

Tesina de Grado

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

Facultad de Ciencias

Evaluación de la actividad virucida contra virus respiratorio sincicial humano de moléculas de síntesis basadas en una prototipo.

Natalia Deutsch Marino

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Orientación Microbiología

Orientador: Dra. Sandra Frabasile

Sección Virología, Facultad de Ciencias, UdelaR.

Junio, 2021.

AGRADECIMIENTOS

La vida esta llena de retos, y uno de esos es la universidad. Una vez culminas te das cuenta de que esos retos te forman no solo como científico sino como mejor persona. Por lo que le debo a esta institución la oportunidad de formarme y haberme dado buenos amigos, compañeros y profesores.

Este proyecto no ha sido trabajo fácil, pero gracias al apoyo de mi tutora la Dra. Sandra Frabasile al compartir su conocimiento científico, ser mi guía durante todo el desarrollo de la tesina, y haberme tenido una gran paciencia mientras aprendía hizo que esto fuera tan disfrutable como laborioso. Así como como a la Dra. Adriana Delfraro quien junto con la Dra. Frabasile me dieron la oportunidad de embarcarme en este reto.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Virologia, partícipes indirectos, me brindaron su conocimientos cuando lo necesite y confianza al asignarme tareas de apoyo al laboratorio. Agradecer sin dudar a los compañeros Natalia S., Cataliana B., Lucia M., Florencia O., Florencia C., Marcie J., Gabriel M., Felipe P., Ana L., Irene F., Gaston L., David T., por su apoyo emocional y académico.

A los compañeros que durante la carrera muchos se convirtieron en grandes amistades y fueron mi pilar durante estos años. El agradecimiento especial a Ana Laura por las interminables horas de estudio, comidas y apoyo en momentos en que dudaba de mi.

A mi pareja, a mis amistades, compañeros de trabajo y superiores por su apoyo y paciencia, así como a mi familia.

A mi compañera gata Gatubela quien me acompaño durante el proceso de escritura durmiendo en mi falda y sobre mis apuntes.

INDICE

Resumen

1. Introducción y antecedentes

1.1 El virus respiratorio sincicial humano: impacto clínico

1.2 El virus

1.2.1 Taxonomía e historia

1.2.2 Estructura del virion y proteínas virales

1.2.3 Genoma y grupos antigénicos.

1.2.3.1 Ciclo replicativo y transcripción

1.3 Vacunas

1.4. Antivirales

1.4.1 Aprobados para el tratamiento contra el VRS

1.4.2 Agentes virucidas. Formulaciones para la higiene de manos.

1.4.3 Potenciales antivirales contra VRS

2. Objetivos

2.1 General

2.2 Específicos

3 Materiales y Métodos

3.1 Líneas celulares

3.2 Virus

3.3 Producción de stock virales en cultivos celulares.

3.4 Extracción de ARN

3.4.1 RT-PCR

3.5 Titulación de virus. Cálculo de dosis infectante de cultivo de tejido 50% (DICT₅₀)

3.6 Evaluación de la citotoxicidad de las moléculas derivadas de 28a por el ensayo de rojo neutro.

3.7 Evaluación de la citotoxicidad de la ribavirina.

3.7.1 Determinación de la actividad antiviral de la ribavirina

3.8 Análisis estadístico del ensayo de citotoxicidad y MCNC

3.9 Análisis de la actividad de la ribavirina contra VRS

3.10 Análisis de la actividad virucida de las moléculas seleccionadas por inmunofluorescencia indirecta (IFI)

4 Resultado

4.1 Cultivos celulares e infección.

4.2 Producción de stock y títulos virales

4.2.1 Identificación de VRS

4.3 Evaluación de la citotoxicidad y MCNC de las moléculas estudio.

4.3.1 Determinación de la $CC_{50\%}$ por ensayo de rojo neutro

4.3.2 Determinación de la MCNC

4.4 Determinación de la $CC_{50\%}$ y MCNC de la Ribavirina

4.4.1 Determinación de la acción inhibitoria de la ribavirina evaluada contra VRS

4.5 Evaluación de la actividad virucida de las moléculas 324, 1167 y 1205 contra VRS

5 Discusión

6 Conclusiones

7 Perspectivas

8 Referencias

Anexo I : Estructura de las moléculas análogas de la molécula 28a.

Anexo II: Cálculos para la preparación de moléculas en DMSO.

Anexo III: Titulación de dosis infectante $DICT_{50}$

Anexo IV: Ensayo de rojo neutro

Anexo V: Estructura de la molécula de ribavirina

Abreviaturas

aa aminoácidos

ADNc ácido desoxirribonucleico copia

ARN ácido ribonucleico

ARNm ARN mensajero

dNTP desoxinucleósido trifosfato (por sus siglas en ingles)

ELISA Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (por sus siglas en ingles)

INF Interferon (por sus siglas en inglés)

IRAB Infección respiratoria aguda baja

Kb Kilobase

MCNC máxima concentración no citotóxica

µL microlitros

µM micromolar

mM milimolar

mm milímetros

nm nanómetros

nt nucleótidos

log logaritmo base 10

ORF Marco abierto de lectura (por sus siglas en ingles)

PBS Buffer sodio-fosfato (por sus siglas en ingles)

PCR Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en ingles)

RH Repetido heptádicos

RT retro transcripción

TNFα Factor de necrosis tumoral alfa (por sus siglas en ingles)

V volts

VRS Virus respiratorio sincicial

VRSh Virus respiratorio sincicial humano

VRSh-A/B , Virus respiratorio sincicial humano cepas A o B

VRShB, Virus respiratorio sincicial bovino

RESUMEN

El virus respiratorio sincitial humano (VRSh) es la causa principal de las infecciones virales del tracto respiratorio bajo alrededor del mundo, afectando principalmente a menores de 2 años, mayores de 65 e inmunodeprimidos. Actualmente se investigan varias terapias para el tratamiento y/o prevención de de infecciones por VRSh, debido a que actualmente no existe ni vacuna ni antiviral efectivo.

En el presente trabajo se estudió un conjunto de moléculas de diseño derivadas de una molécula llamada 28a (Moore et al, 2013) para evaluar la actividad virucida. Se propagaron y titularon por cálculo de dosis infectante de cultivo de tejido 50% (DICT₅₀) de diferentes cepas VRS-A en la línea celular HEp-2. También se propagó una cepa de VRS-B y se realizó un análisis por RT-PCR para determinar su presencia en los cultivos. Se analizó la citotoxicidad por método de rojo neutro y la máxima concentración no citotóxica (MCNC) de las moléculas en estudio. Se determinó también la actividad antiviral de la ribavirina y su máxima concentración no citotóxica (MCNC).

Del total de moléculas estudiadas, diez de ellas no presentaron citotoxicidad en cultivo de células HEp-2. La máxima concentración no citotóxica (MCNC) pudo ser hallada para la molécula 1205. Se evaluó la actividad virucida por inmunofluorescencia indirecta (IFI) de ésta molécula junto con las moléculas 1167 y 324 (previamente analizadas por su actividad antiviral) enfrentándolas a la cepa de referencia Long VRSh en una dilución de 10⁻⁸. Las moléculas en estudio analizadas por ésta técnica, en principio no mostraron una actividad virucida contra ésta cepa de VRSh, pero los resultados deberían confirmarse con la utilización de otras técnicas. Esta característica de falta de actividad virucida es deseable para aquellas moléculas que se busca tengan un actividad antiviral. Estas moléculas podrán ser empleadas en futuros ensayos virucidas contra otras cepas de VRSh en futuros trabajos con los virus propagados y titulados en el presente trabajo.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 EL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL HUMANO: IMPACTO CLÍNICO

El virus respiratorio sincicial humano (VRSh) pertenece a la familia de los *Pneumoviridae*. Es una de las principales causas de las infecciones respiratorias agudas bajas (IRAB) en niños menores de cinco años, adultos mayores de 65 años y pacientes inmunodeprimidos, causando gran mortalidad y morbilidad. (Rivera et al 2016).

Las infecciones por VRSh se producen en periodos estacionales en todo el mundo. En los países de clima templado comienza a fines de otoño o a comienzos de invierno y llega hasta entrada la primavera (Ang et al 2020). En los meses de verano hay una escasa o nula presencia de VRSh, a excepción de países como la India que coincide con la temporada de lluvias propiciado por el hacinamiento y con esto un aumento en los contagios. La detección es mas frecuente en los niños menores de 5 años y adultos mayores de 65 años (Roca et al 1997). En niños pequeños hasta los 2 años tiene una alta prevalencia (Murray et al 2009).

Las enfermedades respiratorias son frecuentes durante la infancia y representan entre un 10 a un 30% de las hospitalizaciones. La incidencia en las enfermedades respiratorias tanto en los países desarrollados como en vías de desarrollo no ha demostrado diferencia. Esto se debe a que las medidas de higiene en ambos casos no demostraron disminuir la incidencia de estas enfermedades pero si la mortalidad (Roca et al 1997).

La IRAB causada por VRSh provoca el 1% de las hospitalizaciones en Estados Unidos y unas 4500 muertes al año (Aldao et al 2005). En Uruguay en el año 2014 un 79% de las consultas en el CHPR (Centro Hospitalario Pereira Rossel) en menores de 6 meses fueron positivo para VRSh (De Olivera et al 2019).

Las poblaciones con mayor riesgo de desarrollar una forma grave de la enfermedad está en niños de nacimiento prematuro o con enfermedad pulmonar crónica, enfermedades cardíacas significativas, malformación de la vía aérea y/o enfermedades neuromusculares. En personas mayores, aquellas que poseen cardiopatías o enfermedades pulmonares, e inmunocomprometidos (Fernandez et al 2016).

Entre un 50 a 70% de los niños menores de un año son infectados por VRSh, siendo especialmente vulnerables aquellos con enfermedad pulmonar crónica del neonato (broncodisplasia pulmonar, BDP), enfermedad pulmonar crónica de diferentes etologías y cardiopatías congénitas con repercusión hemodinámica (Machado et al 2007, FNR 2016).

Las reinfecciones son frecuentes ya que la inmunidad otorgada es parcial por lo que una nueva infección sera de menor gravedad o asintomática. Se ha visto que en niños menores que han pasado por una infección grave rara vez recaen salvo que presenten enfermedades subyacentes. En gran parte de los casos las infecciones del tracto respiratorio bajo induce algún grado de resistencia en futuras infecciones (Machado et al 2007; San Juan, et al 2006).

La existencia de comorbilidades crean una mayor susceptibilidad a la infección con este virus de la misma forma que el nacimiento prematuro, bajo peso al nacer menor a 2,500 Kg, desordenes inmunológicos adquiridos o no, neoplasia, problemas pulmonares, anormalidades cromosómicas

(por ejemplo Síndrome de Down) y/o defectos cardíacos congénitos (Griffiths et al 2017).

La transmisión de este virus es entre humanos por contacto directo o indirecto a través de fomites, pudiendo persistir hasta por 30 minutos en superficies o manos (Aldao et al 2005). El periodo de excreción de virus es entre 1 a 21 días pudiendo prolongarse en inmunodeprimidos hasta 6 semanas (Machado et al 2007).

La edad y el sexo masculino son otros factores que promueven la severidad de estas infecciones. Factores externos como la exposición pasiva al humo de tabaco por parte de una embarazada o del entorno después de nacer, el hacinamiento, la ausencia o el corto tiempo de alimentación por pecho materno se encuentra dentro de los mas relevantes. La desnutrición y el bajo peso al nacer generan una respuesta inmunológica deficiente que resulta en infecciones mas graves. Esto se relaciona con una inmunocompetencia y una capacidad pulmonar reducida (De Olivera et al 2019; Machado et al 2007). Sin embargo los mas vulnerables son los nacidos prematuros debido a la interrupción temprana del desarrollo de los pulmones, los que posean un sistema inmune inmaduro y haber nacido en momentos de epidemia de VRSh incrementando el riesgo de hospitalización (Cutrera et al 2019). En adultos mayores el indice de mortalidad es cercano al 10%, donde el 78% de estos cursaba enfermedades cardíacas o pulmonares (San Juan et al 2006).

1.2 EL VIRUS

1.2.1 TAXONOMÍA E HISTORIA

La familia *Pneumoviridae* comprende virus envueltos de ARN de sentido negativo dentro del orden Mononegavirales. Clasificado como una subfamilia dentro de la familia de los *Paramyxoviridae* fue reclasificado en el año 2016 como una familia con dos géneros: *Orthopneumovirus* y *Metapneumovirus*. Los hospederos son mamíferos para ambos géneros y aves en *Metapneumovirus*. El virus respiratorio sincicial humano esta clasificado como especie *Human orthopneumovirus*, género *Orthopneumovirus* (Rima et al 2017).

Dentro de la clasificación del virus los géneros *Orthopneumovirus* infecta a humanos, roedores y bovinos, el género *Metapneumovirus* infecta humanos y aves (Rima et al 2017).

El VRSh fue descrito por primera vez en chimpancés de laboratorio durante una epidemia de coriza por el Dr. J. A. Morris en 1956. Durante ese año Chanock y otros (Chanok et al. 1962) obtuvieron muestras del virus de infantes con pneumonia y crup (tos seca), y bronquiolitis. Sus investigaciones reportaron que se trataba de un virus de las vías aéreas. Se presentaba mayormente en niños menores de un año y niños mayores hasta 3 años, causando enfermedades respiratorias severas. Al ser cultivado in vitro en células HEp-2 producía un efecto citopático característico de células gigantes o sincicios por lo que lo nombraron como Virus Respiratorio Sincicial (Chanock et al 1962).

El virus respiratorio sincicial bovino (VRSB) esta cercanamente relacionado con el humano en epidemiología, patología e infección, pero su diferencia radica a nivel de la replicación en el hospedero tanto in vitro como in vivo. No solo los bovinos son afectados por este virus sino que

otras especies como ovinos, bisontes y camélidos, (Valarcher et al 2006).

El VRSB también es causante de afecciones respiratorias en caprinos, donde tiene una alta incidencia. Esto se debe a la cría y pastoreo en forma conjunta de bovino y caprinos favoreciendo el contagio entre estas dos especies (Martinez et al 2013).

1.2.2 ESTRUCTURA DEL VIRION Y PROTEÍNAS VIRALES

El virion está compuesto por una envoltura de bicapa lipídica provista por la célula huésped y tiene forma esférica irregular de 150 a 300 nm o filamentosa con un diámetro de 60 a 100nm y una longitud de hasta 10 μ M. Posee espículas formadas por glicoproteínas transmembrana F (proteína fusión), SH (pequeña proteína hidrofóbica, por sus siglas en inglés) y G (glicoproteína transmembrana) codificadas por el virus. La proteína matriz (M) no glicosilada une la nucleocápside con la envoltura lipídica. La nucleocápside está formada por el genoma viral y proteínas asociadas formando un complejo nucleoprotéico resistente a la actividad ARNasa (San Juan et al 2006), (Figura 1).

El genoma de VRS es un ARN de polaridad negativa monocatenario de aproximadamente 15,2 Kb que codifica para 10 ARNm (mensajero). El virion es envuelto de forma esférica o filamentosa con una nucleocápside helicoidal. Se replica en el citoplasma y trae consigo una ARN polimerasa dependiente de ARN. Estos ARNm tienen una caperuza (CAP por sus siglas en inglés) en el extremo 5' y una cola poliadenilada (cola poli-A) en el extremo 3'. Cada uno tiene un marco abierto de lectura (ORF) a excepción del que codifica para M2 que posee dos marcos de lectura separados que se superponen ligeramente y dan lugar a las proteínas M2-1 y M2-2. La maquinaria de traducción en el citoplasma reconoce la caperuza 3' y la cola poli-A de los ARN mensajeros. Para la transcripción el genoma tiene secuencias que actúan en cis que definen los marcos de lectura del gen, secuencia de inicio del gen (GS) y de terminación (GE). La ARN polimerasa dependiente de ARN reconoce la secuencia GS de inicio. La secuencia GE es el punto donde se libera el ARNm sintetizado y se añade la cola poli-A (Corzo-Lopez et al 2013).

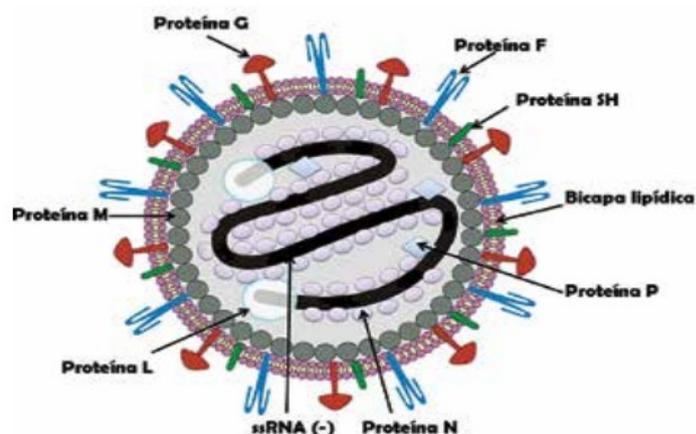


Figura 1.- Estructura de la partícula viral del Virus respiratorio sincicial (Avila et al 2013).L (polimerasa viral), F (proteína fusión), G (proteína de anclaje), SH (pequeña proteína hidrofóbica por sus siglas en inglés), P (fosfoproteína, por su sigla en inglés), N (nucleoproteína), M (proteína matriz).

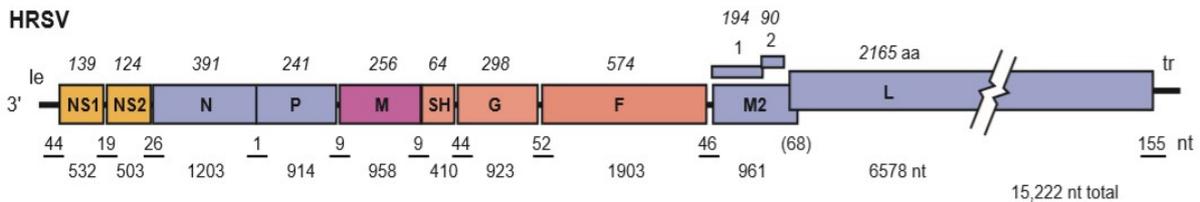


Figura 2- Esquema del orden de los genes del VRSh. Los genes codifican para diferentes proteínas no estructurales (NS1, NS2), de membrana (G, F, SH) e intracelulares (N, P, M, M2, L)

La glicoproteína G es una proteína transmembrana tipo II de adhesión de virus a la célula de 292-319 nt. Por sus propiedades de mucina (secreción de células epiteliales) media la adsorción del virus a la célula huésped a través de la unión de glicosaminoglicanos presentes en la membrana plasmática celular. Las moléculas de carbohidratos asociadas a la proteína G también contribuyen en la unión del virus a la célula. Además de su rol como proteína de adhesión la glicoproteína G contribuye en la evasión de la respuesta inmune del hospedero en su forma soluble (Ge) interfiriendo en la neutralización mediada por anticuerpos (Boyoglu-Barnum et al 2019).

