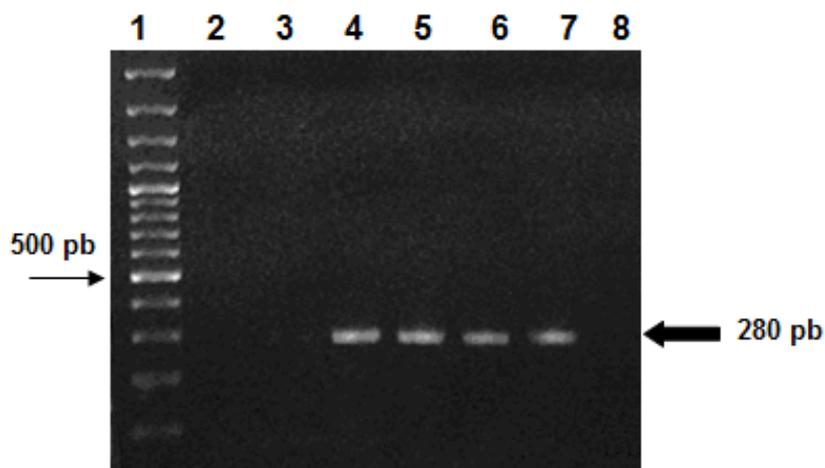


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación de la RT-PCR para el gen de la proteína N correspondientes a cepas pre-PZ. Carriles: 1) Marcador de peso molecular; 2) muestra 99B/806; 3) muestra 99B/780; 4) muestra 97B/650; 5) muestra 96N/506; 6) muestra 94N/018; 7) Control positivo cepa de referencia Long; 8) Control negativo sin ARN. El producto de amplificación de la proteína N de VRS es de 280 pb.

Amplificación del gen de la proteína N de las cepas pre-PZ propagadas en cultivo celular

Las extracciones realizadas a partir de las cepas propagadas en cultivo celular fueron utilizadas para realizar la RT-PCR de la proteína N obteniéndose producto de amplificación en todos los casos testeados. La figura 6 muestra una de las electroforesis en gel de agarosa al 1% para visualizar los productos de amplificación para el gen de la proteína N de VRS en el caso de cepas pre-PZ propagadas en cultivo celular. Se cargaron 8 μ L de muestra y 2 μ L de buffer de carga en cada caso. El marcador de peso molecular es de 100 pb (Fermentas®). El tamaño del producto de amplificación del gen de la proteína N de VRS es de 280 pb

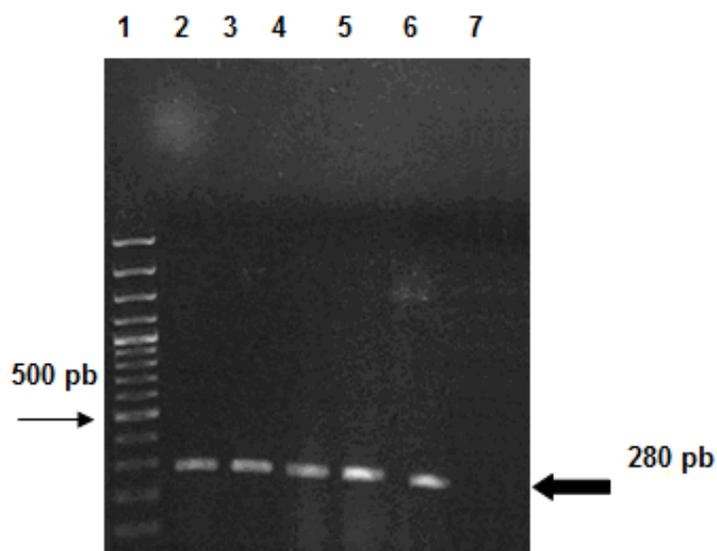


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación de la RT-PCR para el gen de la proteína N de cepas pre-PZ propagados en cultivo celular. Carriles: 1) Marcador de peso molecular; 2) muestra 94N/230 (partiendo de menos cantidad de ARN); 3) muestra 94N/230; 4) muestra 93N/638; 5) muestra 96B/451; 6) Control positivo, cepa de referencia Long; 7) Control negativo sin ARN. El producto de amplificación de la proteína N de VRS es de 280 pb.

Amplificación del gen de la proteína N de VRS de cepas post –PZ para verificar la positividad para VRS de las muestras

Las extracciones de ARN de muestras post-PZ fueron utilizadas para llevar a cabo una RT-PCR y amplificar el gen de la proteína N de VRS de modo de verificar la positividad de las muestras. La figura 7 muestra la electroforesis en gel de agarosa para visualizar los productos de amplificación. Los volúmenes de muestra cargados así como los de buffer de carga y marcador de peso molecular fueron análogos a los utilizados anteriormente.

No se observa producto de amplificación en ninguna de las muestras post-PZ evaluadas, excepto en el caso del control positivo.

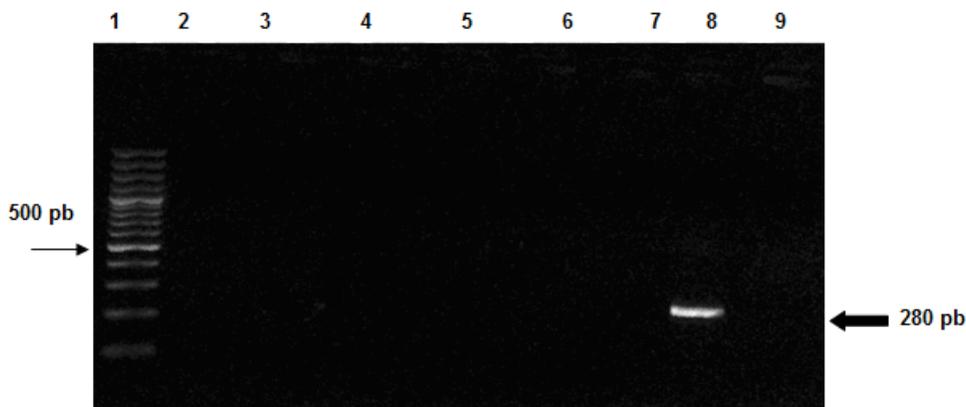


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación de la RT-PCR para el gen de la proteína N a partir de las muestras clínicas post-PZ. Carriles: 1) Marcador de peso molecular; 2) muestra N°12; 3) muestra N°12 (menor volumen de ARN); 4) muestra N°72; 5) muestra N°72 (menor volumen de ARN); 6) muestra N°104; 7) muestra N°104 (menor volumen de ARN); 8) control positivo producto de PCR de cepa de referencia Long; 9) Control negativo sin ARN. El producto de amplificación de la proteína N de VRS es de 280 pb.