La proteína transmembrana hidrofóbica SH de tipo II de 64 aa de función poco conocida, pero se sabe que interviene en la fusión celular junto con las glicoproteínas F y G formando un complejo oligomérico. Esta proteína está implicada en el bloqueo de la apoptosis dependiente de TNF α en las células infectadas, donde se acumula en diferentes formas algunas de ellas glicosiladas (Collins et al 2013).

La proteína de matriz M es monomérica, no glicosilada compuesta por 256 aa y forma la cara interna de la envoltura viral. Aparentemente esta proteína detiene la síntesis de ARN viral para la formación de la nucleocápside e interviene en el transporte hacia la membrana plasmática. Interactúa además con la proteína F y otros factores durante la morfogénesis (Corzo-Lopez et al 2013).

La proteína M2 parcialmente hidrofílica se encuentra con las proteínas L y P en los cuerpos de inclusión en las células infectadas por VRS. Tiene dos marcos abiertos de lectura (ORF, open reading frame por sus siglas en inglés) que se solapan en 32 nt y dan lugar a dos proteínas M2-1 y M2-2. La proteína de matriz M2-2 o factor regulador es la responsable de cambiar el complejo de la polimerasa de modo transcripción a modo replicación. Aunque su mecanismo no sea bien conocido aun, es necesario para la propagación del virus (Corzo-Lopez et al 2013).

El factor anti-terminación M2-1 es necesario para la eficacia en la transcripción. Disminuye el número de complejos de polimerasa que se separan del genoma facilitando la expresión de los genes que se encuentran en la región distal (Corzo-Lopez et al 2013). Se une a la ARN/nucleocápside con la proteína M en la superficie viral (Boyoglu-Barnum et al 2019).

Las proteínas no estructurales NS1 de 139 aa y NS2 de 124 aa son heterodímeros y participan en la replicación. Están implicadas en la evasión de la respuesta inmune del hospedero, en el control de la infección bloqueando la interacción de INF (interferón por sus siglas en inglés) tipo 1 (α y β). Estas proteínas se encuentran en abundancia en las células infectadas pero no así en los viriones maduros (Boyoglu-Barnum et al 2019).

La proteína P es muy fosforilada en los residuos serina. Es parte del complejo polimerasa y al unirse a la proteína N hace que se mantenga en su forma soluble disponible para el ensamblaje de la nucleocápside (Corzo-Lopez et al 2013). Con 214 aa forma parte del complejo ribonucleico.

Interactúa con las proteínas N y L , además de ser un co-factor esencial para la función de L (Boyoglu-Barnum et al 2019).

La proteína L es la subunidad principal de la ARN polimerasa dependiente de ARN. Relativamente hidrofóbica forma el complejo necesario para el funcionamiento de la polimerasa junto con las proteínas N y P (Corzo-Lopez et al 2013).

La proteína F, es una glicoproteína transmembrana de clase I altamente conservada en las cepas de VRS e induce la producción de anticuerpos neutralizantes. Además, media la unión del virión con las células que infecta y con otras células vecinas a través de las membranas celulares promoviendo la entrada del virus a las células y la formación de sincicios durante la propagación del virus. Esta proteína se fusiona independientemente de otras proteínas virales (Boyoglu-Barnum et al 2019).

Esta proteína de fusión se sintetiza como un precursor Fo que es procesado proteolíticamente para dar dos cadenas F1 y F2 unidas por puentes disulfuro. En el extremo N-terminal de la cadena F1 se encuentra una región hidrofóbica de fusión a la membrana de la célula blanco. A continuación del péptido de fusión se encuentra una la región heptádica (RH, heptados-repetidos) con dos regiones RHA y RHB. La cadena F1 es conservada en la Familia Pneumoviridae. Dos péptidos en esta cadena se han identificaron como HRSV-N57 y HRSV-C45 correspondientes a las regiones C y N terminales que forma una estructura estable de trímeros de heterodímeros (Zhao et al 2000).

Entre las proteínas F de diferentes cepas de VRSh hay una gran homología de secuencia y las de menor homología son la secuencia señal y la región citoplasmática. Se encuentran cinco regiones antigénicas de las cuales al menos cuatro poseen epitopes que son reconocidos por anticuerpos monoclonales neutralizantes, estos son los sitios II, IV, V y IV (Figura 3). Estos anticuerpos inhiben la fusión de las membranas virus-célula (Reyes et al, 2001).

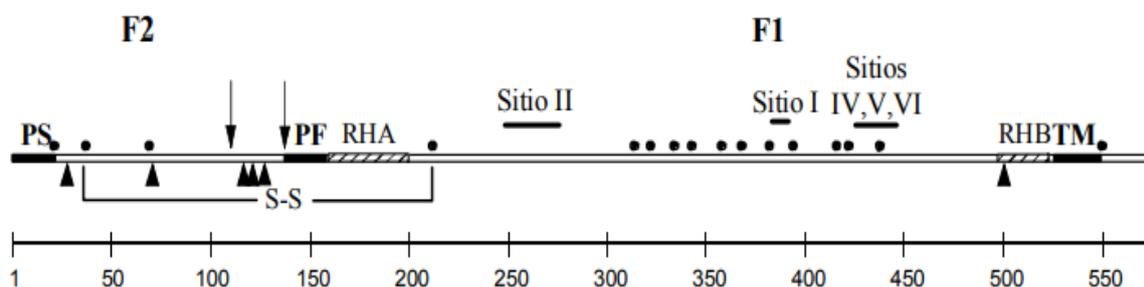


Figura 3.- Esquema de la estructura primaria de la proteína F de VRSh. Las regiones hidrofóbicas están pintadas en negro, donde se marca PS (péptido señal), PF (péptido de fusión) y TM (región transmembrana). Los sitios I a VI son los sitios antigénicos, RHA y RHB son los sitios heptádicos. Las flechas marcan los sitios proteolíticos entre las cadenas F1 y F2, S-S (puentes disulfuro). Los puntos negros representan los residuos de cisteína y los triángulos negros los posibles sitios de N-glicosilación) (Tomado de Reyes,2001).

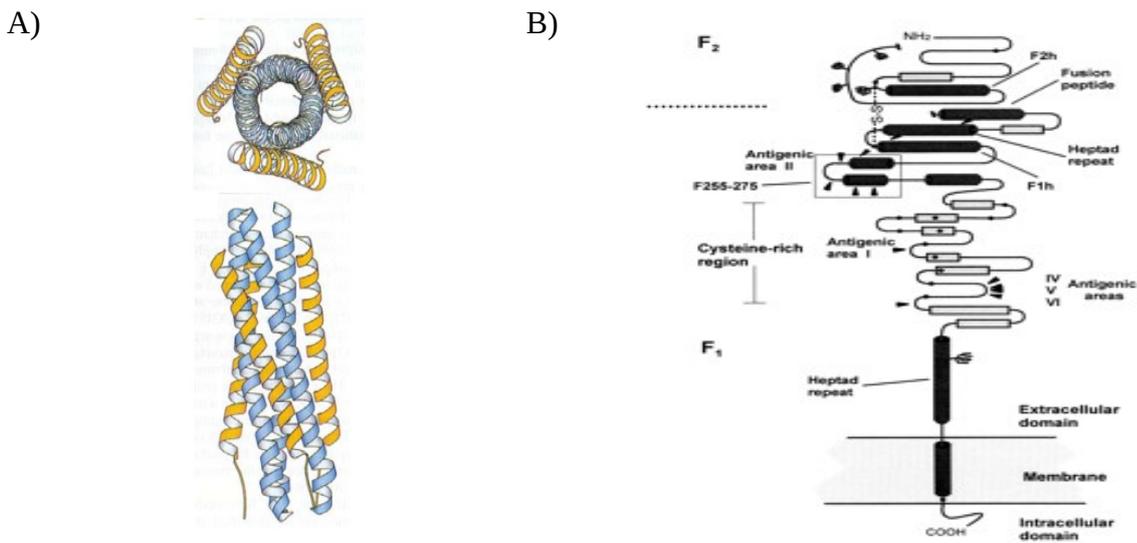


Figura 4.- A) Estructura cuaternaria del complejo formado por RHA (azul) y RHB (amarillo) de la proteína F de RSVh, con vista de arriba y vista lateral. Tomado de Zhao et al 2000; B) Esquema de la estructura secundaria de la proteína F (F1, F2). Tomado de Lopez et al, 1998.

1.2.3. GENOMA Y GRUPOS ANTIGÉNICOS.

Un estudio realizado por Mufson y colaboradores encontraron dos diferentes grupos antigénicos A y B en base a la reactividad con anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas del virus. (Mufson et al 1985) Estudios epidemiológicos posteriores a lo largo del tiempo y abarcando varias epidemias mostraron una co-circulación de ambos grupos con cierta alternancia en la aparición de los mismos. Estudios epidemiológicos en Bélgica durante 10 temporadas mostró una prevalencia del grupo antigénico A en 7 de 10 temporadas, pero esto no es representativo para el resto de los países. Puede haber una prevalencia de uno de los grupos antigénicos por varias temporadas, interrumpida por la prevalencia del otro no habiendo un ciclo establecido. Esto está determinado por los factores locales como ser la inmunidad que cada comunidad posea frente a ciertas cepas (Zlateva et al 2007). Estudios realizados en Finlandia durante un periodo de 10 años mostraron que la prevalencia variaba cada dos años. (Tan et al 2012). En países como Kenia y Estados Unidos se encontró una predominancia de VRSh-B luego de dos temporadas de prevalencia de VRSh-A. (Zlateva et al 2007). En Montevideo, Uruguay durante 17 temporadas (1985-2001) mostraron una predominancia de VRShA de 2 a 4 temporadas seguida por la predominancia de VRShB durante una temporada (Arbiza et al 2005).

Estos estudios son de gran importancia para poder hacer una predicción del subgrupo dominante para el desarrollo de un tratamiento más efectivo (Zlateva et al 2007).

Su diferencia entre los grupos antigénicos radica en la proteína G, en menor medida en las proteínas F, M y N (Mufson et al 1985). La diferencia entre ambos subgrupos tiene principal importancia clínica y epidemiológica, especialmente en lo referente a las proteínas F y G; aunque

las diferencias antigénicas también han sido reportadas dentro de las cepas de un mismo grupo antigénico.

Los epitopes de F están restringidos a unos pocos sitios antigénicos separados, mientras que para G existe varios epitopes que se superponen en su estructura. (Garcia-Barreno et al 1988). Otros estudios mostraron que la evolución de la proteína G dentro del grupo antigénico A esta dirigida por la presión inmune localizada en la segunda región hipervariable del ectodominio (Zlateva et al 2004).

En un estudio de genomas se clasificó al VRSh en diferentes genotipos dentro del grupo antigénico A. En base al análisis filogenético de 46 secuencias únicas del grupo antigénico A se construyó un árbol filogenético identificándose 5 clados dentro de los que se encuentran los genotipos GA1 a GA5. Para el grupo antigénico B los clados se construyeron en base a 21 secuencias representativas de cuatro clados GB1 a GB4. En total se identificaron 22 genotipos para A y 6 genotipos para B, (Figura 3) (Peret et al 1998).

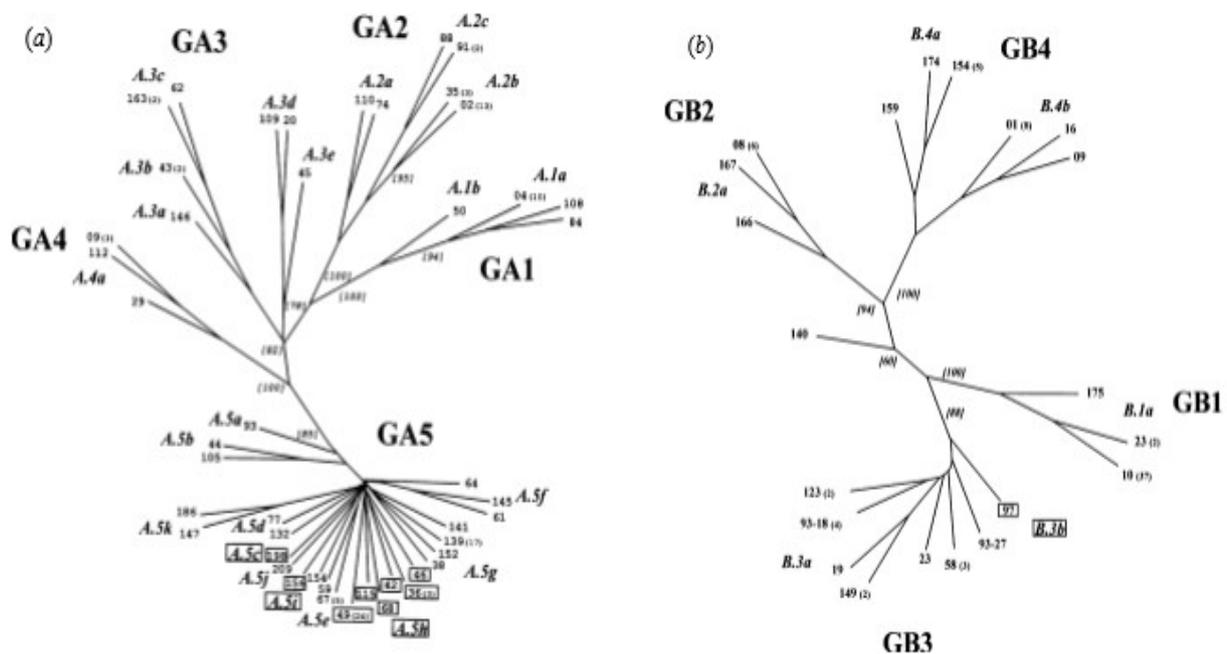


Figura 5. Árbol sin raíces de máxima parsimonia mostrando la relación entre los genotipos de A (a) y B (b). Tomado de Peret et al 1998.

Dentro del grupo A de VRS humano existen siete grupos bien reconocidos (GA1 a GA7), el ancestro común mas reciente del grupo A fue descrito en la década de los 40. Una de las mayores separaciones dio lugar a dos ramas. Una de ellas incluye a los genotipos GA1 y la otra da lugar a otras dos ramas, esto fue descrito en 1970. De estas dos ramas, una de estas dio lugar a los genotipos GA4 y GA5. Mientras que GA4 circulo por poco tiempo, siendo el GA5 el dominante hasta hoy. Los otras ramas diversificadas del grupo A dan lugar a GA2, GA3, GA6 y GA7. Esto nos dice que el mayor evento de ramificación ocurre solo en forma ocasional mientras que la diversificación en los genotipos ocurren con mas frecuencia (Trento et al, 2015). Esta lista ha crecido a 16 para VRS-A y 22 para VRS-B. Siendo los que mas circulan en el mundo para VRS-A los genotipos 1,2,5 y 7 (Griffith et al 2017).

La variabilidad antigénica de la proteína G entre y dentro de ambos grupos antigénicos facilitarían la reinfección evadiendo la inmunidad preexistente. Por esta razón es que niños infectados con VRSh-A pueden ser reinfectados con VRSh-B. Esto revelo una co-circulación de múltiples linajes durante una epidemia liderando algunos linajes y desapareciendo otros según la filogenia estudiada por Zlateva et al., 2005 . El aumento en la transmisión de ambos grupos antigénicos alrededor del mundo esta probablemente relacionado al crecimiento de la población mundial, urbanización y la modernización transporte (Zlateva et al 2005).

1.2.3.1 CICLO REPLICATIVO Y TRANSCRIPCIÓN

El ciclo replicativo comienza con la unión de la glicoproteínas G a los receptores en la membrana de la célula y la activación de la proteína F dispara la fusión de las membranas del virus y del huésped, con una duración del ciclo entre 16 a 20 horas (Collins et al 2013; San Juan et al 2006.) La glicoproteína viral G se acopla a la célula contribuyendo a la patogénesis y modula la inmunidad del hospedero mediante la interacción con el receptor humano CX3CR1 (Fedechkin et al 2020).

El sitio de la proteína G que se une al receptor CX3CR1 es el sitio CX3CL1 (fractalquina, con actividad quimiotáctica) (Diaz et al 2017). En la célula huésped son liberadas la polimerasa L, P y M-2 y el ARN viral de sentido negativo asociada a la proteína N (Muniyandi et al 2018).

La transcripción primaria es mediada por la polimerasa traída con el genoma viral, estas se suceden generando las proteínas estructurales y no estructurales que modifican en el hospedero el ambiente para facilitar su multiplicación. En una etapa tardía el genoma viral es copiado a anti-genoma de sentido positivo cambiando la actividad de la polimerasa. La polimerasa replicante ignora las señales de inicio y finalización en los genes para sintetizar una copia complementaria del genoma que es envuelta en la proteína N para formar el complejo nucleoprotéico (Muniyandi et al 2018).

La unión de la proteína N al ARN viral que forma la nucleocápside además recluta el resto de las proteínas asociadas. Una vez ensamblada se contacta con la proteína M en la membrana plasmática. Las proteínas F, G y SH que se acumulan en el sitio de ensamblaje. Para finalizar, la gemación se produce en la zona apical de las células epiteliales bronquiales (Collins et al 2013; San Juan et al 2006).

La observación de sincicios se debe a la expresión en superficie de glucoproteínas víricas que inducen la fusión de las membranas de las células cercanas (Galán-Sánchez 2014).

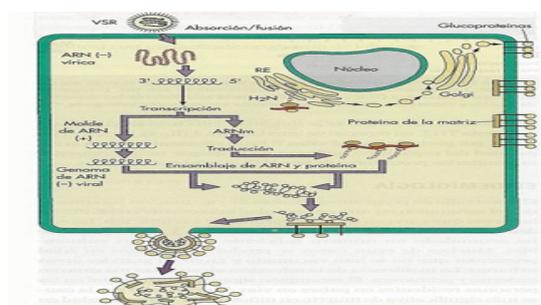


Figura 6.- Ciclo replicativo del virus respiratorio sincicial (Murray et al 2009).

1.3 VACUNAS

La primera vacuna desarrollada fue en 1960, una versión inactivada del virus con formalina. Le siguió en 1966 la administración de IgG policlonales humanas bajo el nombre de RespiGam® aprobada por la FDA. Si bien no es una vacuna se trata de un tratamiento el cual era inoculado a niños infectados. Era indicada para niños prematuros y aquellos con displasia broncopulmonar, sin embargo no tuvo resultados favorables en cuanto a disminuir la hospitalización, además de presentar efectos adversos en aquellos con cardiopatía cianótica. Su administración exacerbaba la inflamación alrededor de un 80% de los pacientes tratados y provocó muertes en los niños inmunizados. Por la ineficacia en la administración de anticuerpos policlonales fue que se comenzó a administrar anticuerpos monoclonales humanizados como ser el Palivizumab. Otro intento fueron las vacunas vivas intranasales más inmunogénicas, que no incrementan la enfermedad y proveen una barrera de protección (en comparación con la vacuna inactivada). Este tratamiento se desarrolló por método de atenuación que resultó no ser tan efectivo por estar demasiado atenuada o ser muy reactivo, apareciendo además alguna mutación inestable. Otras vacunas que se probaron fueron: péptidos virales, antígenos recombinantes, vectores en virus vaccinia recombinantes defectivos en su replicación, vacunas quiméricas recombinantes de glicoproteínas G y F, vacunas de subunidades que incluyen glicoproteínas G y F (Corzo-Lopez et al 2013). El desarrollo de vacunas efectivas se ha encontrado con grandes obstáculos como la inmadurez del sistema inmune en los lactantes. Una de las estrategias desarrolladas para una vacuna atenuada más segura es a través de la genética reversa de VRS atenuado. Mediante este método se introducen mutaciones puntuales que producen un nivel de atenuación más controlado y una inogenicidad suficiente. Últimamente las Investigaciones se están enfocando en la respuesta del hospedero al VRS en vez de enfocarse en el virus como blanco (Kerry et al 2010).