Amplificación del gen de la β -globina para testear la calidad de las extracciones de ARN a partir de los aspirados nasofaríngeos correspondientes a las cepas post – PZ

Las extracciones de ARN de las cepas post-PZ fueron testeadas mediante la amplificación del gen de la β -globina el cual fue positivo en todos los casos avalando la calidad de las extracciones de ARN. (Figura 8).

Se cargaron 8 μ L de muestra y 2 μ L de buffer de carga en cada caso. El marcador de peso molecular es de 100 pb (Fermentas ®). El tamaño del producto de amplificación del gen de la β -globina es de 314 pb.

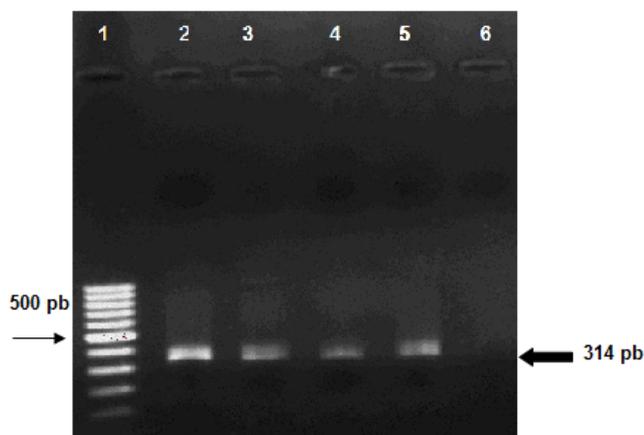


Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación de la RT-PCR para el gen de la β -globina a partir de las extracciones de ARN de las muestras post-PZ. Carriles: 1) Marcador de peso molecular; 2) muestra N° 12; 3) muestra N° 74; 4) muestra N° 104; 5) Control positivo, producto de amplificación de extracción de ARN positiva para la amplificación de β -globina; 6) Control negativo sin ARN. El producto de amplificación del gen de la β -globina es de 314 pb.

Amplificación por RT-PCR del gen de la proteína F de VRS para cepas pre y post PZ

La amplificación del gen de la proteína F permitió obtener producto de amplificación para la posterior secuenciación en el caso de las cepas pre-PZ propagadas en cultivo celular que mostraron ECP marcado. En el caso de los extractos de ARN almacenados a -80°C se logró amplificar el gen de la proteína F en un solo caso.

La figura 8 A muestra una electroforesis en gel de agarosa al 1% para los productos de amplificación del gen de la proteína F en el caso de cepas pre-PZ. Se cargaron $5\ \mu\text{L}$ de cada una de las muestras más $1\ \mu\text{L}$ de buffer de carga. El marcador de peso molecular es de 1 kb (Fermentas®), El tamaño del producto de amplificación del gen de la proteína F de VRS es de 1800 pb.

En el caso de las cepas post-PZ, luego de haber testeado la calidad de las extracciones de ARN mediante la amplificación del gen de la β -globina se intentó amplificar el gen de la proteína F sin obtenerse resultado positivo. (Figura 8B) Se cargó en cada carril volúmenes análogos a los utilizados en el caso de las muestras pre-PZ.

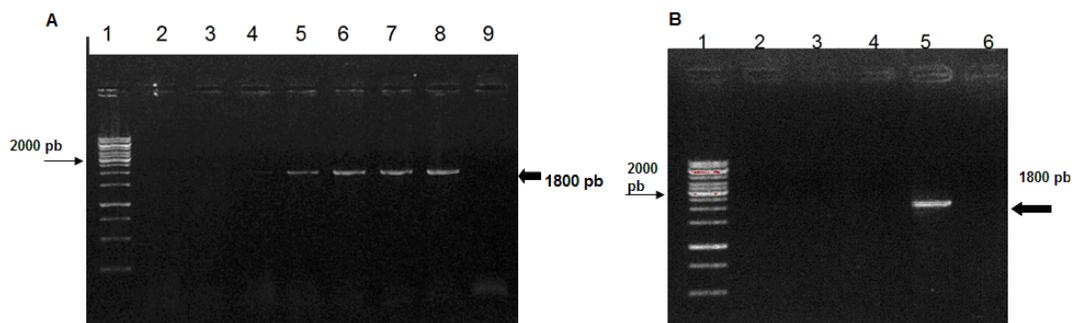


Figura 8: A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación de la RT- PCR para el gen de la proteína F a partir de las muestras pre-PZ. Carriles: 1) Marcador de peso molecular; 2) muestra 96N/451; 3) muestra 94N/018; 4) muestra 94N/246; 5) muestra 95N/638; 6) muestra 96B/461; 7) muestra 94N/230; 8) control positivo, cepa de referencia Long; 9) Control negativo sin ARN.

B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación de la RT- PCR para el gen de la proteína F a partir de las muestras post-PZ. Carriles: 1) Marcador de peso molecular; 2) muestra N° 12; 3) muestra N°74; 4) muestra N° 104; 5) control positivo cepa de referencia Long; 6) Control negativo sin ARN.

El producto de amplificación de la proteína F de VRS es de 1800 pb.

Secuenciación del gen de la proteína F de cepas de VRS pre-PZ y análisis informático de secuencias para la búsqueda de mutaciones de posible relevancia para la resistencia a PZ

Para establecer la existencia de cambios nucleotídicos y eventualmente aminoacídicos presentes en la secuencia del gen de la proteína F de las cepas de VRS pre-PZ que pudieran coincidir con las anteriormente reportadas como mutaciones generadoras de resistencia al PZ se obtuvo la secuencia completa del gen de la proteína F. Se realizó un alineamiento múltiple mediante la utilización de programas informáticos (ver materiales y métodos).

Los resultados obtenidos evidencian que en las regiones 816,827 y 828 del gen de la proteína F, donde habían sido reportados cambios responsables de la resistencia al PZ no se encontraron cambios para el caso de las muestras pre-PZ. Sin embargo en la posición 814 del gen, fue previamente descrito un cambio nucleotídico A→G responsable en parte de la resistencia al PZ. El resultado obtenido muestra que dicha mutación esta presente en una cepa pre-PZ correspondiente al año 1996. (Figura 9)

Asimismo se puede observar en las secuencias una región de variabilidad que flanquea los sitios de mutaciones reportados.

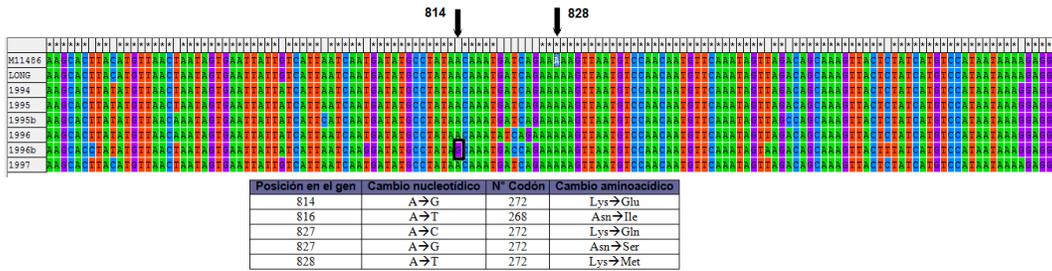


Figura 9: Alineamiento de secuencias del gen de la proteína F de cepas pre-PZ. Las secuencias alineadas corresponden a una secuencia de referencia obtenida a partir del banco de datos del GenBank, la secuencia M11486, además se secuenció la cepa de referencia Long con la que se trabajó y las cepas correspondientes a los años indicados. Se indican las regiones en las cuales han sido reportadas mutaciones de relevancia en la resistencia al PZ y dichos cambios nucleotídicos y aminoacídicos. Se indica además con un recuadro el caso de la cepa correspondiente al año 1996 que muestra un cambio nucleotídico en la posición 814 como el que fue reportado.

Inmunofluorescencia a partir de aspirados nasofaríngeos de niños tratados con PZ como profiláctico para verificar la negatividad para VRS de las muestras clínicas

La inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra la proteína F de VRS (2F) no mostró señal en el caso de ninguna de las muestras post-PZ indicando la negatividad de las muestras para VRS. En la figura 13 se puede observar la clara fluorescencia en el caso del control positivo y la ausencia de la misma en el control negativo y las diferentes muestras.

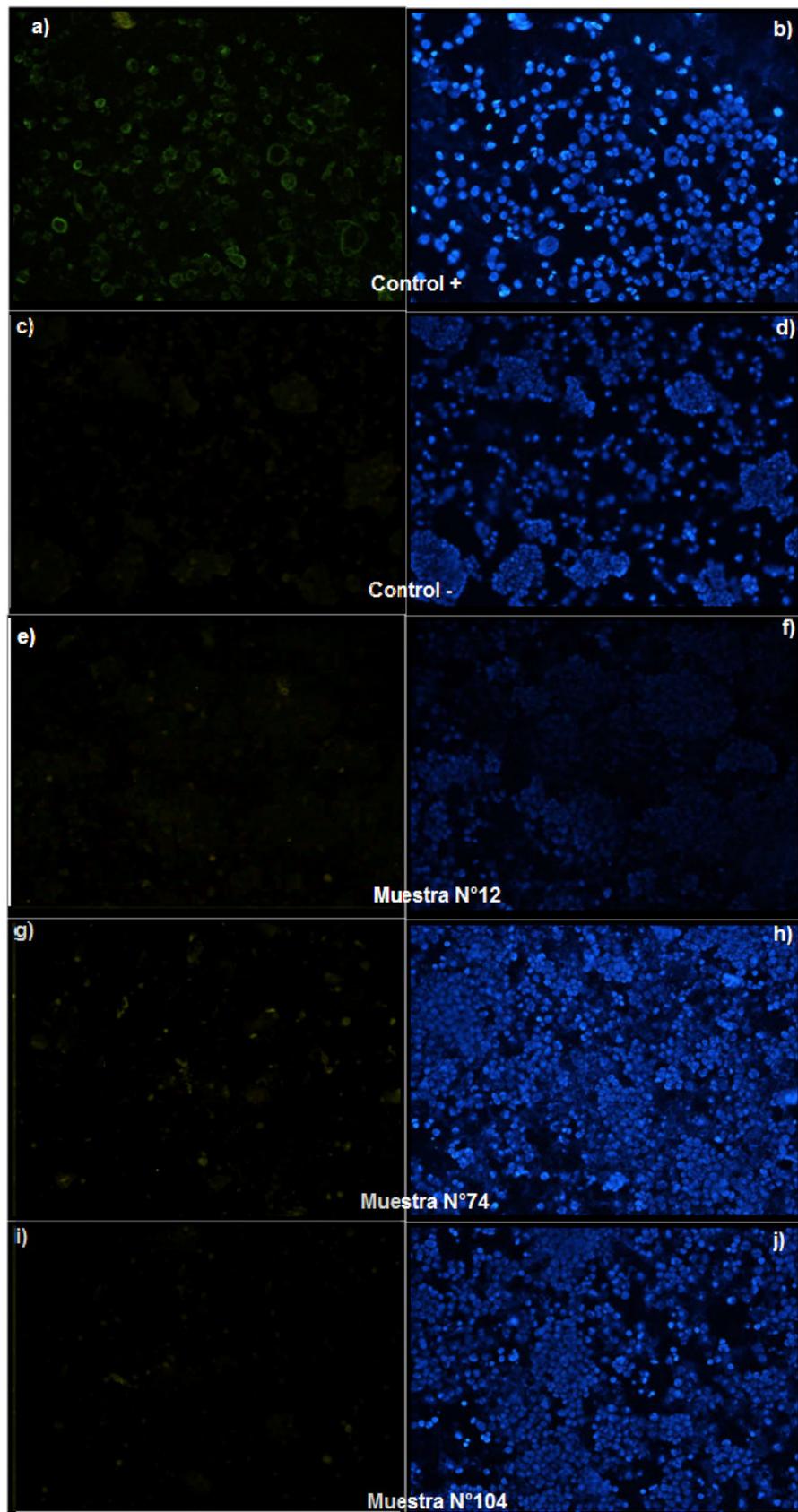


Figura 13: Inmunofluorescencia (IF) de muestras post-PZ utilizando un anticuerpo monoclonal 2F (izquierda) y el fluoróforo que tiñe los núcleos celulares DAPI (derecha).