Aunque la evidencia clínica y experimental dice que la respuesta inmune del hospedero es quien resuelve la infección no se conocen con certeza los mecanismos responsables. Esto sumado al hecho de que no se desarrolla una inmunidad completa contra este virus es lo que ha dificultado el desarrollo de una vacuna o tratamiento efectivo (San Juan et al 2006).

1.4 ANTIVIRALES

1.4.1 APROBADOS PARA TRATAMIENTO CONTRA VRS.

Muchos de los ensayos para la búsqueda de una vacuna tienen a la glicoproteína F de VRS como antígeno, ya que fue demostrado que F es un objetivo para anticuerpos neutralizantes siendo la única proteína de superficie viral que es requerida para el ingreso a la célula huésped (Jones et al 2019).

El palivizumab es comercializado como Synagis®, un anticuerpo monoclonal humanizado recombinado compuesto en un 95% por secuencias de anticuerpo humano y 5% murino dirigido contra al sitio antigénico A (RHA), un dominio conservado de la proteína de fusión F del virus que

tiene un efecto neutralizante contra ambas cepas A y B (AAP, 2014).

Los primeros estudios sobre el tratamiento de palivizumab fueron realizados entre 1996 y 1997, donde se comprobó una baja en el tiempo de hospitalización en los niños con infecciones. Este estudio realizado en lactantes de alto riesgo mostró una tasa de reducción en la hospitalización del 10,6% a 4,8% entre los que recibieron una profilaxis con palivizumab, constatando una reducción del 55% en comparación con los que recibieron un placebo (Elhalik et al 2019). Este tratamiento profiláctico fue aprobado por la FDA en el año 1998 y recomendado por la Academia Americana de Pediatría (AAP, 2014). Utilizado para la prevención de las IRAB provocadas por VRSh en pacientes pediátricos de alto riesgo, incluyendo a los nacidos con menos de 35 semanas. Para el año 2014 se dieron a conocer nuevas restricciones de las recomendaciones de la AAP. Se recomendó su uso solo para aquellos niños nacidos con menos de 29 semanas y hasta 12 meses durante el inicio de la temporada de VRSh (Cutrera et al 2019).

Sin embargo las variaciones aminoacídicas en el sitio A (RHA) de la proteína F provocan resistencia a la neutralización por este medicamento haciendo que el sistema inmune actúe en forma parcial provocando reinfecciones (Corzo-Lopez et al 2013).

En nuestro país el Fondo Nacional de Recursos es quien proporciona este medicamento de alto costo. Los candidatos son niños menores de 1 año con cardiopatías congénitas que presenten insuficiencia cardíaca en tratamiento o hipertensión pulmonar moderada o grave, que posean una edad gestacional de 28 semanas o menos. Menores de 2 años con enfermedad crónica pulmonar que hayan sido tratados con oxígeno, broncodilatadores, diuréticos o corticoides durante los 6 meses anteriores a el establecimiento de la ultima epidemia de este virus (FNR, 2006).

Este tratamiento ha demostrado una baja en los tiempos de internación pero no ha incidido en la baja de la mortalidad y ha contribuido a la aparición de cepas resistentes (Corzo-Lopez et al 2013).

Sin embargo, un 70% de los niños hospitalizados en Estados Unidos por VRSh nacidos a termino que no posean factores de riesgo no son candidatos al uso de este tratamiento (Kerry et al 2010).

La ribavirina es un análogo sintético de la guanosina e inosina que interfiere en la expresión del ARN mensajero e inhibe la síntesis de proteínas virales y es administrado en forma de aerosol. Es una droga aprobada por la FDA para el tratamiento de VRSh. En la década de los 80' era el único antiviral utilizado para combatir la bronquiolitis por VRSh. Mientras que en 1983 la Asociación Americana de Pediatría recomendaba su uso, solo en 1996 cambia esta recomendación a solamente considerar su uso en casos restringidos a aquellos cuadros graves (Sanchez-Solis et al 1997). Es un potente antiviral capaz de inhibir la transcripción del VRS, la expresión de glicoproteínas (receptores celulares de superficie), la formación de sincicios y la liberación de viriones (Zhang, 2002). Por lo tanto, se ha demostrado que la ribavirina afecta en diferentes puntos la replicación de este virus, ya sea en número y tamaño de las placas como el título viral y la producción del virus intracelular (Hruska, 1980).

Sin embargo, estudios en pediatría evalúan su uso limitado en pacientes con complicaciones severas, como aquellos que requieren ventilación mecánica, inmunocomprometidos o enfermedad cardiopulmonar hemodinámica. En pacientes adultos este tratamiento disminuye la mortalidad así como el título viral. En un estudio realizado por Hoover et al 2018 no se encontró una incidencia significativa en las sibilancias recurrentes posterior al uso de la ribavirina. Sin embargo la ribavirina causa efectos secundarios como brocoesposmos, dolor de pecho, conjuntivitis, erupción

y disnea. Además de ser teratogénico y no ser apto para embarazadas, su alto costo así como la necesidad de personal especializado en administrar este antiviral en forma de aerosol dificulta su administración. Tampoco se encontró una relación en la baja de la mortalidad. Por estas razones es importante limitar su uso en pacientes con altos riesgos de mortalidad y morbilidad causado por VRS, desaconsejando su uso rutinario (Hoover et al 2018).

El Motavizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado de segunda generación desarrollado a partir del Palivizumab. Tiene la capacidad de neutralizar el virus por su alta afinidad a la proteína de fusión F del virus. Demostró tener mayor capacidad para bajar la carga viral y combatir el virus en las vías respiratorias bajas en contraste con el Palivizumab que posee una capacidad menor. Mostró una baja del 26% en las hospitalizaciones y un 50% en la incidencia en las infecciones de las vías respiratorias bajas. Actualmente se encuentra pendiente de aprobación por la FDA (Kerry et al 2010).

1.4.2 AGENTES VIRUCIDAS. FORMULACIONES PARA LA HIGIENE DE MANOS

Muchos virus patógenos pueden seguir viables en las manos humanas durante horas, dándoles el potencial de propagarse. Por lo cual, la debida desinfección de manos contribuye a la prevención y control de brotes hospitalarios. Sin embargo los desinfectantes de mano son probados solamente contra bacterias vegetativas y no para infecciones virales.

Para ello se hicieron pruebas con una nueva formulación de etanol (55%) con 10% de propanol-1-, 5.9% de propandiol-1.2, 5.7% de butandiol-1.3 y 0.7% de ácido fosfórico. Esta formulación probó tener actividad virucida y reducir el título en siete virus envueltos entre ellos VRS y cuatro virus no envueltos, tras su uso por 30 segundos (Kramer et al, 2006).

La OMS (Organización Mundial de la Salud) presentó dos formulaciones a base de alcohol (I y II) para uso sanitario e infecciones asociadas a brotes, usando en el lavado de manos para reducir la transmisión de infecciones. Estas formulaciones fueron probadas como agentes virucidas inactivando a los virus zika, ébola y coronavirus durante un tiempo de exposición de 30 segundos. Estos resultados confirman su uso para virus envueltos. La formulación II a base de isopropanol demostró una mayor actividad virucida contra virus envueltos en comparación con la formulación I a base de etanol (Siddharta et al, 2017).

Otro de los estudios realizados para comprobar la efectividad de dos productos de uso para la desinfección de manos en un ambiente hospitalario se basa en dos soluciones. Estas son fabricadas por Anios (Lille-Hellemes, Francia). Una de ellas se utiliza en el lavado de manos, Anios Rub, un compuesto de etanol al 70% y la otra un desinfectante de superficies, Surfa'Sa, a base de amonio cuaternario (didecil dimetilamonio). La primera fue probada durante un periodo de tiempo de 0 a 60 segundos, la segunda el tiempo se extendió hasta una hora. Ambos productos son listos para usar comprobándose ser capaces de inactivar el virus respiratorio sincicial (Thevenin et al, 2011)

1.4.3 POTENCIALES ANTIVIRALES CONTRA VRS

Actualmente no existe una vacuna disponible para el tratamiento del VRSh. El desarrollo de antivirales requiere del entendimiento de los mecanismos de infección relacionados con la interacción del virus-huésped, en la fusión de estos y la entrada del material genético a la célula. Sin embargo, se encuentran en estudio varios candidatos con posible actividad antiviral o virucida, así como compuestos químicos de uso en nosocomios.

Arginina

Los productos naturales a diferencia de los sintéticos presentan menos efectos secundarios en términos de toxicidad. La arginina es un compuesto con actividad antiviral y virucida con aplicación biofarmacéutica además de ser un desinfectante de mucosas y piel. A pesar de tener cierto grado de citotoxicidad como antiviral su acción hacia las células infectadas provoca la muerte de estas. Sin embargo su actividad como inhibidor viral aun esta por probarse (Arakawa et al, 2009).

Ácido hialurónico (AH)

Un estudio *in vitro* de ácido hialurónico de alto peso molecular presentó un amplio espectro para interferir en la replicación viral, entre ellos al VRS. Como resultado de este estudio no demostró tener actividad virucida pero si una actividad antiinflamatoria que contrarresta la replicación y propagación viral del virus in vivo. Sin embargo, aun se esta estudiando su actividad antiviral (Cermelli et al, 2011).

Ácido sekikaico

Del extracto del liquen nigeriano *Ramalina farinácea*, el ácido sekikaico mostró una actividad inhibitoria contra el VRS. Este compuesto actúa interfiriendo en la replicación viral posteriormente a la entrada del virus, demostrando ser un candidato como agente terapéutico natural (Lai et al, 2013).

Hexoral

El Hexoral es una solución al 0,1% y en spray al 0,2% de uso local de venta libre en farmacias. Contiene hexitidina un componente que actúa como supresor de la actividad infecciosa *in vitro* de virus del tracto respiratorio humano; virus de la gripe, VRS y HSV-1 / L2, herpes virus Su uso es como agente antimicrobiano y antifúngico de la cavidad oral de uso tópico o en aerosol. Un estudio sobre la posible actividad antiviral de hexitidina se encontró que posee una actividad antiviral estable en concentraciones no toxicas, reduciendo a 100 veces o mas las propiedades infecciosas del virus respiratorio sincicial como de otros virus (Deryabin et al, 2016).

PC786

Es una pequeña molécula no nucleósido de la proteína polimerasa L de VRS. Se presenta capaz de inhibir la actividad de la ARN polimerasa dependiente de ARN de VRS. In vitro inhibe el efecto

citopático en células Hep-2 sin demostrar citotoxicidad. El PC786 demostró poseer mayor potencial antiviral contra VRS-A que contra VRS-B en dosificación intransitivo in vivo administrado una vez al día reduciendo la carga viral a niveles no detectables en homogeneizado de pulmón de ratones y ratas algodóneras infectadas con VRS. Siendo este un prometedor candidato para el tratamiento en humanos, el cual se encuentra en fase de desarrollo para pasar a la fase clínica (Meals et al, 2017).

GS-5806.

Es una pequeña molécula que administrada a una concentración nanomolar vía oral impide la fusión de la membrana del virus con la del huésped. Estudios realizados en adultos de entre 18 a 45 años infectados clínicamente con VRSh mostró una reducción en la carga viral así como en las manifestaciones clínicas a partir de la primera dosis. La baja en la carga viral esta directamente asociado al tiempo de hospitalización por lo cual hace mas efectiva la recuperación (De Vincenzo et al 2014). Durante la fase 1 demostró la baja en la concentración viral por lo que entro en fase 2 con pacientes adultos hospitalizados y trasplantados de pulmón (Ison, 2017).

ALS-008176

Es una prodroga oral del inhibidor de replicación ALS-008112, un análogo del nucleósido citidina que actúa inhibiendo la replicación viral por terminación de cadena. Estudios realizados en adultos infectados clínicamente con VRSh demostró una baja en la carga viral y en la sintomatología, tampoco demostró efectos adversos. In vitro no se observaron resistencias a esta droga. A diferencia de otros tratamientos que inhiben la infección este actúa sobre células infectadas y protege de infección a las células vecinas (DeVincenzo et al 2015).

Molécula 28a

La molécula 28a es producto de la búsqueda y desarrollo de antivirales que tienen como objetivo los factores del hospedero implicados en la reproducción viral. Esta es producto de la identificación de dos inhibidores de de alto rendimiento llamados 2 y 3. Estos poseen actividad antiviral de amplio espectro en la familia *Pneumoviridae*, influenza A, parainfluenza humana tipo 3, sarampión. De las series 2 y 3 encontradas se sintetizaron un set de análogos, del cual 28a corresponde a 3. Una vez demostrada la actividad antiviral se procedió a estudiar la estabilidad metabólica. Resultando tener una estabilidad en la fracción S9 del hígado con una vida media de 165 minutos.

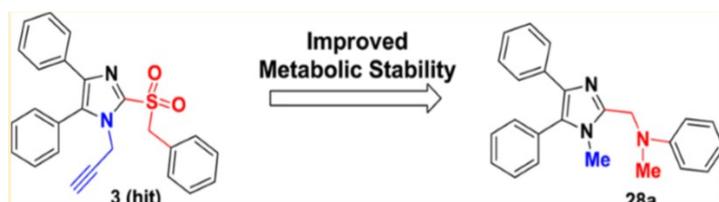


Figura 7 - Estructuras de las moléculas 3 (hit) y molécula análoga 28a. Tomado de Moore et al 2013; Moore et al 2013, Supporting information.

2. OBJETIVOS

2.1 GENERAL

- . Determinar la capacidad virucida contra virus respiratorio sincicial humano de moléculas de síntesis derivadas de una molécula prototipo llamada 28a.

2.2 ESPECÍFICOS

- . Propagación de diferentes cepas de VRSh en cultivo de células Hep-2
- . Confirmación por PCR de la propagación viral en cultivos
- . Titulación de los virus propagados
- . Evaluación de la citotoxicidad de 35 moléculas de síntesis derivadas de la molécula prototipo
- . Determinación de los valores de la Concentracion Citotoxica 50%
- . Estudio de la actividad virucida de las moléculas en sus concentraciones no citotóxicas enfrentándolas a la cepa Long de referencia.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LINEAS CELULARES

Para la realización de todos los ensayos se utilizó la línea celular continua HEp-2, células neoplásicas humana disponibles en el laboratorio. Para el crecimiento y propagación se utilizó medio de cultivo esencial mínimo con sales de Earle (MEM-E) a los que se le adicionó glutamina (1%) antibióticos (estreptomicina y penicilina, 1%) y suero fetal bovino (SFB) al 10%. El medio de infección y mantenimiento fue MEM-E adicionado con glutamina (1%) antibióticos (estreptomicina y penicilina, 1%) y suero fetal bovino (SFB) 0% para la infección y 2% para el mantenimiento. La incubación se realizó estufa con saturación de 5% de CO₂ a 37°C (condiciones estándar de cultivo).

3.2 VIRUS

Fueron utilizados cepas de los grupos antigénicos A y B del virus respiratorio sincicial disponibles en el laboratorio .

Grupo A : Long, NH402, NH407, 98B/701,94N/230

Grupo B: CH 18537

3.3 PRODUCCIÓN DE STOCK VIRALES EN CULTIVOS CELULARES.

Los stock virales se obtuvieron de la siguiente forma. En 2 placas de 10mm con medio de cultivo MEM-E de crecimiento se sembraron células HEp-2 hasta obtener un 80% de confluencia. Se les quito el medio de cultivo y se lavó con 2 ml de PBS dos veces. Se infectaron las monocapas con diferentes diluciones de virus en medio MEM-E 0% de SFB a partir de semillas sin titular (Tabla 1) y se dejó adsorber por 1 hora en estufa a 37°C y 5% de saturación de CO₂ agitándose suavemente la placa cada 15 minutos. Pasado este tiempo se quitó el inoculo y se agregó 10mL de medio de infección e incubó en estufa en las mismas condiciones. Como control negativo se utilizó la misma línea celular sin infectar con medio de infección. A las 48, 72 horas se observó buscando la aparición de efecto citopático característico. Se recogió el volumen total de la placa y se alicuotó en volúmenes de 500 µL en viales para su conservación a -80°C en freezer.

Cepa (VRS-A)	Dilución
NH402	1:3
NH407	1:3
98B/701	1:2
94B/230	1:2

Tabla 1.- Cepas del grupo antigénico A de VRS utilizadas para generar stock en las correspondientes diluciones.

3.4 EXTRACCIÓN DE ARN

Se realizó la extracción de ARN total por método de Trizol a partir de un cultivo de células HEp-2 infectadas siguiendo el protocolo que se describe a continuación. Se recogieron 200µL de la monocapa infectada y se centrifugó por 10 minutos a 1200 revoluciones por minuto (rpm). Se descartó el sobrenadante, se agregó 200 µL de Trizol Se resuspendió el pellet e incubó con por 5 minutos a temperatura ambiente y agregó 300 µL de cloroformo ppa , se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente y centrifugó por 15 minutos a 13400 rpm. Se recogió la fase superior y se precipitó con 500µL de isopropanol ppa por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 13400 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol 75% sin resuspender. Se centrifugó por 2 minutos a 13400 rpm y retiró el sobrenadante. El pellet se secó en estufa a 37°C por 30 minutos aproximadamente. Se resuspendió en agua libre de ADNasas y ARNasas previamente calentada en estufa por 15 minutos a 37°C.

3.4.1 RT-PCR

A partir del ARN extraído se amplificó un fragmento que codifica para la proteína viral N del VRSh. Se utilizó RevertAid™ Reverse Transcriptase para la transcripción inversa siguiendo las especificaciones del fabricante. Se incubaron 7µL de ARN extraído con 2µL de primer N2 10µM y 3,5µL de agua por 5 minutos a 65°C y 2 minutos a 0°C. Para un volumen final de 20 µL se le agregaron 4µL de buffer de reacción 5X, 2µL de dNTP's 10mM, 0,5 µL de agua (calidad biológica molecular). Se incubó por 2 minutos a 42°C y se agregó 1µl de transcriptasa reversa (200 U/µL). La mezcla se incubó por 50 minutos a 42°C y 15 minutos a 15°C. La PCR se realizó en un volumen final de 50µL en la que se colocó 2 µL de ADNc (producto obtenido en la RT) a una mezcla de 36,5 µL de agua (calidad biológica molecular), 5µL de Buffer de reaccion10X, 3 µL de MgCl₂ 25mM, 1µl de dNTP, 1µl primer N1, 1µl de primer N2 y 0,5 µL de taq ADN polimerasa. Con un ciclo de 2 minutos a 94°C, 25 ciclos de 94°C por 45 segundos, 54°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos, un ciclo de 72°C por 5 minutos y 4°C por 1 minuto. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR (Invitrogen) corrido a 100V por 30 minutos y visualizado con luz ultravioleta.