a) Control positivo cepa de referencia Long - 2F b) cepa Long - DAPI c) Control negativo células HEp-2 sin infectar - 2F d) células HEp-2 sin infectar - DAPI e) muestra N°12 - 2F f) muestra N°12 - DAPI g) muestra N°74 - 2F h) muestra N°74 - DAPI de i) muestra N° 104 - 2F j) muestra N° 104 - DAPI

Amplificación de la proteína del hexón de Adenovirus para testear una posible coinfección VRS- Adenovirus

Se amplificó la proteína del hexón de Adenovirus mediante una PCR anidada obteniéndose producto de amplificación en los casos de las muestras N° 12 y N°104. La figura 15 muestra la electroforesis en gel de agarosa al 1% realizada para visualizar dichos productos de amplificación. Se cargaron 8 μ L de muestra y 2 μ L de buffer de carga en cada caso. El marcador de peso molecular es de 100 pb (Fermentas®). El tamaño del producto de amplificación del gen de la proteína del hexón de Adenovirus es de 168 pb.

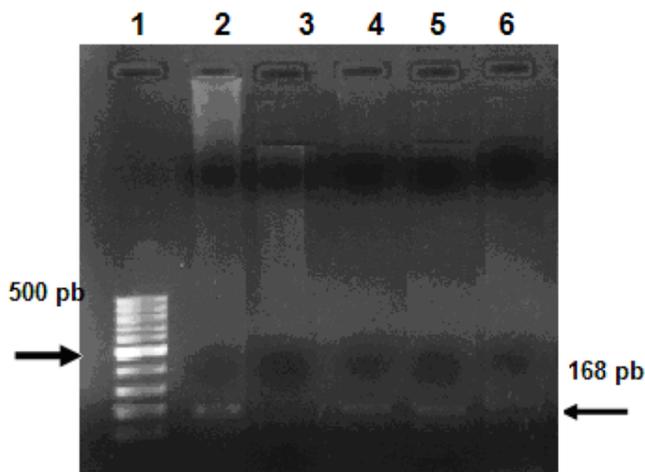


Figura 15: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación de la PCR anidada para el gen del hexón de Adenovirus a partir de las muestras post-PZ. Carriles: 1) Marcador de peso molecular; 2) muestra N°12; 3) muestra N°74; 4) muestra N°104; 5) control positivo muestra positiva para Adenovirus; 6) Control negativo sin ADN.

El producto de amplificación de la proteína del hexón de Adenovirus es de 168 pb.

Los productos de amplificación obtenidos fueron secuenciados y a dichas secuencias se le realizó un análisis de homología utilizando la herramienta *BLAST* del sitio NCBI en la base de datos del Genbank obteniéndose como resultado que la muestra post-PZ N°104 resultó ser positiva para Adenovirus B. El resultado obtenido en el *BLAST* de la secuencia correspondiente a la muestra N°12 no evidenció positividad para Adenovirus.

7. DISCUSIÓN

Los niños menores de 18 meses, niños prematuros con enfermedades pulmonares crónicas y/o enfermedades cardíacas así como los adultos inmunocomprometidos o ancianos constituyen los grupos de alto riesgo para infecciones con VRS, las cuales representan cada año una de las mayores causas de hospitalización durante los meses de invierno .

Debido a la ausencia de una vacuna efectiva contra VRS, una de las únicas posibilidades de tratamiento de estas infecciones es mediante el uso de PZ.

En Uruguay el Ministerio de Salud Pública en una ordenanza ministerial del año 2007 estipuló el uso de PZ para un grupo de riesgo definido. El PZ ha sido usado durante unos años sin vigilancia de la aparición de mutantes resistentes al mismo. El estudio y aislamiento de mutantes de escape y su circulación en la población es de vital importancia debido a las implicancias que puede tener sobre la efectividad de PZ como estrategia para el tratamiento de las infecciones respiratorias por VRS.

Este trabajo propuso comparar secuencias del gen de la proteína F de cepas pre y post PZ. Buscando posibles mutaciones naturales en cepas de años previos al uso de PZ comparándolas con las mutaciones generadas por el uso de esta droga a partir de muestras clínicas de pacientes tratados con PZ.

La propagación en cultivo celular de las cepas Pre-PZ permitió la amplificación de dichas cepas y la disposición del material necesario para la posterior extracción de ARN. El tiempo de incubación fue variable debido a que la generación de ECP en algunos casos tardó mas, los inóculos utilizados no habían sido titulados de modo que no se conocía el título viral en cada caso explicando las diferencias en los tiempos necesarios para la generación de ECP.

En los casos en los cuales la formación del ECP no fue clara o requería demasiados días de incubación se realizaron pasajes en ciego para intentar propagar la cepa en un cultivo celular fresco.

Para aumentar el número de cepas pre-PZ estudiado se utilizaron extractos de ARN realizados previamente y almacenados a -80°C. El ARN es un ácido nucleico de alta labilidad, lo que lo hace muy fácilmente degradable. El éxito en la posterior amplificación de un gen de VRS es directamente dependiente de la calidad de estos ARN almacenados. Por otro lado la amplificación de la proteína estudiada en el trabajo, la proteína F, tiene complicaciones debido a su baja tasa de transcripción a causa de su ubicación en el genoma de VRS así como a su gran tamaño.

Por estas razones se realizó un testeo inicial de estos ARN almacenados con la amplificación del gen de la proteína N, esta proteína es la más abundantemente

transcripta y por lo tanto la de mayor facilidad para su amplificación. En el caso de que la amplificación del gen de la proteína N a partir de estos extractos resultara efectiva sería competente continuar con la amplificación del gen de la proteína F. Efectivamente en algunos casos se logró amplificar la proteína N a partir de estos extractos, avalando la calidad del ARN para proseguir, mientras que en otros casos en los que la proteína N no pudo ser amplificada, no se prosiguió con la amplificación de la proteína F.

En el caso de los extractos obtenidos a partir de las cepas propagadas en cultivo celular, se realizó la amplificación del gen de la proteína N para luego sí proseguir con la amplificación del gen de la proteína F.

Para los extractos frescos obtenidos a partir de las cepas propagadas en cultivo celular se logró amplificar el gen de la proteína F en todos los casos. Sin embargo en los casos de los extractos almacenados que resultaron positivos para la amplificación del gen de la proteína N, la amplificación del gen de la proteína F no se logró excepto en un caso.

Como se mencionó anteriormente la amplificación de la proteína F es dificultosa principalmente debido a que su tasa de transcripción en comparación con la tasa de transcripción de la proteína N es mucho menor. En el caso de un extracto de ARN almacenado que pudo haber sufrido degradación, el ARNm para el gen de la proteína N se encuentra en concentraciones considerablemente más altas que el ARNm del gen de la proteína F explicando porque no se logró la amplificación del gen de la proteína F mientras que sí el de la proteína N. De todos modos el testeo inicial tuvo utilidad debido a que en el caso inverso de no amplificación del gen de la proteína N sería inútil intentar amplificar el gen de la proteína F.

Las secuencias obtenidas a partir de los productos de amplificación del gen de la proteína F fueron analizadas y alineadas en busca de mutaciones naturales en los sitios donde se han encontrado las que se producen por el uso de PZ y que resultan en resistencia al mismo según lo que se menciona en la bibliografía. Los estudios previos en el área de mutantes de escape a PZ evidencian un patrón diferencial de resistencia a esta droga generado por mutaciones en distintas regiones del gen de la proteína F dentro del definido como sitio de contacto con PZ.

Estudios topológicos utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína F permitieron definir 5 sitios antigénicos no solapados ^[16]. PZ interacciona con una región de la proteína que se encuentra entre los aminoácidos 258 y 275 ubicada en el sitio antigénico II ^[47]. En algunos casos un cambio nucleotídico en la región se

corresponde con un cambio aminoacídico que además implica una resistencia parcial o total al PZ.

La bibliografía evidencia un cambio nucleotídico en la posición 828 del gen de la proteína F que no se encontró en ninguna de las cepas pre-PZ secuenciadas, lo mismo ocurrió en el caso del cambio en la posición 827⁽⁴⁴⁾. Sin embargo en la región 814 el trabajo de *Adams et al 2010* ⁽¹⁾ muestra un cambio nucleotídico de una A por una G, que se obtuvo en el caso de una de las cepas pre-PZ analizadas correspondiente al año 1996 ⁽¹⁾.

Las cepas pre-PZ estudiadas corresponden a años en los cuales PZ no era utilizado como profiláctico para las infecciones con VRS, por lo tanto virus circulantes durante estos años no habrían estado sometidos a la presión selectiva ejercida por el tratamiento con PZ. En conclusión no sería esperable encontrar mutaciones de relevancia en las regiones de contacto con el anticuerpo. No obstante la generación de esta mutación en una posición que hoy se reporta como responsable al menos parcialmente de la resistencia a PZ en una cepa circulante años previos al uso de esta droga plantea una importante interrogante sobre la existencia de mutantes de escape previo al desarrollo del tratamiento de estas infecciones. De este modo la efectividad de PZ estaría desafiada inclusive antes de su empleo como única estrategia aprobada para tratar infecciones con VRS.

Cabe destacar que los pacientes a partir de los cuales fueron aislados los virus son diferentes y por tanto las presiones selectivas a la que los virus fueron sometidos fueron diversas. Las mutaciones generadas eventualmente pueden haberse debido a diferencias entre los organismos infectados como puede ser por ejemplo diferencias en la respuesta inmune generada por cada individuo.

Asimismo, como se mencionó anteriormente la naturaleza altamente mutacional del genoma de VRS da lugar a la posibilidad de acumulación de mutaciones al azar en la región de contacto con el anticuerpo monoclonal que no sean debidas a la selección con el uso de esta droga sino mutaciones naturales. La figura 9 muestra el alineamiento de las secuencias obtenidas para la proteína F de las muestras pre-PZ, en ésta se puede ver que existen regiones variables en la proteína F conocidas como puntos calientes donde se acumulan mutaciones que no responden a la presión ejercida por drogas, evidenciando la posibilidad de la mutación en la cepa del año 1996 como una mutación natural. Esto sin embargo no quita trascendencia a la mutación encontrada en el trabajo ya que aunque sea una mutación natural o no, existe en una cepa previa al uso de esta droga y podría comprometer al menos parcialmente su efectividad.

El trabajo anteriormente citado ^[1] donde se describe un aislamiento *in vivo* de VRS resistente a PZ a partir de una muestra clínica evidencia la suma de dos mutaciones como responsables de resistencia a PZ, la encontrada en la posición 828 del gen así como la encontrada en la posición 814. Esto muestra el patrón diferencial de resistencia al PZ, que se explica mediante la suma de ciertas mutaciones en la región de contacto y el pasaje de una resistencia parcial a una resistencia total a la droga.

De este modo es delicado definir que una mutación en el genoma de VRS es directamente responsable de la resistencia a esta droga, en algunos casos las responsables de resistencia pueden ser la acumulación de mutaciones. Conjuntamente se necesitan otras evidencias como por ejemplo la pérdida de unión al anticuerpo.

Es igualmente importante considerar que existen trabajos que prueban las diferencias existentes entre las secuencias del gen de la proteína F de estudios *in vitro* con respecto a estudios *in vivo*, en muchos casos por ejemplo las secuencias de virus resistentes a PZ aislados directamente de los pulmones de ratas infectadas no se corresponden con las secuencias obtenidas a partir de estos mismos mutantes propagados en cultivo celular, mostrando que existen factores que están presentes en las condiciones *in vivo* que no son reproducibles *in vitro* y que los resultados obtenidos a partir de cultivo celular deben ser tomados con cautela^[46].