Primer	Secuencia
N1	5'GGAACAAGTTGTTGAGGTTTATGAATATGC 3'
N2	5'CTTCTGCTGTCAAGTCTAGTACACTGTAGT 3'

Tabla 2.- Secuencias de los primers N1 y N2 utilizados para amplificar un segmento de la nucleoproteína N del VRS (Pizzorno, et al 2010),

3.5 TITULACIÓN DE VIRUS. CÁLCULO DE LA DOSIS INFECTANTE DE CULTIVO DE TEJIDOS 50% (DICT₅₀)

Para cuantificar el stock de virus se calculó el título como se describe en el siguiente protocolo. Se sembraron en una placa de 96 pocillos $1,5 \times 10^4$ células HEp-2 por pocillo en un volumen de 100 μ L en medio de crecimiento celular MEM- E en estufa a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 hs. Pasado este tiempo se prepararon diluciones seriadas del virus a titular desde 10^{-1} a 10^{-7} y 10^{-2} a 10^{-10} en medio MEM-E (0% SFB). Se quitó el medio de crecimiento de células y se inoculó 50 μ L de las diferentes diluciones de virus por pocillo (7 pocillos/dilución) sobre la monocapa. Se incubó por 2 horas a 37°C y 5% de CO₂ agitando suavemente la placa cada 15 minutos. Se retiró el inoculo y se agregó 200 μ L de medio MEM con 2% de SFB. Se incubó 5 días en estufa a 37°C con 5% de CO₂. Se incluyeron los controles sin infectar en 3 pocillos y controles de infección de virus sin dilución en 3 pocillos en la misma placa. Cada día se observaron las infecciones bajo microscopio óptico invertido buscando la ausencia o presencia de efecto citopático (Field et al 1990).

Para algunos ensayos se realizó una tinción con cristal violeta siguiendo el siguiente protocolo. Se descartó el medio de cultivo y se incubó con una dilución de solución stock Cristal Violeta 1%, 100 μ L/pocillo (ver Anexo III) durante 15-20 minutos a temperatura ambiente. Se lavó la placa con agua por inmersión hasta quitar el exceso de Cristal Violeta dejando secar la placa a temperatura ambiente (Sun et al 2016).

Se determinó la DICT₅₀ por el método Reed and Muench (Reed et al 1938).

3.6. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LAS MOLÉCULAS DERIVADAS DE 28a POR EL ENSAYO DE ROJO NEUTRO.

Se probaron 35 compuestos de síntesis derivados de una molécula prototipo llamada 28 a (Moore et al. 2013), diseñadas en el Laboratorio de moléculas bioactivas CENUR-Litoral Norte.

La estructura de las moléculas se muestran en el Anexo I.

Cada molécula que se probó fue resuspendida en una cantidad suficiente de dimetil sulfoxido (DMSO) para obtener una concentración inicial de 50mM, las que se almacenaron protegidas de la luz a 4°C, Anexo II.

Para evaluar la citotoxicidad de cada molécula se siguió el siguiente protocolo. En una placa de 96 pocillos se sembraron $1,5 \times 10^4$ células HEp-2 por pocillo en 100 μ L de medio MEM-E de

crecimiento y se incubó en estufa a 37°C y 5% de CO₂ por 24 horas. Por otro lado se preparó un placa de dilución de 96 pocillos. Donde se colocaron 100µL de medio MEM-E adicionado con 5% de SFB y 1% de DMSO por pocillo excepto en los pocillos donde se colocó la molécula a probar en la concentración inicial de 200µM (Figura 8).

En 3 pocillos de las columnas H y D para cada molécula se colocaron 200µL/pocillo de la molécula en una concentración de 200 µM. A partir de los pocillos de esas columnas se pasaron 100 µL a las siguientes tres columnas diluyendo el compuesto a la mitad a la vez. Obteniéndose así las concentraciones 200, 100, 50, 25 µM. Por otro lado, a la placa de células se le quitó el medio de crecimiento y se le agregó en todos los pocillos 100µL de medio MEM-E adicionado con 5% SFB y 1% de dimetil sulfoxido, en los pocillos control se le agregó un volumen de 200µL. Se pasó desde de la placa de dilucion 100 µL al respectivo pocillo en la placa de células donde las concentraciones de las moléculas pasaron a ser 100, 50, 25 y 12,5 µM. Se incubó la placa de células en estufa a 37°C y 5% de CO₂ por 72 horas (Figura 8).

Pasado este tiempo se procedió al revelado. Se descartó el sobrenadante de todos los pocillos y el control. Se preparó una dilucion (1:100) de la solución de stock de rojo neutro (40µg/mL) en medio MEM con 5% de SFB y se agregó un volumen de 150µL por pocillo e incubó por 2 horas en estufa a 37°C y 5% de CO₂. Pasado ese tiempo se quitó y agregó 150µL por pocillo de solución de extracción de rojo neutro y se llevó a un agitador a velocidad baja por 15 minutos. Luego se transfirió el sobrenadante a una placa de 96 pocillos limpia para la lectura de la densidad óptica (DO) a 540nm en un espectrofotómetro. El ensayo se realizó en tres replicas. (Repetto et al 2008; Arencibia et al 2003, Anexo IV).

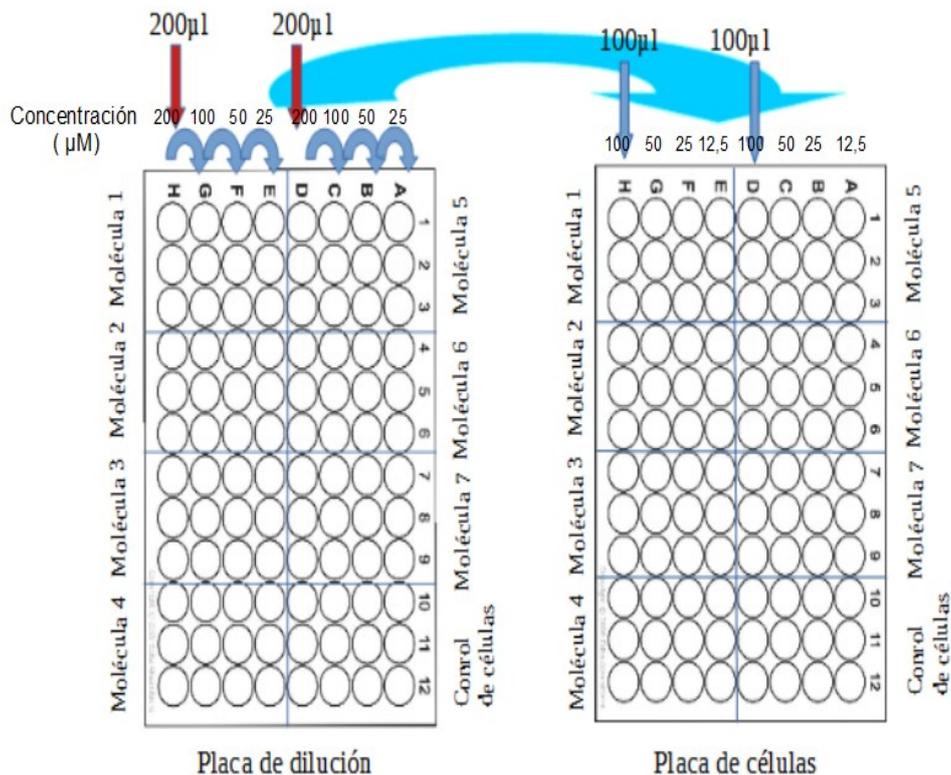


Figura 8.- Diseño de placa de dilución para ensayo de citotoxicidad de rojo neutro, la placa de células se diseño de la misma forma. En la placa de dilución se señala con flecha roja los pocillos donde son puestas las moléculas a probar en su concentración inicial (pocillos H y D).

3.7 EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LA RIBAVIRINA

En la evaluación de la citotoxicidad de la ribavirina se realizó sembrando en una placa de 96 pocillos $1,5 \times 10^4$ células Hep-2 por pocillo en 100 μ L de medio MEM-E de crecimiento e incubándose en estufa a 37°C y 5% de CO₂ por 24 horas.

En una placa de dilución de 96 se realizaron diluciones seriadas al igual que como se hizo con las moléculas. Se partió de un stock de ribavirina de 10mM. En la primera columna de la placa, se realizó una dilución de la ribavirina para que la concentración fuera de 80 μ M en 200 μ L. Se realizó la dilución seriada pasando 100 μ L a los siguientes 3 pocillos conteniendo 100 μ L de medio MEM-E adicionado con 5% de SFB y 1% de DMSO resultando una gradiente de diluciones de 80, 40, 20 y 10 μ M.

A la placa de células se le descartó el medio de crecimiento y se le agregó en todos los pocillos 100 μ L de medio MEM-E adicionado con 5% SFB y 1% de DMSO Y 200 μ L, en los pocillos control. Se transfirieron 100 μ L de las diluciones hechas en la placa de dilución de modo de diluir a la mitad la concentración de la ribavirina. Se obtuvieron concentraciones 40, 20, 10 y 5 μ M. Se incubó la placa de células en estufa a 37°C y 5% de CO₂ por 72 horas.

Pasado este tiempo se procedió a la tinción con cristal violeta utilizando la Solución de trabajo Cristal Violeta (ver Anexo III), se agregó un volumen de 150 μ L por pocillo e incubó por 2 horas en estufa a 37°C y 5% de CO₂. Luego se transfirió el sobrenadante a una placa de 96 pocillos con fondo en U para la lectura de la densidad óptica (DO) a 570nm en un espectrofotómetro. El ensayo se realizó en tres replicas en la misma placa, con control de células sin tinción por triplicado.

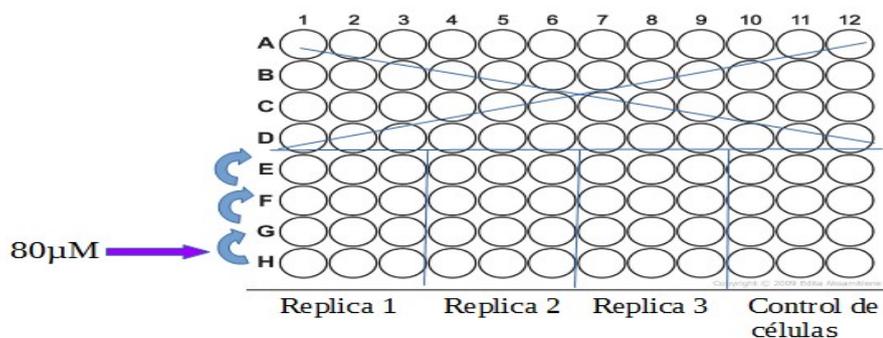


Figura 9.- Diseño de placa de dilución para ensayo de citotoxicidad de la ribavirina método Cristal Violeta. En la placa de dilución se señala con flecha violeta el pocillo donde se puso la concentración inicial (pocillo H).

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE CITOTOXICIDAD Y MCNC DE LAS MOLÉCULAS Y LA RIBAVIRINA.

El cálculo de la concentración citotóxica 50% (CC₅₀) se hizo utilizando el programa GraphPad Prism 5 y un análisis de regresión no lineal de la curva sigmoideal concentración-respuesta,

variable slope. El cálculo de la máxima concentración no citotóxica (MCNC) de las moléculas se realizó en base a los resultados obtenidos de $CC_{50\%}$ utilizando el programa GraphPad Prism 5.

3.9 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LA RIBAVIRINA CONTRA VRS

Se enfrentó la ribavirina con la cepa de referencia Long de virus respiratorio sincicial utilizando el stock producido y titulado en este trabajo. El título viral estaba determinado como $10^{8,8}$ DICT₅₀/mL.

Monocapas de células HEp-2 ($1,5 \times 10^4$ células por pocillo) en una placa de 96 pocillos se infectaron con la cepa Long en diluciones seriadas desde 10^{-3} a 10^{-14} . En cada dilución se adicionó un volumen de 50 μ L medio de cultivo MEM 0% SFB junto con ribavirina en su MCNC, realizándose esto por duplicado. Como control del ensayo se incluyeron pocillos de células sin infectar y sin ribavirina, así como pocillos de control de infección sin ribavirina, en medio MEM-E adicionado con 2% de SFB incubado por 1 hora en estufa a 37°C y 5% de saturación de CO₂. Luego se quitó el inoculo y se agregó a todos los pocillos 200 μ L de medio MEM-E adicionado con 2% SFB. Se incubó en estufa en las mismas condiciones antes descritas por 72 horas. La evaluación de la actividad de la ribavirina se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta.

3.10 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD VIRUCIDA DE LAS MOLÉCULAS SELECCIONADAS POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Para este ensayo se sembró en una placa de 96 pocillo $1,5 \times 10^4$ células HEp-2 en 100 μ L de medio de crecimiento MEM-E incubándose durante 24 horas en estufa a 37°C y 5% de CO₂.

En una placa de dilución se hicieron diluciones de los virus titulados 10^{-8} a 10^{-11} en medio MEM-E 0% SFB en un volumen final de 50 μ L/pocillo, las cuales se enfrentaron a: 1) 50 μ L de las moléculas a probar en su MCNC y 2) con Ribavirina en su MCNC. Se incubó en estufa por una hora.

Posteriormente se quitó el medio de cultivo de crecimiento de la placa de células y se enfrentó por duplicado con las mezclas 1 y 2. Los controles utilizados fueron: control de células sin infectar, control de virus sin dilución, control de virus en las diluciones 10^{-8} a 10^{-11} . La placa se incubó durante una hora en estufa en condiciones estándar de cultivo. Posteriormente se descartaron los inóculos y se adicionaron 200 μ L por pocillo de medio de crecimiento MEM-E con 2% de SFB y se incubó en estufa en las mismas condiciones durante 72 horas. El resultado se analizó por inmunofluorescencia indirecta. (De Burghgraeve et al 2012; Kaptein et al 2010; Thevenin et al 2011; Lundin et al 2012).

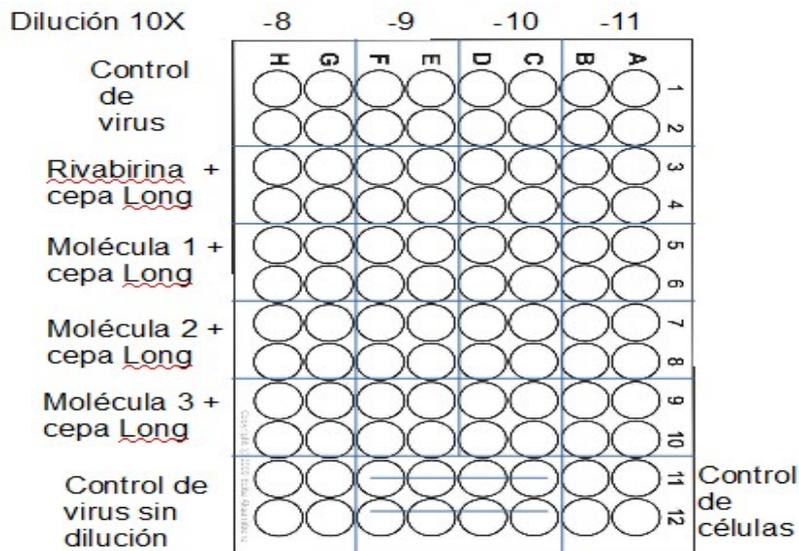


Figura 10.- Diseño de placa para el análisis de tres moléculas, actividad antiviral de la ribavirina, control de célula y controles de virus.

Para la evaluación de la actividad virucida se probaron tres moléculas en su MCNC.

Se realizó la IFI de las células enfrentadas las mezclas de virus y moléculas y virus y ribavirina, en la placa de 96 pocillos se le quitó la mezcla de los pocillos y las células se fijaron con Metanol-Acetona (relación 50%-50%) durante 40 minutos a -20°C. Luego de descartar el fijador se dejó secar y se bloqueó con PBS- Seroalbumina 1% (50 µL por pocillo) durante 30 minutos. El bloqueante se descartó por vuelco e incubó con 40µL de los anticuerpos monoclonales diluidos en 0,1% PBS-Seroalbumina en cámara húmeda por 1 hora a 37°C. Los anticuerpos monoclonales (AcM) utilizados fueron: 47F (diluciones 1/50, 1/100) y 021/1G (diluciones 1/500, 1/1000) dirigidos contra la proteína F y G de superficie del virus. La placa se lavó 3 veces con 200 µL de PBS 1X por pocillo. Se agregó 40µL/pocillo del anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo las mezclas de virus y moléculas y virus y Alexa Flúor 488 Rabbit anti-mouse IgG (H+L) 2mg/mL (Molecular Probes) diluido 1/400 en PBS. Se incubó en cámara húmeda por 1 hora a 37°C. Adicionalmente se realizó una tinción con DAPI (diluido 1:1000 en PBS). El conjugado fue removido mediante 3 lavados con 200µL por pocillo de PBS. Las placas se observaron en microscopio de epifluorescencia utilizando filtros para DAPI y Alexa 488. Las placas luego de procesadas y fotografiada fueron guardadas protegidas de la luz con papel de aluminio a -4°C.

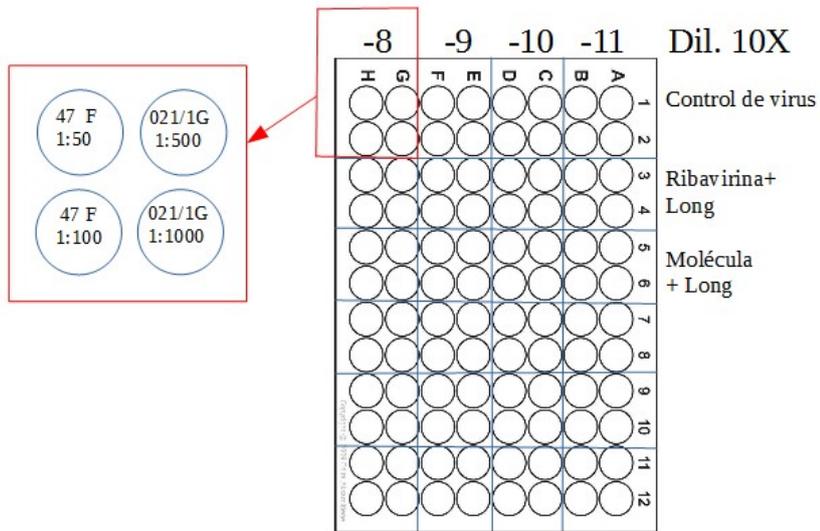


FIGURA 11.- Diseño de placa para la IFI, AcM 47F y 021/1G en dos diluciones 1:50 y 1:100; 1:500 y 1:1000 respectivamente.