En cuanto a las muestras post-PZ, estas habían sido diagnosticadas como positivas para VRS en el nosocomio donde fueron tomadas mediante el uso de un kit diagnóstico rápido (Check 1 Rapid Immunochromatography tests ® Laboratorio Veda). Sin embargo tras varios intentos de amplificación de los genes tanto de la proteína N como la proteína F de VRS no se obtuvieron resultados positivos.

Las extracciones de ARN total a partir de estas muestras fueron realizadas utilizando un kit comercial debido al mayor porcentaje de recuperación en función del poco volumen de muestra con el que se contaba. La calidad de dicha extracción podría ser la que estuviera afectando la amplificación de ambos genes a partir de estas muestras, por esta razón se evaluó la calidad de estas extracciones mediante la amplificación del gen celular de la β -globina. La extracción de ARN implica tanto la extracción de mensajeros celulares como virales con los primeros en concentraciones mucho mayores que los segundos, de este modo si la extracción fue realizada correctamente podría obtenerse producto de amplificación de un gen celular como lo es el gen de la β -globina. Efectivamente la amplificación de dicho gen resultó positiva en todos los casos avalando la calidad de las extracciones.

Las posibles causas de no amplificación de los genes de las proteínas N y F de VRS a partir de estas muestras podrían ser varias. En primer lugar la posibilidad de que la carga viral de estas muestras fuera demasiado baja y que la sensibilidad de la RT-PCR no hubiera sido suficiente como para lograr amplificar dichos genes. Por esta razón se llevó a cabo un ensayo de Inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína F de VRS previo al pasaje de los aspirados nasofaríngeos en cultivo celular. La no obtención de señal de fluorescencia en el caso de las muestras post-PZ indicó negatividad para VRS contraponiéndose con los resultados obtenidos con el kit utilizado. No obstante no se puede descartar la posibilidad de una carga viral demasiado baja inclusive para lograr la correcta infección y amplificación viral en el cultivo celular posteriormente utilizado para la inmunofluorescencia.

El kit diagnóstico utilizado tiene una base inmunológica, fundada en la utilización de anticuerpos mono y policlonales dirigidos contra distintos antígenos de VRS (*Veda Lab S.A* <http://www.vedalab.com/>) Dentro de las especificaciones de estos tipos de kits con altos valores de sensibilidad y especificidad se considera igualmente la posibilidad de reactividad cruzada con otros virus respiratorios así como la necesidad de confirmar el resultado obtenido en el test mediante otros métodos en el caso de alguna ambigüedad.

Para estudiar la posibilidad de que las muestras sean negativas para VRS y que haya reactividad cruzada se intentó amplificar el gen de la proteína N de Metapneumovirus así como el gen de la proteína del hexón de AdV.

En el caso de Metapneumovirus este es un virus perteneciente a la misma familia viral que VRS y por tanto podría presentar similitud en los antígenos reconocidos por el kit diagnóstico. Si bien se realizó un primer ensayo (datos no mostrados) para la amplificación del gen N, la calidad del control positivo no permitió una respuesta certera, por lo cual se planteó la necesidad de producir un nuevo control positivo para volver a repetir el ensayo.

En el caso de AdV es un virus abundante durante las infecciones respiratorias invernales y existe la posibilidad de infección con AdV y reactividad cruzada por parte del kit. La amplificación del gen de la proteína del hexón de AdV y la posterior secuenciación de los productos de amplificación reveló que la muestra N° 104 es en realidad positiva para Adenovirus.

Para explicar los resultados obtenidos, podría sugerirse la posibilidad de coinfección con AdV explicándolo en base a que el genoma de AdV es ADN y por lo tanto de mayor resistencia a la degradación. Una alternativa podría ser coinfección AdV-VRS en el momento de toma de muestra, explicando el resultado positivo para VRS

arrojado por el kit. El posterior almacenamiento y tratamiento de la muestra podría haber sido el causante de degradación del genoma de VRS y no el de AdV y de allí se explicarían los resultados positivos y negativos obtenidos en las PCR de AdV y VRS respectivamente.

Retomando los resultados obtenidos en el ensayo de inmunofluorescencia, la negatividad para VRS es algo que no se puede descartar, y en este caso la necesidad de evaluación de la eficiencia del kit diagnóstico utilizado debería ser evaluada.

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- Se logró propagar en cultivos celulares las cepas pre-PZ almacenadas en el laboratorio, visualizando efecto citopático característico y prominente que permitió la obtención de material para realizar la extracción de ARN.
- Se logró obtener extractos de ARN de buena calidad a partir de las cepas pre-PZ propagadas en cultivo celular así como a partir de las muestras clínicas post-PZ.
- La amplificación del gen de la proteína F de las cepas pre y post PZ fue realizada obteniéndose productos de amplificación en el caso de las cepas pre-PZ que fueron posteriormente secuenciados y analizados en búsqueda de mutaciones.
- El análisis de secuencias correspondientes a las cepas pre-PZ reveló la presencia de una mutación reportada como participante en la resistencia a PZ en la posición 814 del gen de la proteína F en una muestra pre-PZ del año 1996.
- Las cepas post-PZ mostraron ser negativas para VRS, y una de estas mostró positividad para Adenovirus.

El estudio de generación de mutantes resistentes a una droga es de vital importancia permitiendo conocer la efectividad de los tratamientos utilizados. En este trabajo se intentó establecer una comparación del gen de la proteína F de VRS de cepas en circulación previa y posteriormente al uso de PZ para intentar establecer si las altas tasas mutacionales de un virus de ARN pueden per sé explicar las mutaciones acumuladas en su genoma pudiendo encontrarse inclusive en cepas previas al uso de una droga o si es específicamente la presión selectiva ejercida por la droga la que genera estas mutaciones. La mutación encontrada en la posición 814 del gen de la proteína F de una cepa de VRS del año 1996 mostró la posibilidad de mutaciones naturales en el genoma viral que puedan repercutir sobre la efectividad de un tratamiento, inclusive anteriormente a su utilización. Esto sugiere que las altas tasas mutacionales de los virus ARN pueden comprometer la efectividad de las diferentes

drogas utilizadas inclusive antes de que dichos virus sean seleccionados por la droga utilizada.