4- RESULTADOS:

4.1 CULTIVO CELULAR E INFECCIÓN

En la Figura 12 se muestran las monocapas de células sembradas en una placa de 96 pocillos con 24 horas de crecimiento las cuales presentan una confluencia de un 80% y corresponde a $1,5 \times 10^5$ /mL. La presencia de infección en la monocapa de células se evidenció por la presencia de efecto citopático característico para VRS como alteraciones en la monocapa celular, redondeamiento de las células, formación de células multinucleadas llamadas sincicios. Se determino que con las diluciones de virus utilizadas a partir del día 5 las células infectadas comenzaban a perder adherencia llegando al día 7 con una pérdida casi total de la adherencia celular y desprendimiento de la monocapa. Por lo tanto se fijó en 5 días el máximo tiempo de incubación de virus en cultivo de células HEp-2.

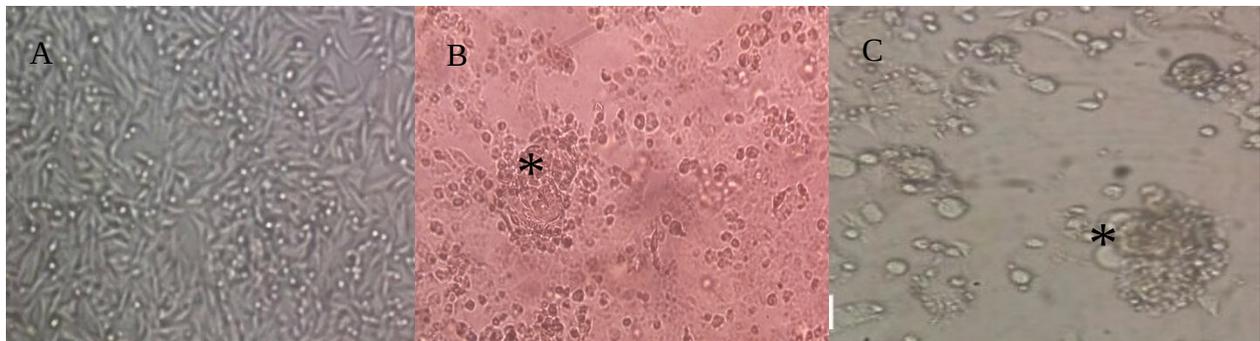


Figura 12.- A) Células Hep-2 en cultivo luego de 24 horas vista al microscopio óptico invertido B) y C) efecto citopático en células HEp-2 infectadas con VRS con formación de sincicios señalados con *.

4.2 PRODUCCIÓN DE STOCK Y TÍTULOS VIRALES

Se produjeron stock virales de las siguientes cepas epidémicas antiguas y recientes:

Cepa A: NH402, NH407,98B/701,94N/230

Cepa B: CH 18537

Se criopreservaron en viales en un volumen de 500 μ L almacenados a -80°C.

TÍTULO (DICT ₅₀)	CEPA DE VRS
10 ^{5,5}	98B/701
10 ^{7,6}	Long
No determinado	CH18357
No determinado	94N/230

Tabla 4. Títulos de las cepas de VRS

No fue posible determinar del título viral para la cepa CH18357 mediante la observación de efecto citopático. Bajo estas condiciones no constituyó un ensayo de medición objetivo por lo que se optó por no proseguir con el mismo.

Tampoco fue posible hallar la DICT₅₀ para la cepa 94N/230. La dilución correspondiente al 50% (dilución del virus capaz de infectar al 50% del cultivo celular) se encontró por encima de la dilución 10⁻¹⁰ llegando a un 81% de infectados (Tabla 5 en Anexo III)..

El título de la cepa Long fue determinado en estudios anteriores.

Método descrito en Anexo III.

4.2.1 IDENTIFICACIÓN DE VRS

Para algunos stocks virales, en donde la formación de sincicios en el cultivo de células HEp-2 no fue muy evidente (cepa CH 18537) se extrajo ARN y se amplificó por RT-PCR un fragmento del gen de la proteína viral N de 280pb de VRS. En la Figura 13 se observa la amplificación del fragmento indicado para la cepa CH 18537 en un gel de agarosa 1% lo que permitió corroborar la presencia de VRS.

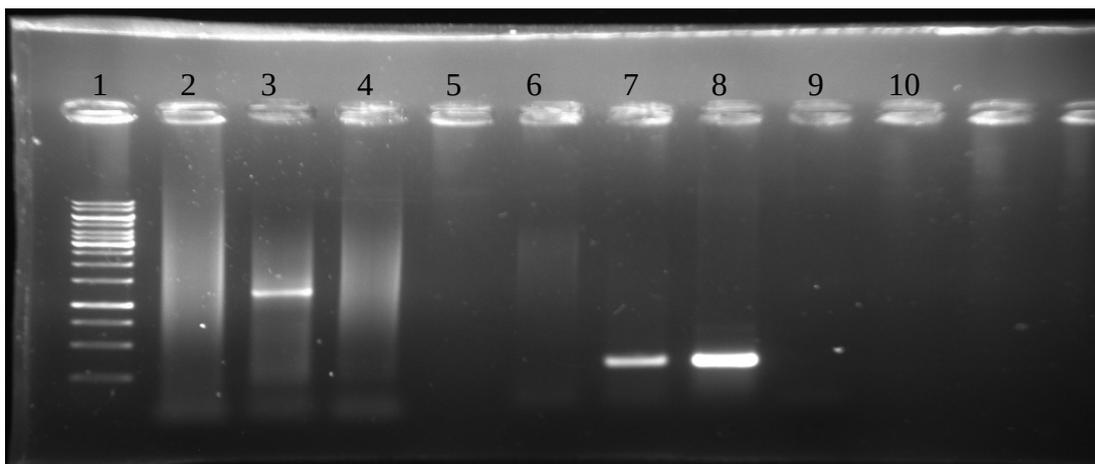


Figura 13.- Amplificación por RT-PCR de un fragmento del gen viral N de CH 18537 VRS Carril 1 - MPM: marcador de peso molecular Gene Ruler 100pb, Carril 6 : células sin infectar, Carril 7: VRS CH18537, Carril 8: control positivo VRS Long, Carril 9: control negativo (sin ARN). Los carriles 2 a 6 no corresponden a este ensayo. El producto de amplificación de la proteína N de VRS es de 280pb.

4.3 EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD Y MCNC DE LAS MOLÉCULAS A ESTUDIO

4.3.1 DETERMINACIÓN DE LA CC50% POR ENSAYO DE ROJO NEUTRO

Se analizó un grupo de 35 moléculas de las cuales se pudo determinar que 1179, 1180, 1183, 1184, 1186, 1188, 1189, 1202, 1205, 1253 resultaron no ser citotóxicas para la monocapa de células HEp-2. Los resultados fueron analizados y expresados en un gráfico de % de viabilidad celular en función del log de la concentración (μM) mostrados en la Figura 13. La viabilidad celular para cada concentración de la molécula se calculó teniendo en cuenta al 100% como el valor de la absorbancia del control de células.

Para las restantes moléculas analizadas los resultados no fueron concluyentes dado que las concentraciones utilizadas en este ensayo no lograron reducir en un 50% la viabilidad celular (gráficas no mostradas).

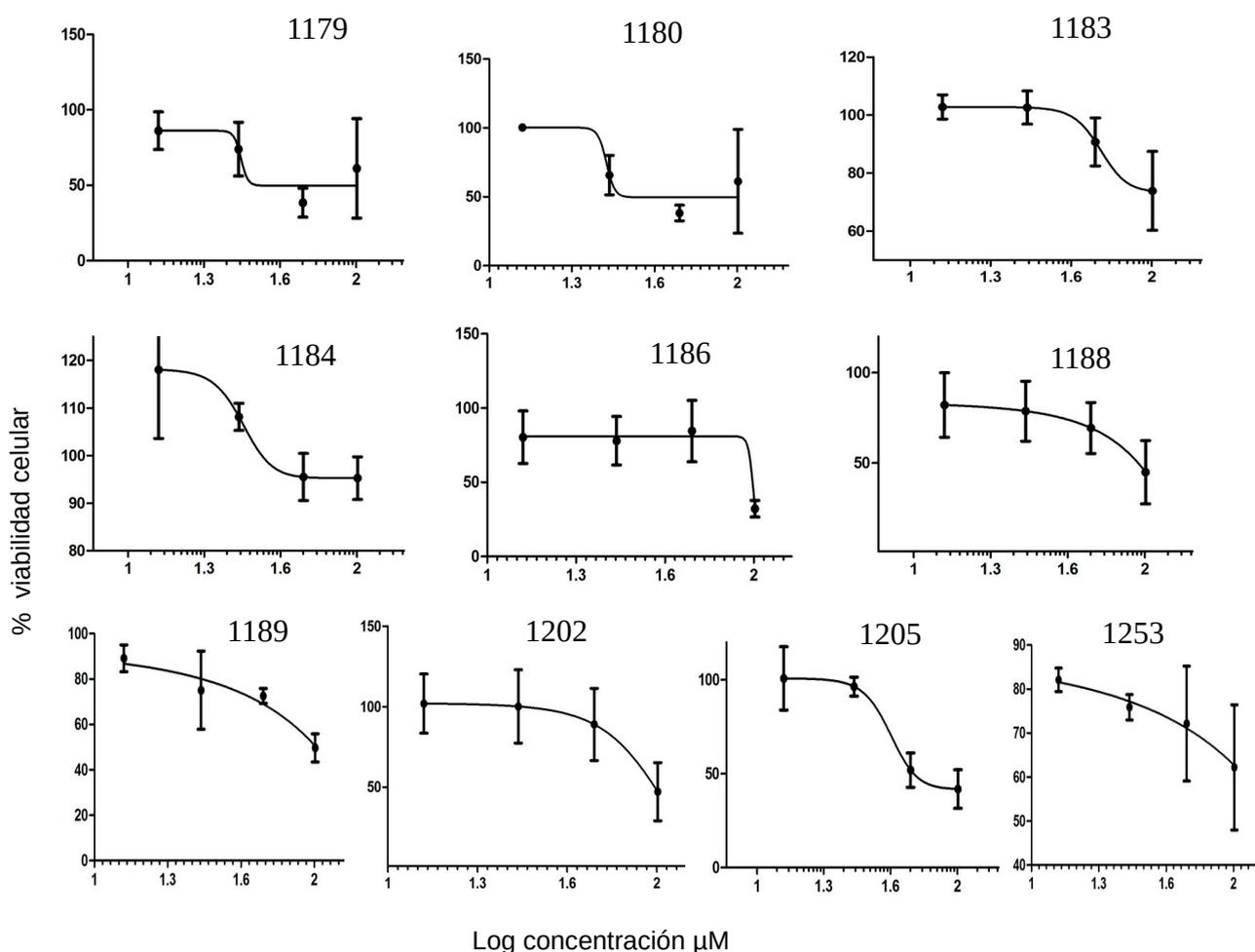


Figura 15.- Gráficos realizados utilizando el programa GraphPad Prism 5, la media es \pm el desvío estándar de tres replicas.

4.3.2 DETERMINACIÓN DE LA Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC)

Del grupo de moléculas cuyo $CC_{50\%}$ fue hallado, fue posible determinar la MCNC para la molécula 1205 cuyo valor fue de 25 μ M el cual mostró ser significativo con respecto al control. Para el resto de las moléculas analizadas no fue posible determinar su valor.

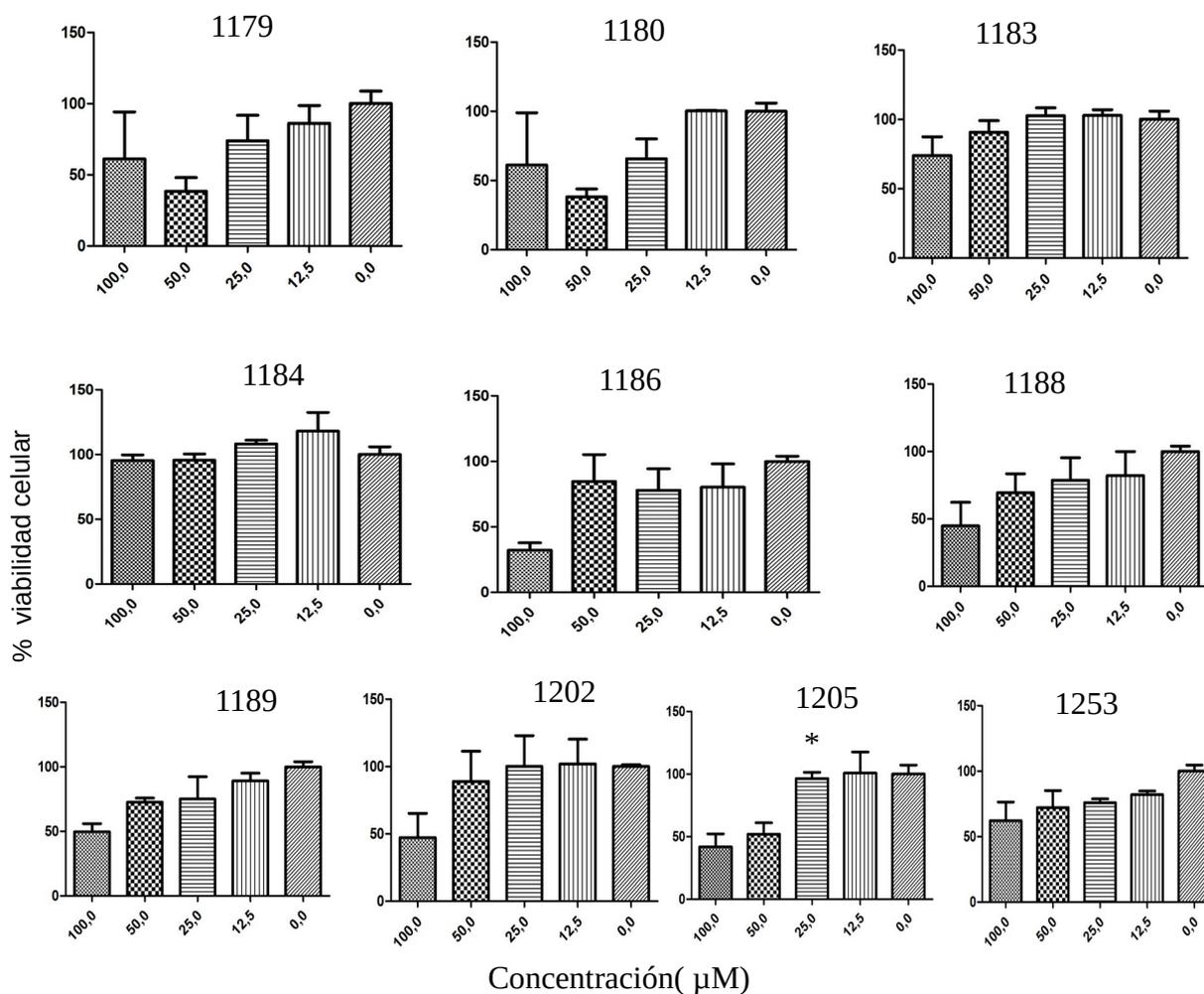


Figura 16. Gráficos obtenidos con GraphPad Prism 5 de la MCNC. Se evaluó el porcentaje de la viabilidad celular en función de las concentraciones en μ M para cada molécula.

Molécula	324	1167	1205
MCNC (μM)	50	25	25

Tabla 3.- Máxima concentración no citotóxica de las moléculas utilizadas. Los datos para las moléculas 324 y 1167 fueron proporcionados por el laboratorio, obtenidos en ensayos previos.

4.4 DETERMINACIÓN DE LA CC_{50%} Y MCNC DE LA RIBAVIRINA

Con las concentraciones empleadas no se pudo determinar un valor para la CC_{50%} (Figura 17) necesitando un rango mayor de diluciones. Sin embargo con los datos analizados y utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 5 se obtuvo un valor para la máxima concentración no citotóxica e 20µM coincidente con la utilizada en trabajos anteriores (Figura 18).

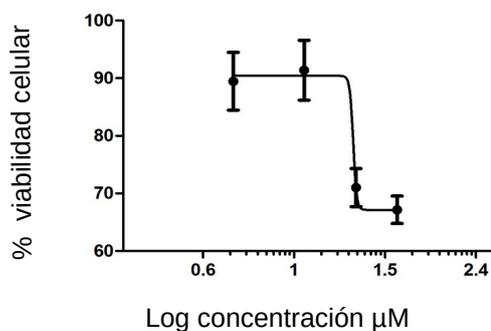


Figura 17.- Determinación de la concentración citotóxica 50% (CC50%). La viabilidad celular para cada concentración de la molécula se calculó teniendo en cuenta al 100% como el valor de la absorbancia del control de células. El gráfico muestra la media ± desvío estándar de tres réplicas.

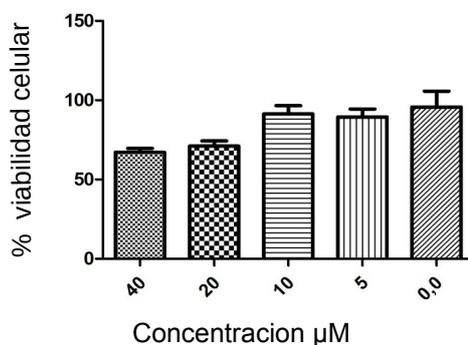


Figura 18.- Determinación de la máxima concentración no citotóxica (MCNC), se evaluó el porcentaje de la viabilidad celular en función de las concentraciones en µM.

4.4.1 EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN INHIBITORIA DE LA RIBAVIRINA EVALUADA CONTRA VRS.

Se determinó la acción inhibitoria de la ribavirina a una concentración de 20µM (obtenida en 4.4) contra la cepa Long de VRS.

En la evaluación de la capacidad inhibitoria de la Ribavirina por inmunofluorescencia (IFI), monocapas infectadas con diluciones seriadas del virus desde 10⁻³ a 10⁻¹⁴ junto con la ribavirina en su MCNC fueron evaluadas con la técnica de IFI empleando los AcM 47F (dilución 1:50) y

021/1G (dilución 1:500). En la Figura 19 se muestra la imagen de la acción inhibitoria de la Ribavirina en tres de las diluciones del virus empleadas. En la dilución 10^{-3} es posible observar una reducción significativa de la infección. En las mayores diluciones, cuando el virus esta muy diluido y no es suficiente como para formar sincitios, a pesar de ver fluorescencia en células individuales infectadas, el efecto inhibitorio de la ribavirina es menos evidente.