No obstante el número de secuencias analizadas es bajo y estuvo limitado por las dificultades para la amplificación del gen de la proteína F. El estudio de un número mayor de cepas pre-PZ y el análisis de las secuencias del gen de la proteína F en búsqueda de estas mutaciones serían necesarios.

Por otra parte en el caso de querer establecer una comparación precisa de cepas pre y post PZ requeriría trabajar con cepas aisladas a partir del mismo individuo, de modo de descartar las diferencias en presiones selectivas generadas por ejemplo por diferencias en las respuestas inmunes.

En cuanto a los resultados obtenidos para las cepas post-PZ, es patente la necesidad de un estudio de efectividad de los kits diagnóstico utilizados en los nosocomios. Si bien su alta simplicidad y rápidos resultados los hacen ideales para la clínica el costo que puede tener la obtención de resultados incorrectos puede ser significativo.

9. REFERENCIAS

1. Adams, O., Bonzel, L., Kovacevic, A., Mayatepek, E., Hoehn, T., and Vogel, M., (2010) **Palivizumab-resistant human respiratory syncytial virus infection in infancy**. Clin Infect Dis. 51(2): p. 185-8.
2. Bahuer Gabriela, D.V., Fariña Diana, Rodriguez Susana., (2007) **Infección por virus sincicial respiratorio en poblaciones vulnerables: riesgo biológico contra riesgo social**. Arch de pediatría Urug. 78: p. 1.
3. Barik, J. and Wonnacott, S., (2009) **Molecular and cellular mechanisms of action of nicotine in the CNS**. Handb Exp Pharmacol. (192): p. 173-207.
4. Barik, S., McLean, T., and Dupuy, L.C., (1995) **Phosphorylation of Ser232 directly regulates the transcriptional activity of the P protein of human respiratory syncytial virus: phosphorylation of Ser237 may play an accessory role**. Virology. 213(2): p. 405-12.
5. Bermingham, A. and Collins, P.L., (1999) **The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription**. Proc Natl Acad Sci U S A. 96(20): p. 11259-64.
6. Bukreyev, A., Whitehead, S.S., Murphy, B.R., and Collins, P.L., (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. 71(12): p. 8973-82.
7. Collins, P.L., Chanock, R., and Murphy, B.R., *Respiratory syncytial virus. En: Fields Virology (eds D. M. Knipe y P. M. Howley), pp.1443-1485. 4^{ta} ed. Fields Virology. 2001, Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. 1443-1485.*
8. Collins, P.L., Hill, M.G., Cristina, J., and Grosfeld, H., (1996) **Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus**. Proc Natl Acad Sci U S A. 93(1): p. 81-5.
9. Collins, P.L., Olmsted, R.A., Spriggs, M.K., Johnson, P.R., and Buckler-White, A.J., (1987) **Gene overlap and site-specific attenuation of transcription of the viral polymerase L gene of human respiratory syncytial virus**. Proc Natl Acad Sci U S A. 84(15): p. 5134-8.
10. Delgado, M.F., Coviello, S., Monsalvo, A.C., Melendi, G.A., Hernandez, J.Z., Bataille, J.P., Diaz, L., Trento, A., Chang, H.Y., Mitzner, W., Ravetch, J., Melero, J.A., Irusta, P.M., and Polack, F.P., (2009) **Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease**. Nat Med. 15(1): p. 34-41.
11. Dupuy, L.C., Dobson, S., Bitko, V., and Barik, S., (1999) **Casein kinase 2-mediated phosphorylation of respiratory syncytial virus phosphoprotein P**

- is essential for the transcription elongation activity of the viral polymerase; phosphorylation by casein kinase 1 occurs mainly at Ser(215) and is without effect.** J Virol. 73(10): p. 8384-92.
12. Fearn, R. and Collins, P.L., (1999) **Model for polymerase access to the overlapped L gene of respiratory syncytial virus.** J Virol. 73(1): p. 388-97.
 13. Feldman, S.A., Hendry, R.M., and Beeler, J.A., (1999) **Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G.** J Virol. 73(8): p. 6610-7.
 14. Flint, S.J.E.L.W.R.V.R.S.A.M., ed. *Principles of Virology. Molecular biology, pathogenesis and control of animal viruses.* . segunda edición ed. 2004, ASM press: Washington D.C.
 15. Frank, W.D.F., *Medical Virology.* cuarta edición ed. 1994, San Diego.: Academic press.
 16. Garcia-Barreno, B., Palomo, C., Penas, C., Delgado, T., Perez-Brena, P., and Melero, J.A., (1989) **Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins.** J Virol. 63(2): p. 925-32.
 17. Hardy, R.W. and Wertz, G.W., (2000) **The Cys(3)-His(1) motif of the respiratory syncytial virus M2-1 protein is essential for protein function.** J Virol. 74: p. 5880–5885.
 18. Heminway, B.R., Yu, Y., Tanaka, Y., Perrine, K.G., Gustafson, E., Bernstein, J.M., and Galinski, M.S., (1994) **Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion.** Virology. 200(2): p. 801-5.
 19. Jin, H., Cheng, X., Zhou, H.Z., Li, S., and Seddiqui, A., (2000) **Respiratory syncytial virus that lacks open reading frame 2 of the M2 gene (M2-2) has altered growth characteristics and is attenuated in rodents.** J Virol. 74(1): p. 74-82.
 20. Johnson, P.R. and Collins, P.L., (1988) **The fusion glycoproteins of human respiratory syncytial virus of subgroups A and B: sequence conservation provides a structural basis for antigenic relatedness.** J Gen Virol. 69 (Pt 10): p. 2623-8.
 21. Johnson, P.R., Spriggs, M.K., Olmsted, R.A., and Collins, P.L., (1987) **The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins.** Proc Natl Acad Sci U S A. 84(16): p. 5625-9.
 22. Kalica, A.R., Wright, P.F., Hetrick, F.M., and Chanock, R.M., (1973) **Electron microscopic studies of respiratory syncytial temperature-sensitive mutants.** Arch Gesamte Virusforsch. 41(3): p. 248-58.