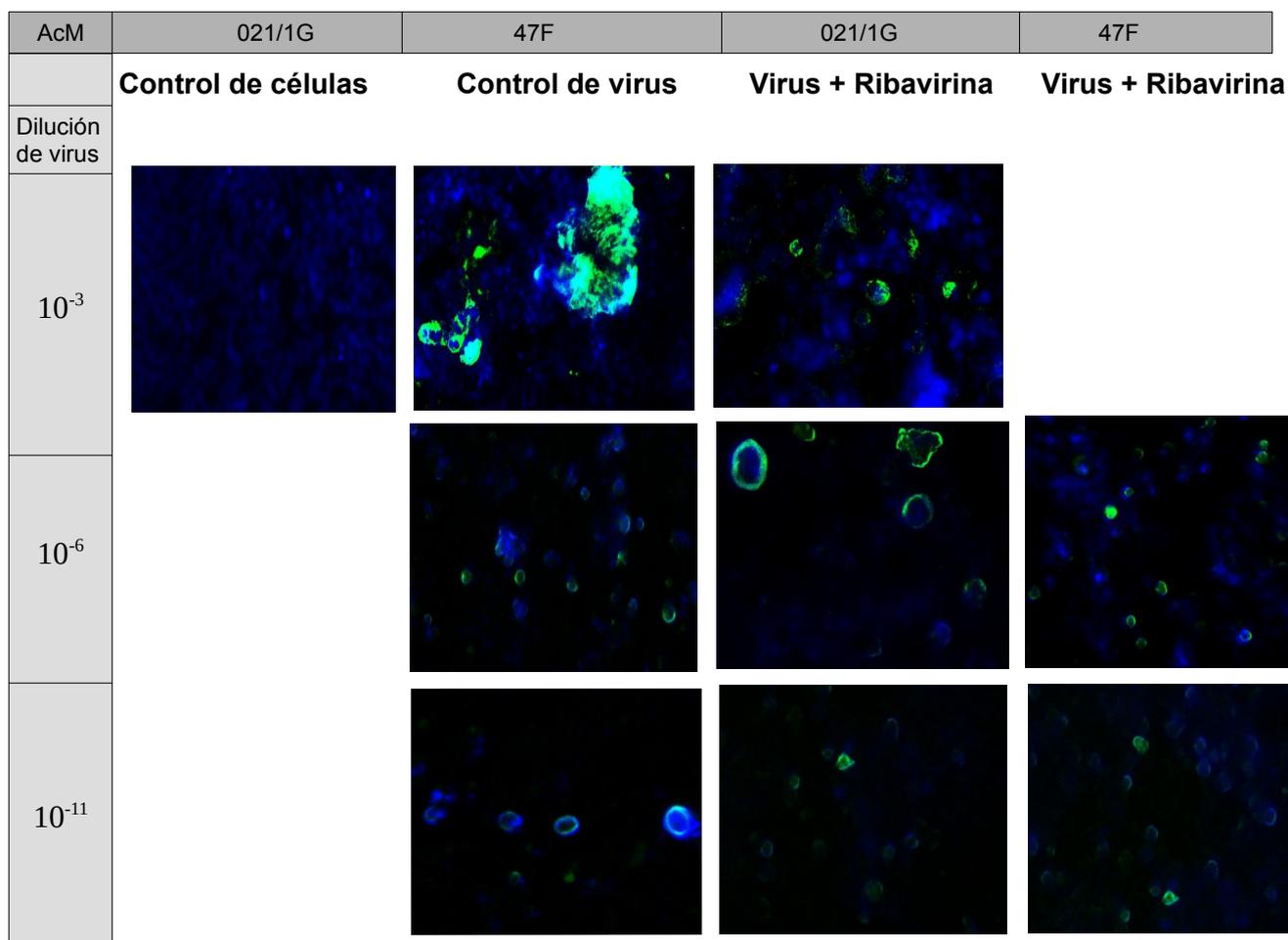


Figura 19.- Análisis de la inhibición de la ribavirina por IFI. Las fotografías corresponden a la fluorescencia de Alexa 488 y DAPI superpuestas (merge). AcM: anticuerpo monoclonal, Dil. : dilución.

4.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD VIRUCIDA DE LAS MOLÉCULAS 324, 1167 y 1205 CONTRA VRS.

Del grupo de moléculas analizadas se seleccionó la 1205, y se probó conjuntamente con otras dos moléculas (324 y 1167) que fueron sometidas a los mismos ensayos de citotoxicidad, pero que fueron utilizadas para otros ensayos y que tenían interés por un posible actividad antiviral. En la Figura 20b se muestra la posible actividad virucida de las tres moléculas en estudio, utilizando una dilución de 10^{-8} de la cepa Long y revelado con los AcM 47 F (dilución 1:50; 1:100) y 021/1G

(dilución 1:500; 1:1000) que se utilizó para revelar el ensayo de IFI indirecta, y un control de infección con cepa Long y ribavirina. En la Figura 20a se muestra un control de células sin infectar y un control de células infectadas con la cepa Long (sin dilucion). En la dilución elegida fue posible observar en el control sincitios aislados y células individuales infectadas . Cuando se enfrentó esta dilución viral a las moléculas en estudio no fue posible ver una reducción en la actividad del virus de acuerdo a como se observa con la molécula 1167, donde es posible observar también un sincitio aislado y también algunas células individuales infectadas. En los otros dos ensayos ,con la molécula 1205 y 324, la infección no permitió encontrar sincitios aislados como los observados en el control, pero sí células individuales infectadas. En ninguno de los ensayos realizados se pudo corroborar que las moléculas tuvieran un efecto virucida respecto al control de virus de la infección.

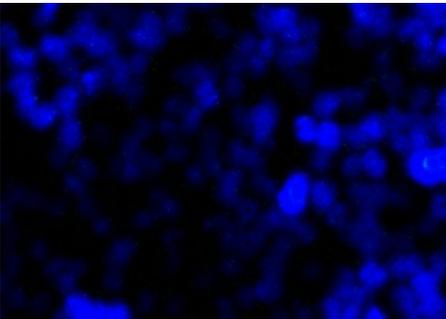
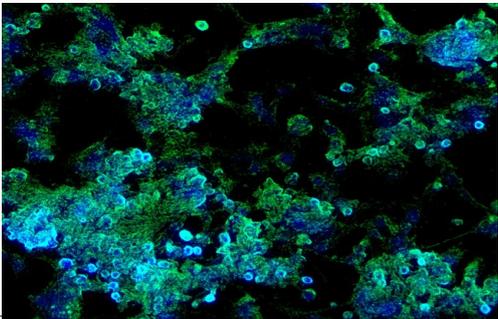
Dilución 10X	Sin dilución		Sin dilución
AcM/dilución	47F / 1:50		021G / 1:1000
Control de células		Control de virus	

Figura 20a.- Fotografías de IFI corresponden a la superposición de Alexa 488 y DAPI, que permite ver las proteínas virales y los núcleos celulares al mismo tiempo para los controles de células y de virus sin dilución. AcM, el virus utilizado es la cepa Long VRS.

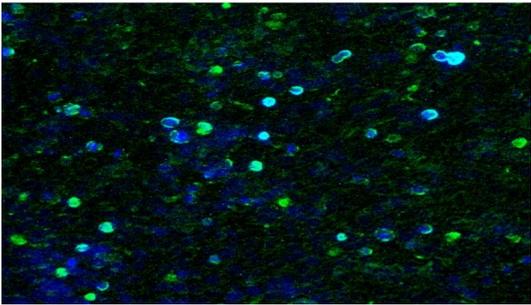
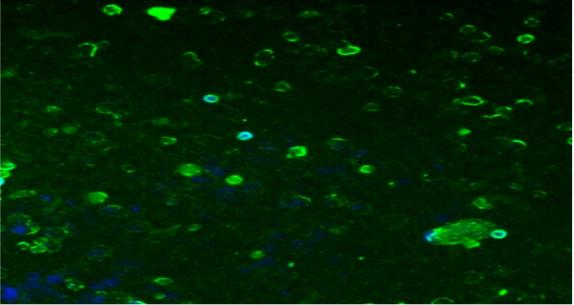
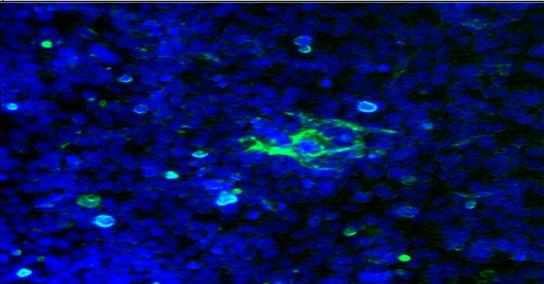
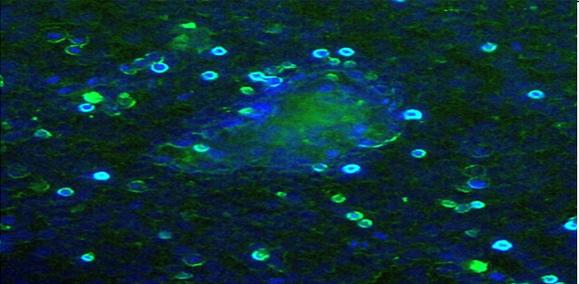
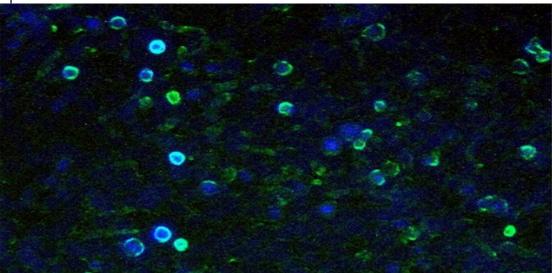
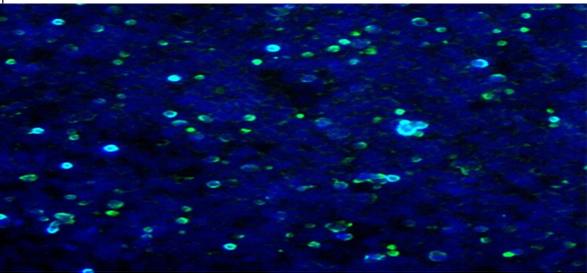
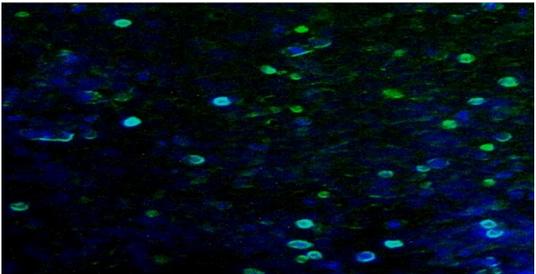
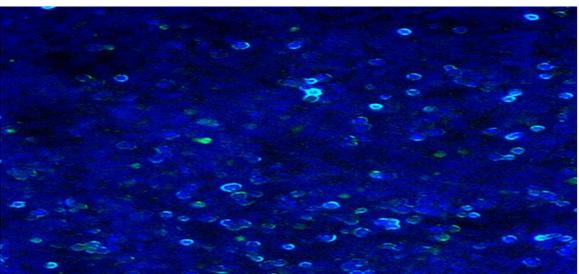
Dilución 10 ⁻⁸		
	CONTROL DE VIRUS	MOLÉCULA 324 + VIRUS
AcM/dilución	47F / 1:50	021/G / 1:500
		
	CONTROL DE VIRUS	MOLÉCULA 1167 + VIRUS
AcM/dilución	47F / 1:50	47F / 1:50
		
	CONTROL DE VIRUS	MOLÉCULA 1205 + VIRUS
AcM/dilución	47F / 1:50	021/G / 1:500
		
	CONTROL DE VIRUS	RIBAVIRINA + VIRUS
AcM/dilución	47F / 1:50	47F / 1:50
		

Figura 20b.- Fotografías de IFI corresponden a la superposición de Alexa 488 y DAPI. Esto permite ver las proteínas virales y los núcleos celulares al mismo tiempo utilizando AcM 47F o 021/G sobre células infectadas con virus VRS cepa Long.

5. DISCUSIÓN

Los ensayos virucidas son la contraprueba de los estudios de la capacidad antiviral de un compuesto.

Una vez que un compuesto presenta indicios de actividad antiviral, se realizan sucesivos ensayos para determinar en que parte del ciclo de la replicación viral ese compuesto tiene la capacidad de interferir con el virus. Algunos de los ensayos utilizados para determinar en que parte del ciclo viral ese compuesto actúa son los llamados ensayos de tiempos de adición *in vitro* en donde el virus y el compuesto se colocan simultáneamente sobre las células o el compuesto previo al virus o el compuesto luego de que se haya producido la adsorción viral. Si en estos ensayos se determina que la interferencia con el ciclo del virus es en el momento de la adsorción, se debe de estar seguro que ese efecto no es la consecuencia de un efecto virucida del compuesto sobre el virus (destrucción del virus por el compuesto). Es por esa ésta razón, que es necesario realizar en paralelo ensayos que permitan descartar un efecto virucida del compuesto. En este sentido numerosos trabajos han testeado la capacidad virucida de compuestos (Cheng et al ,2013) en busca de obtener la contraprueba de moléculas con efecto antiviral, pero no considerando esta capacidad entre las propiedades del compuesto en estudio. Por otro lado, otros trabajos donde se ha probado la actividad virucida de compuestos junto con ensayos de tiempos de adición, o de adsorción consideran esta propiedad como una característica más del compuesto en estudio (Zandi et al, 2011).

En este trabajo se realizaron varios ensayos para la optimización de las condiciones que permitieran la evaluación de la actividad virucida de varias moléculas diseñadas a partir de una molécula prototipo algunas de las cuales habían sido previamente testeadas en su capacidad antiviral. Todos los ensayos se realizaron por triplicado con el fin de minimizar las variaciones en los resultados.

La evaluación de la actividad virucida de las moléculas candidatas fueron realizadas en el modelo de infección *in vitro*. Los ensayos se realizaron por triplicado con el fin de minimizar las variaciones en los resultados.

La evaluación *in vitro* de las respuestas celulares asociadas a la exposición de moléculas de las cuales no se conoce su toxicidad (ensayo de citotoxicidad) requiere de un diseño experimental que incluye la elección de la línea celular, tiempos de exposición y selección de los parámetros de ensayos mas adecuados para definir el perfil citotóxico de estos compuestos como uno de los objetivos de estudio.

La valoración de la citotoxicidad por el método de rojo neutro basada en la exposición a diferentes concentraciones de las moléculas derivadas de la molécula 28a mostró luego de 72 horas un efecto dependiente de la concentración. Se analizó la citotoxicidad de 35 moléculas, de las cuales diez moléculas presentaron curvas dosis-respuesta con tendencias similares llegando a reducir en un 50% la viabilidad celular, Fig. 16. En el resto de las moléculas analizadas, según los resultados obtenidos no se logro observar este mismo comportamiento por lo que no fueron tomadas en cuenta para los siguiente ensayos. Si bien para algunas moléculas se midieron porcentajes de supervivencia superiores al 100%, esto puede obedecer a algún error de manipulación al sembrar las células en los pocillos. Pudiendo haberse sembrado mayor cantidad a la deseada, donde pasadas las 72 horas de incubación en algunos pocillos estas células proliferaran mas y de esta forma mostrarían una sobrevida mayor al 100%.

Para estos ensayos de citotoxicidad se utilizó un rango de concentración de moléculas de 100, 50, 25 y 12,5 μM como una forma de tener un panorama general del efecto del compuesto sobre las células, sin embargo este rango no fue suficiente para algunas moléculas y lo tanto no se pudo determinar la CC50% para ellas. Para esto se propone ampliar el rango de las diluciones a fin de buscar en concentraciones menores a 12,5 μM o a un rango de acuerdo que permita encontrar la CC50%. Debemos tener en cuenta además que el ensayo de rojo neutro para la estimación de la viabilidad/citotoxicidad es de gran sensibilidad con respecto a otros ensayos. La bibliografía reporta nueve puntos críticos durante el ensayo que requiere de 33 pasos. Además de los aspectos referentes a los cultivos celulares donde se prueban los compuestos (cantidad de células, tiempo de exposición, etc), se debe tener en cuenta que el rojo neutro en solución tiende a precipitar formando cristales, siendo esta la mayor causa de errores al momento de la lectura de la densidad óptica (Repetto 2008). Para evitar esto la preparación de la solución de stock de rojo neutro fue preparada solo unos días antes de su uso para evitar su precipitación y minimizar los errores de lectura de la densidad óptica por interferencia de la formación de cristales en el precipitado.

Para complementar este ensayo se determinó la MCNC para el conjunto de moléculas que resultaron no ser citotóxicas donde se logró evidenciar una diferencia significativa en la molécula 1205 con respecto al control en la concentración de 25 μM , Fig. 17. El resto de las moléculas no difirieron de manera estadísticamente significativa del control por lo que es necesario un mayor número de diluciones en donde la concentración de la molécula tenga un rango mayor, llegando a concentraciones menores a fin de obtener poder encontrar una diferencia significativa.

Posteriormente a los ensayos de citotoxicidad este estudio se centró en detectar la actividad virucida de las moléculas seleccionadas como no citotóxicas sobre un cultivo de células Hep-2 infectado con VRS (cepa Long de referencia), comparándolas con los controles de cultivos de células tratados con ribavirina y otro con células infectadas sin tratar. De las moléculas probadas en los ensayos de citotoxicidad se eligió la 1205 que fue para la que se pudo obtener la MCNC.

Dos moléculas 1167 y 324 que fueron incluidas en este estudio fueron seleccionadas por poseer posible actividad antiviral en estudios previos en la sección virología.

Se propagó en cultivos celulares HEp-2 diferentes cepas de VRS del subgrupo A (Long, NH402, NH407, 98B/701,94N/230), se produjo stock viral y se titularon por DICT_{50} en este trabajo las cepas 98B/701,94N/230 y en trabajos previos la cepa Long. La cepa del grupo antigénico B fue crecida en cultivos de células HEp-2 pero no presentó un claro efecto citopático. Para evidenciar la presencia de virus en los cultivos infectados con esta cepa, se realizó la extracción de ARN y posterior amplificación de la proteína viral N con resultado positivo Fig 13. Sin embargo y dado que la infección con esta cepa no fue posible evidenciar una clara formación de sincitios, sumado a que el método de titulación utilizado fue la búsqueda de la DICT_{50} donde no fue posible determinar el título, no se produjo un stock viral de esta cepa. Se debe considerar que en algunos casos las cepas de VRS pueden no mostrar el efecto citopático característico, lo cual puede dificultar la propagación y hace necesario reconsiderar el tipo de técnica a utilizar para la titulación, por esta razón esta cepa fue dejada para analizar en futuros trabajos.

Para determinar los parámetros de utilidad para evaluar la concentración viral para el ensayo de IFI se estableció un rango de diluciones de virus hasta la infección viral 10^{-11} y se fijó en 20 μM el valor de ribavirina a utilizar. Consecuentemente, estos resultados sugieren que la ribavirina en

estas condiciones es capaz de controlar la infección pero no erradicarla. Parámetros elegidos para los ensayos virucida fueron los siguientes, los virus en una dilución de 10^{-8} , las moléculas de interés ,324, 1167 y 1205 en su MCNC, y el valor de la ribavirina en $20 \mu\text{M}$ (MCNC).

Los resultados en la figura 20a y 20b, muestran que, en principio bajo estas condiciones experimentales fue posible determinar que aparentemente estas moléculas no tuvieron actividad virucida. Esto se evidencia observando y comparando los cultivos de células infectadas con una dilución de virus de 10^{-8} en presencia o ausencia de las moléculas ensayadas. Estos resultados demuestran que el pre-tratamiento del virus con las moléculas no destruyó al virus y por lo tanto no protegió a las células de las infección con VRS. La comprobación de esta actividad; podría ser verificada aplicando otras técnicas como la realización de ensayos de RT-qPCR de cultivos infectados vs cultivos pre-incubados incubación con las moléculas en estudio posteriormente infectado con el virus o ensayos de ARNasas (Kaptein et al, 2010) Estos ensayos no están puestos a punto aún en el laboratorio y su implementación excede los objetivos de este trabajo.

Los ensayos de actividad virucida fueron puestos a punto utilizando la cepa de referencia (Long) y aunque estaba pensado realizar los mismo ensayos para el resto de las cepas crecidas y tituladas, a fin de corroborar que no hubiera un efecto virucida dependiente de cepa., la laboriosidad y el tiempo que insumió la puesta a punto de las técnicas aquí presentadas, determinaron que dichos stocks virales quedaran disponibles para ser probados en posteriores trabajos.

La aparente no actividad virucida de estas moléculas resulta una característica deseable para esta moléculas las cuales habían presentado una posible actividad antiviral. Dado todos los resultados presentados discutidos anteriormente, (junto con datos de capacidad testeada en trabajos previos) podemos concluir que estos compuestos (324,1167, 1205) representan una promesa como mecanismo de contención de la infección contra VRS.

Debido a que hasta el momento no existe una vacuna aprobada, la búsqueda de compuestos antivirales resulta una alternativa para el tratamiento de dichas infecciones. Las moléculas de síntesis derivadas de la molécula prototipo 28a dirigidos a los factores necesarios para la replicación en las células huésped ofrecen una oportunidad como agente antiviral en el tratamiento contra el virus respiratorio sincicial (Moore, 2013). Este concepto esta en estudio por otros investigadores. Teniendo en cuenta que el hospedador es una diana necesaria para completar el ciclo del virus, dirigirse a los factores del huésped junto con un efecto antiviral y una toxicidad manejable es un efecto deseable en la búsqueda de nuevos tratamientos terapéuticos (Prussia, 2011).

6. CONCLUSIONES

Propagación de diferentes cepas de VRSh en células Hep-2 y su confirmación por PCR

. El sistema utilizado para el crecimiento de las diferentes cepas fue efectivo y se fijo en 72 horas el tiempo necesario para observar un efecto citopático característico.

. No fue posible observar un efecto citopático para la cepa del subgrupo B en 72 horas de cultivo.

. Se confirmó positivamente la presencia del virus a partir de la amplificación de la proteína viral N por RT-PCR.

Titulación de los virus propagados y ensayos de citotoxicidad

. Las cepas del grupo A pudieron ser tituladas por el método DCTI₅₀, aunque para la cepa 98B/701 no fue posible hallar ese valor. Para la cepa del subgrupo B CH 18537 no fue posible la titulación debido a la dificultad de observar un efecto citopático característico requerido para este tipo de ensayo.

. Los valores obtenidos usando el ensayo de rojo neutro se hallaron diez moléculas que demostraron ser no citotóxicas en un cultivo de células HEp-2.

. Dentro de las moléculas analizadas en este trabajo solo se pudo determinar la MCNC en una de ellas, la molécula 1205.

. Para la ribavirina se obtuvo una concentración de 20µM como agente efectivo para inhibir la infección de VRSh in vitro.

Determinación de la actividad virucida de las moléculas derivadas de 28a

. Las moléculas 324, 1167 y 1205 no presentaron actividad virucida cuando se utilizaron en su MCNC y con una dilución de virus de 10⁻⁸ sobre una monocapa infectada con cepa Long VRSh .

. La actividad virucida de las moléculas fue ensayada solo contra la cepa de referencia, habiendo quedado en stock y tituladas otras cepas de VRSh para posteriores estudios.

7. PERSPECTIVAS

A través del desarrollo de este trabajo quedaron disponibles cepas de VRS del subgrupo A tituladas, puesta a punto de ensayos de citotoxicidad de moléculas y protocolos ajustados para el análisis de actividad virucida, los cuales podrían ser aplicables a otro tipo de virus.

8- REFERENCIAS

American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases; American Academy of Pediatrics Bronchiolitis Guidelines Committee. Updated guidance for palivizumab prophylaxis among infants and young children at increased risk of hospitalization for respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics*. 2014;134 (2): 415-20.

Aldao, J., Lattof M., Hernandez, C., Cuña I. Virus respiratorio sincicial en neonatología. *Archivos de Pediatría del Uruguay* 2005;76 (3)

Ang, L., Mak, T., Cui, L., Leo, Y., Lee V., Lin RT-P. Characterisation of respiratory syncytial virus activity in children and adults presenting with acute respiratory illness at primary care clinics in Singapore, 2014-2018. *Influenza Other Respi Viruses*. 2020;00:1-8.

Arbiza J, Delfabro A, Frabasile S. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus in Uruguay: 1985-2001--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(3):221-230.

Arencibia, D., Rosario, L., Curveco, D.. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Rev Toxicol*. 2003: 40-52

Boyoglu-Barnum, S., Chirkova, T., Anderson, L. Biology of Infection and Disease Pathogenesis to Guide RSV Vaccine Development. *Front. Immunol*. 2019,10:1675.

Coates, M., Brookes, D., Kim, Y., Allen, H., Fordyce, E., Meals, E., et al. Preclinical characterization of PC786, an inhaled small-molecule respiratory syncytial virus L protein polymerase inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61 (9):1-18

Collins, P., Fearn, R., Graham, B. Respiratory Syncytial Virus: Virology, Reverse Genetics, and Pathogenesis of Disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;372: 3-38

Corzo-Lopez, M., Valdez-Ramirez, O. El virus sincicial respiratorio humano: una panorámica *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. 2013;(2) 44

Chanock, R., Parrot, R., Vargosko, A., Kapikian, A., Knight, V., Johnson, K.. Acute respiratory diseases of viral etiology. IV. Respiratory syncytial virus. *Am J Public Health*. Jun,52 (6):918-25.

Cheng, Jia; Sun, Na; Zhao, Xin; Niu, Li; Song, Meigui; Sun, Yaogui, et al. "In vitro screening for compounds derived from traditional chinese medicines with antiviral activities against porcine reproductive and respiratory syndrome virus." *J of Molecular Biology*. 2013,23;23(8):1076-1083.

Cutrera, R., Wolfler, A., Picone, S., Rossi, G. A., Gualberti, G., Merolla, R., Del Vecchio, A., Villani, A., Midulla, F., & Dotta, A. Impact of the 2014 American Academy of Pediatrics recommendation and of the resulting limited financial coverage by the Italian Medicines Agency for palivizumab prophylaxis on the RSV-associated hospitalizations in preterm infants during the 2016-2017 epidemic season: a systematic review of seven Italian reports. *Italian J Pediatric*. 2019; 45:139

De Burghgraeve, T., Kaptein, S., Ayala-Nunez, N., Mondotte, J., Pastorino, B., et al. Analogue of the Antibiotic Teicoplanin Prevents Flavivirus Entry In Vitro. *PLoS ONE*. 2012;7(5): e37244

- De Olivera, N., Giachetto, G., Figueroa, C., Cavalleri, F. Infecciones respiratorias agudas bajas graves en niños menores de 6 meses hospitalizados. Análisis de factores de riesgo de gravedad. *An. Facultad Med (Univ Repúb Urug)*. 2019; 6(1):57-66
- De Vincenzo, J., McClure, M., Symons, J. Hosnieh F., Westland C., Chanda S., et al. Activity of oral ALS-008176 in a respiratory syncytial virus challenge study. *N Engl J Med* 2015;372:2048-2058
- De Vincenzo, J., Withley, R., Mackman, R., Scaglioni-Weinlich C., Harrison L., Farrel E., et al. Oral GS-5806 activity in a respiratory syncytial virus challenge study. *N Engl J Med*. 2014;371 (8):711-722
- Elhalik, M., El-Atawi, K., Dash, S., Faquih, A., Satyan, A., Gourshettiar, N., Khan, A., Varughese, S., Ramesh, A., Khamis, E. Palivizumab Prophylaxis among Infants at Increased Risk of Hospitalization due to Respiratory Syncytial Virus Infection in UAE: A Hospital-Based Study. *Can Respir J*. 2019 Dec 1;2019:2986286.
- Empey, K. Stokes, Jr., Kolls, J. Pharmacologic Advances in the Treatment and Prevention of Respiratory Syncytial Virus. *REVIEWS OF ANTI-INFECTIVE AGENTS. Clin Infect Dis*. 2010;50(9):1258–1267
- Fedechkin SO, George NL, Nuñez Castrejon AM, Dillen JR, Kauvar LM, DuBois RM. Conformational Flexibility in Respiratory Syncytial Virus G Neutralizing Epitopes. *J Virol*. 2020;94(6):e01879-19
- Fernandez, S., Maubett, D., Satragno, D., Cattaino, A., Alonso, M., Rubio, C., Nieto, R. Recomendaciones sobre el uso de palivizumab. Actualización 2015. *Arch Argent Pediatric* 2016;114(1):84-88
- Fields, B, Knipe D. *Virology*. 5th Edition de. 2005.
- Figueras Aloy J, Quero J, Doménech E, López Herrera MC, Izquierdo I, Losada A, Perapch J, Sánchez-Luna M; Comité de Estándares de la Sociedad Española de Neonatología. Recomendaciones para la prevención de la infección por virus respiratorio sincitial. *An Pediatr* 2005;63(4):357-62
- Fondo Nacional de Recursos (FNR). "TRATAMIENTO CON PALIVIZUMAB". Normativas versión 2016. 2016
- Galán-Sánchez, F., Fernández-Gutiérrez del Alamo, C., Rodríguez-Iglesias, M. Infecciones víricas (Viral infections) *Medicine*. 2014; 11(49): 2885-2892.
- García-Barreno B, Palomo C, Peñas C, Delgado T, Pérez-Breña P, Melero JA. Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J Virol*. 1989;63(2):925-932.
- Griffiths, C., Drews, S., Marchant, D. Respiratory syncytial virus: infection, detection, and new options for prevention and treatment. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30:277–319.
- Hoover, J., Eades, S., Man Lam, W., Pediatric Antiviral Stewardship: Defining the Potential Role of Ribavirin in Respiratory Syncytial Virus–Associated Lower Respiratory Illness. *J Pediatric Pharmacol Ther* 2018;23(5):372–378

- Hruska, J., Bernstein, J., Douglas, R., Hall, C. Effects of ribavirin on respiratory syncytial virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1980, 17(5):770-77
- Ison, M. Antiviral Treatments. *Clinics in Chest Medicine*, 2017, 38 (1):139-153
- Jones HG, Battles MB, Lin CC, Bianchi S, Corti D, McLellan JS. Alternative conformations of a major antigenic site on RSV F. *PLoS Pathog.* 2019; 15(7)
- Kaptein SJ, De Burghgraeve T, Froeyen M., Pastorino, B., Alen, M., Mondotte, J., Herdewijn, P., Jacobs, M., De Lamballerie, X., Schols, D., Gamarnik, A., Sztaricskai, F., Neyts, J. A derivative of the antibiotic doxorubicin is a selective inhibitor of dengue and yellow fever virus replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(12):5269-5280.
- Kerry, K., Stokes, R., Kolls, J. Pharmacologic advances in the treatment and prevention of respiratory syncytial virus. *Clin Infect Dis.* 2010; 50(9):1258-1267
- Lopez, J., Bustos, R., Örvell, C., Berois, M., Arbiza, J. Garcia-Barreno, B., Melero, J. Antigenic Structure of Human Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein. *J Virol*, 1998; 72 (8): 6922-6928.
- Lundin, A., Bergtröm, T., Adrigetti-Fröhner, C., Bendrioua, L., Ferro, V., Trybala, E. Potent anti respiratory syncytial virus activity of a cholestanol-sulfated tetrasaccharide conjugated. *Antiviral research.* 2012; 93:101-109
- Machado M., Guala M. J., Pirez, C. Virus respiratorio sincicial: identificación reiterada en niños. *Archivos de Pediatría del Uruguay.* 2007; 78 (4)
- Martinez, A., Binczaj, J., Birhuela, B., Sheridan, M., Mozgovej, M., Parreño, V., et al. Relevamiento sanitario en carpinos en una zona peri-valle de la provincia de Rio Negro, Argentina. *Revista Veterinaria Argentina.* 2013; 303: 1-11
- Moore T., Sana K., Yan D., Krumm S., Thepchtri, P., Snyder J., et al. Synthesis and Metabolic Studies of Host-Directed Inhibitors for Antiviral Therapy. *ACS Med Chem Lett* 2013; 4 (8):762-767
- Mufson MA, Orvell C, Rafnar B, Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 1985; 66 (Pt 10):2111-2124.
- Muniyandi, S., Pangratiou, G., Edwards, T.A. and Barr, J.N. Structure and Function of the Human Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein. *Subcellular Biochemistry.* 2018; 88: 245-260.
- Murray, R., Rosenthal, K., Michae, I., Pfaller, M. *Microbiología médica.* 2009: p. 599, 6ª Edición
- Pizzorno, A., Masner, M., Médici, C., Sarachaga, M., Rubio, L., Mirazo, S., Frabasile, S., Arbiza, J. The pattern of circulation of this virus, analyzed for both N and G genes independently, resembles the complex evolutionary pattern of respiratory syncytial virus (RSV). *J. Med. Virol.* 82:861–865, 2010.
- Peret, TC, Hall, CB., Schnnabel, KC., Golub, JA, Anderson, LJ., Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of respiratory syncytial virus in a community. *J Gen Virol .* 1998; 79:2221-2229.
- Prussia A, Thepchatri P, Snyder JP, Plemper RK. Systematic approaches towards the development of host-directed antiviral therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2011; 12(6):4027-4052
- Reed, L., Muench, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol.*

1938;27 (3):493–497

Repetto G., Del Peso, A., Zurita, J. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/citotoxicity. *Nat Protoc* 2008;7(3):1125-31

Reyes, L. Estructura, procesamiento proteolítico y activación de la proteína F del virus respiratorio sincitial humano (Tesis de Doctorado). Universidad Complutense de Madrid. 2001

Rima, B., Collins, P., Easton, A., Fouchier, R., Kurath, G., Lamb, R. et al. ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae. *Journal of General Virology*. 2017; 98:2912– 2913

Rivera, C., Diaz, R., Cespedes, P., Kalergis, A., Virus respiratorio sincitial: un desafío para la salud publica a nivel mundial. *Sociedad española de Bioquímica y Biología Molecular*. 2016;187:27-32

Roca, G., Dominguez, F., Lafarga, B., Rosales, J. Estudio clínico-epidemiológico de la infección por virus respiratorio sincitial en el lactante. *An Esp Pediatr*. 1997;46:576-580.

San Juan, H., Gutierrez, M., Mohapatra, S. Biología molecular del virus sincitial respiratorio y desarrollo de estrategias profilácticas *Salud Uninorte*. 2006; 22 (2):135-153

Sanchez-Solis de Querol, M., Castillo-Ochando, F., Diaz-Torres, M., Sayed-Sancho, N., Sanchez-Flores, Pajaron de Ahumada, M. Ribavirina como tratamiento de la bronquiolitis por virus respiratorio sincitial. *An Esp Pediatr* 1997; 47(1):14-16

Sun Y, López CB. Preparation of Respiratory Syncytial Virus with High or Low Content of Defective Viral Particles and Their Purification from Viral Stocks. *Bio Protoc*. 2016;6(10) :e1820

Tan L, Lemey P, Houspie L, Viveen MC, Jansen NJG, VanLoon, A., Wiertz, E., Van Bleek, G., Martin, D., Coenjaerts. Genetic Variability among Complete Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup A Genomes: Bridging Molecular Evolutionary Dynamics and Epidemiology. *PLoS ONE*. 2012; 7(12): e51439.

Thevenin T, Lobert PE, Dewilde A, Hober D. A respiratory syncytial virus isolate enables the testing of virucidal products. *Int J Hyg Environ Health*. 2012; 215:293–296

Trento, A., Abrego, L., Rodriguez-Fernandez, R., Gonzalez-Sanchez, M., Gonzalez-Martinez, F., Delfraro, A., Pascale, J., Arbiza, J., Melero, J. Conservation of G-Protein Epitopes in Respiratory Syncytial Virus (Group A) despite Broad Genetic Diversity: Is Antibody Selection Involved in Virus Evolution?. *J Virol*. 2015; 89 (15) : 7776-7785.

Valarcher JF, Taylor G. Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet Res*. 2007 Mar-Apr;38(2):153-80

Zandi K, Teoh BT, Sam SS, Wong PF, Mustafa MR, Abubakar S. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virol J*. 2011 Dec 28;8:560. doi: 10.1186/1743-422X-8-560

Zhang Y, Jamaluddin M, Wang S, et al. Ribavirin treatment up-regulates antiviral gene expression via the interferon-stimulated response element in respiratory syncytial virus-infected epithelial cells. *J Virol*. 2003;77(10):5933-5947.