23. Kolakofsky, D., Lamb, R., (2001) **Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication. Fields - Virology 4th Edition (August 2001):**Bernard N. Fields, Peter M., MD Howley , Diane E., Ph.D. Griffin , Robert A., Ph.D. Lamb , Malcolm A., MD Martin , Bernard Roizman, Stephen E., MD Straus, David M., Ph.D. Knipe (Editors).By Lippincott Williams & Wilkins Publishers. : p. 1066-1095.
24. Lamb, R.A. and Kolakofsky, D., (2001) **Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In Fields Virology, Fourth Edition, B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley.**
25. Lauring, A.S. and Andino, R., **Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses.** PLoS Pathog. 6(7): p. e1001005.
26. Levine, S. and Hamilton, R., (1969) **Kinetics of the respiratory syncytial virus growth cycle in HeLa cells.** Arch Gesamte Virusforsch. 28(2): p. 122-32.
27. Levine, S., Klaiber-Franco, R., and Paradiso, P.R., (1987) **Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus.** J Gen Virol. 68 (Pt 9): p. 2521-4.
28. Ma, K., Roy, A. M. & Whittaker, G. R. (2001). Nuclear export of influenza virus ribonucleoproteins: identification of an export intermediate at the nuclear periphery. *Virology* **282**, 215-20.
29. Maclellan, K., Loney, C., Yeo, R.P., and Bhella, D., (2007) **The 24-angstrom structure of respiratory syncytial virus nucleocapsid protein-RNA decameric rings.** J Virol. 81(17): p. 9519-24.
30. McLellan, J.S., Chen, M., Kim, A., Yang, Y., Graham, B.S., and Kwong, P.D., (2010) **Structural basis of respiratory syncytial virus neutralization by motavizumab.** Nat Struct Mol Biol. 17(2): p. 248-50.
31. Money, V.A., McPhee, H.K., Mosely, J.A., Sanderson, J.M., and Yeo, R.P., (2009) **Surface features of a Mononegavirales matrix protein indicate sites of membrane interaction.** Proc Natl Acad Sci U S A. 106(11): p. 4441-6.
32. Morris, S.K., Dzolganovski, B., Beyene, J., and Sung, L., (2009) **A meta-analysis of the effect of antibody therapy for the prevention of severe respiratory syncytial virus infection.** BMC Infect Dis. 9: p. 106.
33. Openshaw, P.J. and Tregoning, J.S., (2005) **Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection.** Clin Microbiol Rev. 18(3): p. 541-55.
34. Oshansky, C.M., Zhang, W., Moore, E., and Tripp, R.A., (2009) **The host response and molecular pathogenesis associated with respiratory syncytial virus infection.** Future Microbiol. 4: p. 279-97.

35. Perez, M., Garcia-Barreno, B., Melero, J.A., Carrasco, L., and Guinea, R., (1997) **Membrane permeability changes induced in Escherichia coli by the SH protein of human respiratory syncytial virus**. *Virology*. 235(2): p. 342-51.
36. Roymans, D., De Bondt, H.L., Arnoult, E., Geluykens, P., Gevers, T., Van Ginderen, M., Verheyen, N., Kim, H., Willebrords, R., Bonfanti, J.F., Bruinzeel, W., Cummings, M.D., van Vlijmen, H., and Andries, K., **Binding of a potent small-molecule inhibitor of six-helix bundle formation requires interactions with both heptad-repeats of the RSV fusion protein**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(1): p. 308-13.
37. Sanguinetti Silvana, R.d.V., Rosana S. , Lara Batthyáni, Anabela Santoro, Ivonne Rubio, Héctor Chiparelli, Adriana Varela, Soledad Mateos. , (2000) **Infección Respiratoria Aguda por Virus Sincicial Respiratorio en niños hospitalizados menores de dos años**. *Arch de pediatría*. . 71: p. 5-9.
38. Simoes, E.A., (1999) **Respiratory syncytial virus infection**. *Lancet*. 354: p. 847-852.
39. Simoes, E.A., (2002) **Immunoprophylaxis of respiratory syncytial virus: global experience**. *Respir Res*. 3 Suppl 1: p. S26-33.
40. Sugawara, M., Czaplicki, J., Ferrage, J., Haeuw, J.F., Power, U.F., Corvaia, N., Nguyen, T., Beck, A., and Milton, A., (2002) **Structure-antigenicity relationship studies of the central conserved region of human respiratory syncytial virus protein G**. *J Pept Res*. 60(5): p. 271-82.
41. Teng, M.N. and Collins, P.L., (1998) **Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles**. *J Virol*. 72(7): p. 5707-16.
42. Walsh, E.E. and Hruska, J., (1983) **Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein**. *J Virol*. 47(1): p. 171-7.
43. Zhao, X., Chen, F.P., Megaw, A.G., and Sullender, W.M., (2004) **Variable resistance to palivizumab in cotton rats by respiratory syncytial virus mutants**. *J Infect Dis*. 190(11): p. 1941-6.
44. Zhao, X., Chen, F.P., and Sullender, W.M., (2004) **Respiratory syncytial virus escape mutant derived in vitro resists palivizumab prophylaxis in cotton rats**. *Virology*. 318(2): p. 608-12.
45. Zhao, X., Singh, M., Malashkevich, V.N., and Kim, P.S., (2000) **Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(26): p. 14172-7.
46. Zhao, X. and Sullender, W.M., (2005) **In vivo selection of respiratory syncytial viruses resistant to palivizumab**. *J Virol*. 79(7): p. 3962-8.

47. Zhu, Q., McAuliffe, J.M., Patel, N.K., Palmer-Hill, F.J., Yang, C.F., Liang, B., Su, L., Zhu, W., Wachter, L., Wilson, S., MacGill, R.S., Krishnan, S., McCarthy, M.P., Losonsky, G.A., and Suzich, J.A., **Analysis of respiratory syncytial virus preclinical and clinical variants resistant to neutralization by monoclonal antibodies palivizumab and/or motavizumab.** J Infect Dis. 203(5): p. 674-82.