Zlateva, K. Vijigen, L., Dekeermaesker, N., Naranjo, C., Van Ranst, M. Subgroup Prevalence and Genotype Circulation Patterns of Human Respiratory Syncytial Virus in Belgium during Ten Successive Epidemic Seasons. *J Clin Microbiol* 2007;9 (45): 3022–3030

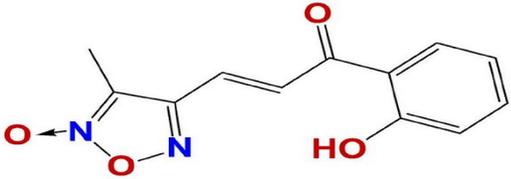
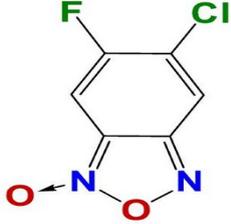
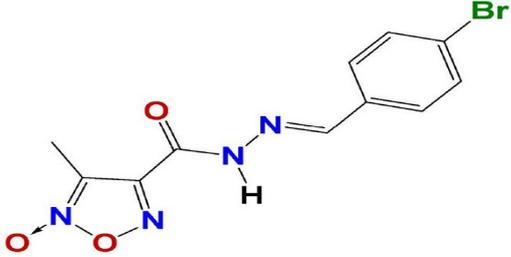
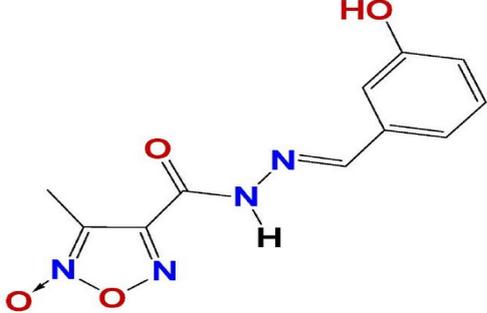
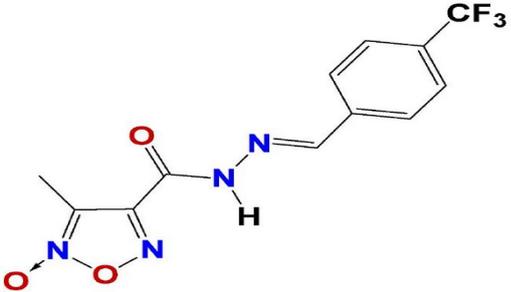
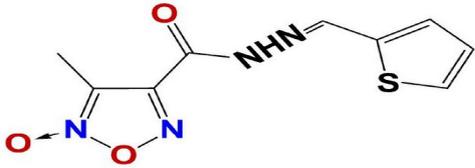
Zlateva, K., Lemey, P., Elie Moes, A. y Van Ranst, M. Genetic Variability and Molecular Evolution of the Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup B Attachment G Protein J Virol 2005;14 (79): 9157–916

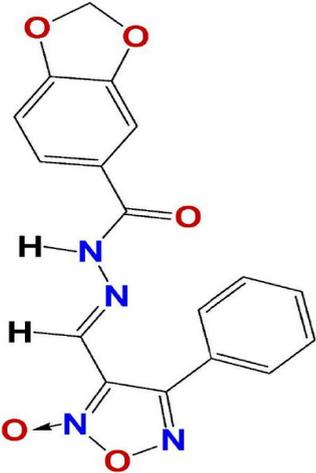
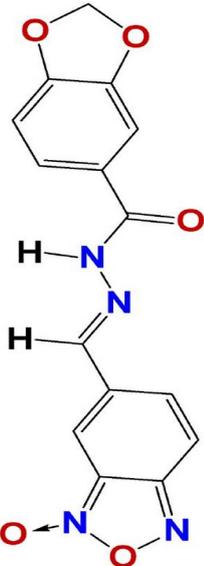
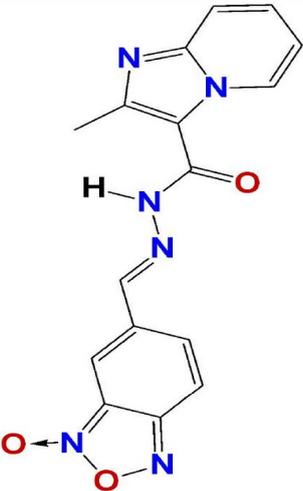
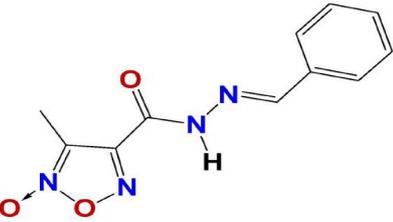
Zlateva, K., Lemey, P., Vandamme, A., Van Ranst, M. Molecular Evolution and Circulation Patterns of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup A: Positively Selected Sites in the Attachment G Glycoprotein J Virol 2004; 9(78): 4675–4683

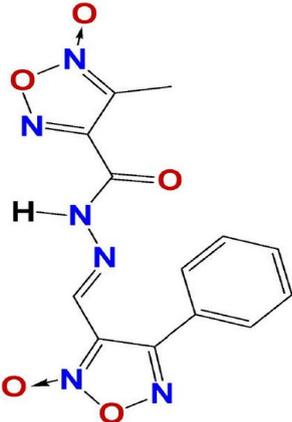
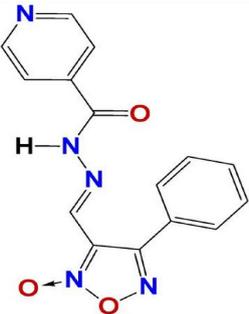
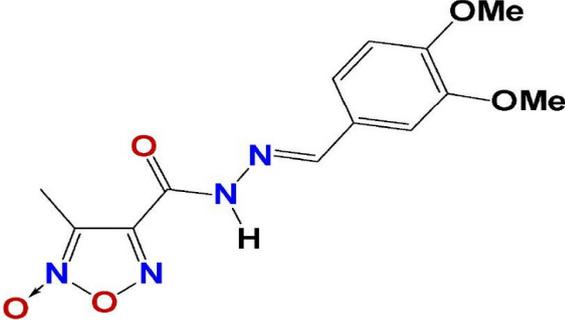
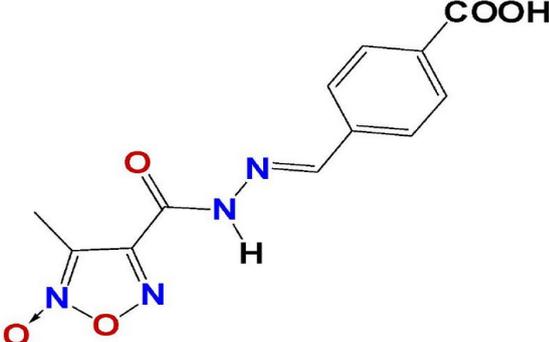
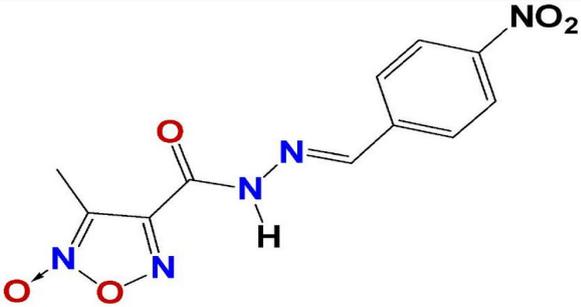
ANEXOS

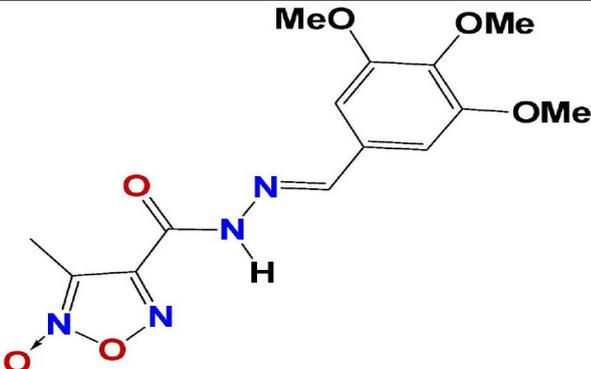
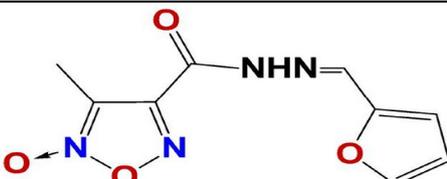
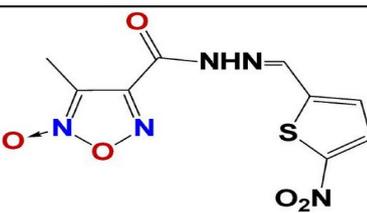
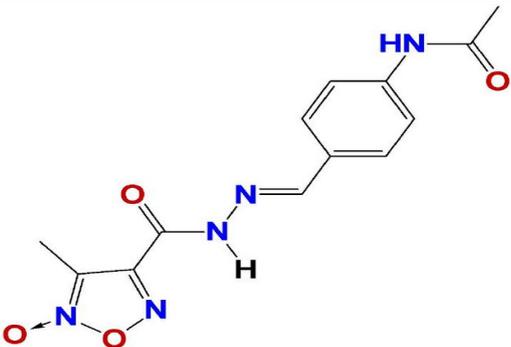
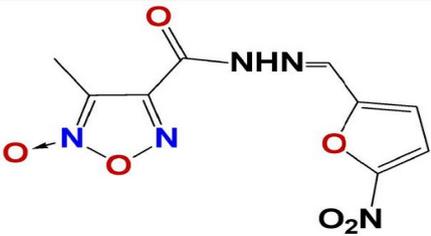
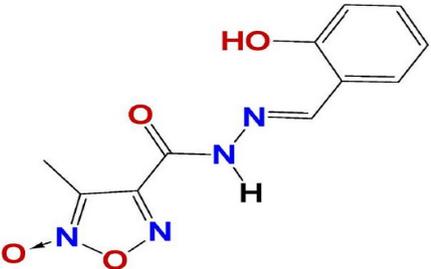
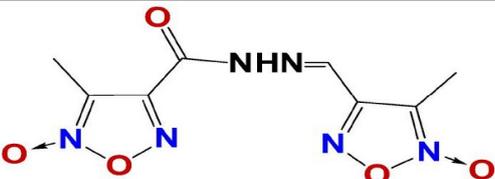
ANEXO I

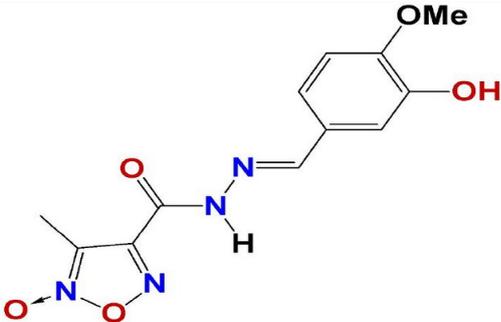
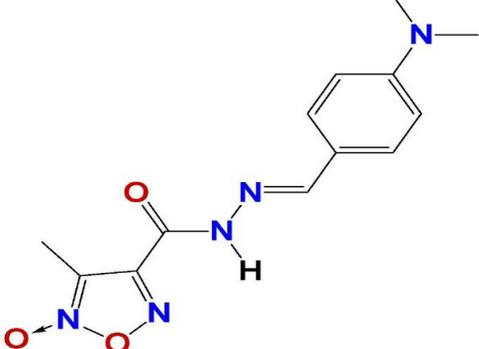
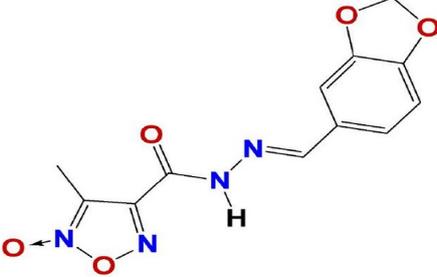
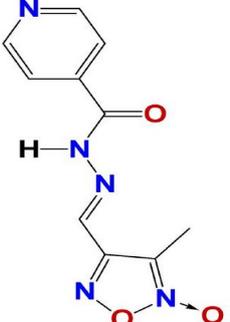
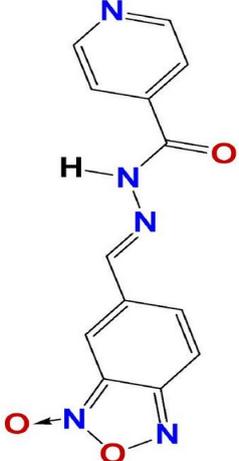
Estructura de las moléculas análogas de la molécula 28a.

ID_molécula	PM	Masa mg	estructura
1253	246	2.22	
1167	188	1.77	
1168	325	2.6	
1172	262	1.54	
1173	314	1.23	
1174	252	2.76	

1175	352	2.38	 <p>Chemical structure of 2-(2-(2-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-1H-benzotriazol-5-yl)ethyl)benzamide. It features a benzotriazole ring system with a carbonyl group at the 2-position, which is linked via an ethyl chain to a benzamide group.</p>
1176	326	1.03	 <p>Chemical structure of 2-(2-(2-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-1H-benzotriazol-5-yl)ethyl)pyridine. It features a benzotriazole ring system with a carbonyl group at the 2-position, which is linked via an ethyl chain to a pyridine ring.</p>
1177	306	1.84	 <p>Chemical structure of 2-(2-(2-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-1H-benzotriazol-5-yl)ethyl)imidazo[1,2-a]pyridine. It features a benzotriazole ring system with a carbonyl group at the 2-position, which is linked via an ethyl chain to an imidazo[1,2-a]pyridine ring system.</p>
1178	246	1.7	 <p>Chemical structure of 2-(2-(2-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-1H-benzotriazol-5-yl)ethyl)benzamide. It features a benzotriazole ring system with a carbonyl group at the 2-position, which is linked via an ethyl chain to a benzamide group.</p>

1179	330	2.7	 <p>Chemical structure of 1-(2-methyl-5-oxo-1,2,4-oxadiazol-5-yl)benzylidenehydrazinone. It features a 1,2,4-oxadiazole ring with a methyl group at position 2 and a carbonyl group at position 5. The carbonyl carbon is bonded to a nitrogen atom, which is further bonded to a benzylidene group (a methylene group attached to a phenyl ring).</p>
1180	309	1.2	 <p>Chemical structure of 1-(2-methyl-5-oxo-1,2,4-oxadiazol-5-yl)pyridin-4-ylmethylidenehydrazinone. It features a 1,2,4-oxadiazole ring with a methyl group at position 2 and a carbonyl group at position 5. The carbonyl carbon is bonded to a nitrogen atom, which is further bonded to a pyridin-4-ylmethylidene group (a methylene group attached to a pyridine ring at the 4-position).</p>
1181	306	1.7	 <p>Chemical structure of 1-(2-methyl-5-oxo-1,2,4-oxadiazol-5-yl)(3,4-dimethoxybenzylidene)hydrazinone. It features a 1,2,4-oxadiazole ring with a methyl group at position 2 and a carbonyl group at position 5. The carbonyl carbon is bonded to a nitrogen atom, which is further bonded to a 3,4-dimethoxybenzylidene group (a methylene group attached to a benzene ring with methoxy groups at positions 3 and 4).</p>
1182	290	2.9	 <p>Chemical structure of 1-(2-methyl-5-oxo-1,2,4-oxadiazol-5-yl)(4-carboxybenzylidene)hydrazinone. It features a 1,2,4-oxadiazole ring with a methyl group at position 2 and a carbonyl group at position 5. The carbonyl carbon is bonded to a nitrogen atom, which is further bonded to a 4-carboxybenzylidene group (a methylene group attached to a benzene ring with a carboxylic acid group at the 4-position).</p>
1183	291	1.04	 <p>Chemical structure of 1-(2-methyl-5-oxo-1,2,4-oxadiazol-5-yl)(4-nitrobenzylidene)hydrazinone. It features a 1,2,4-oxadiazole ring with a methyl group at position 2 and a carbonyl group at position 5. The carbonyl carbon is bonded to a nitrogen atom, which is further bonded to a 4-nitrobenzylidene group (a methylene group attached to a benzene ring with a nitro group at the 4-position).</p>

1184	336	2.12	 <p>Chemical structure of 1-(3,4,5-trimethoxybenzylidene)hydrazono-2-methyl-5-oxo-1,2,4-oxadiazole. The structure features a 1,2,4-oxadiazole ring with a methyl group at position 2 and a carbonyl group at position 5. The carbonyl carbon is double-bonded to a nitrogen atom, which is further double-bonded to a benzylidene group. The benzene ring of the benzylidene group is substituted with three methoxy (OMe) groups at the 3, 4, and 5 positions.</p>
1185	236	1.07	 <p>Chemical structure of 1-(furan-2-ylmethylidene)hydrazono-2-methyl-5-oxo-1,2,4-oxadiazole. The structure features a 1,2,4-oxadiazole ring with a methyl group at position 2 and a carbonyl group at position 5. The carbonyl carbon is double-bonded to a nitrogen atom, which is further double-bonded to a furan-2-ylmethylidene group.</p>
1186	297	1.67	 <p>Chemical structure of 1-(2-nitrothiophen-5-ylmethylidene)hydrazono-2-methyl-5-oxo-1,2,4-oxadiazole. The structure features a 1,2,4-oxadiazole ring with a methyl group at position 2 and a carbonyl group at position 5. The carbonyl carbon is double-bonded to a nitrogen atom, which is further double-bonded to a 2-nitrothiophen-5-ylmethylidene group.</p>
1187	303	1.65	 <p>Chemical structure of 1-(4-(acetamido)benzylidene)hydrazono-2-methyl-5-oxo-1,2,4-oxadiazole. The structure features a 1,2,4-oxadiazole ring with a methyl group at position 2 and a carbonyl group at position 5. The carbonyl carbon is double-bonded to a nitrogen atom, which is further double-bonded to a 4-(acetamido)benzylidene group.</p>
1188	281	2.0	 <p>Chemical structure of 1-(2-nitrofuran-5-ylmethylidene)hydrazono-2-methyl-5-oxo-1,2,4-oxadiazole. The structure features a 1,2,4-oxadiazole ring with a methyl group at position 2 and a carbonyl group at position 5. The carbonyl carbon is double-bonded to a nitrogen atom, which is further double-bonded to a 2-nitrofuran-5-ylmethylidene group.</p>
1189	262	0.83	 <p>Chemical structure of 1-(3-hydroxybenzylidene)hydrazono-2-methyl-5-oxo-1,2,4-oxadiazole. The structure features a 1,2,4-oxadiazole ring with a methyl group at position 2 and a carbonyl group at position 5. The carbonyl carbon is double-bonded to a nitrogen atom, which is further double-bonded to a 3-hydroxybenzylidene group.</p>
1190	268	1.06	 <p>Chemical structure of 1-(2-methyl-5-oxo-1,2,4-oxadiazol-5-ylmethylidene)hydrazono-2-methyl-5-oxo-1,2,4-oxadiazole. The structure features two 1,2,4-oxadiazole rings. The first ring has a methyl group at position 2 and a carbonyl group at position 5. The carbonyl carbon is double-bonded to a nitrogen atom, which is further double-bonded to the 5-position of a second 2-methyl-5-oxo-1,2,4-oxadiazole ring.</p>

1191	292	1.91	 <p>Chemical structure of 1-(4-methoxyphenyl)diazenyl-2-methyl-1H-imidazole-4-carboxamide. It features a 2-methyl-1H-imidazole-4-carboxamide core with a diazenyl group (-N=N-) attached to the carbonyl oxygen, which is further linked to a 4-methoxyphenyl ring. The methoxy group (OMe) and the hydroxyl group (OH) are highlighted in red.</p>
1199	289	0.6	 <p>Chemical structure of 1-(4-(dimethylamino)phenyl)diazenyl-2-methyl-1H-imidazole-4-carboxamide. It features a 2-methyl-1H-imidazole-4-carboxamide core with a diazenyl group (-N=N-) attached to the carbonyl oxygen, which is further linked to a 4-(dimethylamino)phenyl ring.</p>
1200	290	1.25	 <p>Chemical structure of 1-(benzofuran-2-yl)diazenyl-2-methyl-1H-imidazole-4-carboxamide. It features a 2-methyl-1H-imidazole-4-carboxamide core with a diazenyl group (-N=N-) attached to the carbonyl oxygen, which is further linked to a benzofuran ring system.</p>
1201	247	1.9	 <p>Chemical structure of 1-(pyridin-2-yl)diazenyl-2-methyl-1H-imidazole-4-carboxamide. It features a 2-methyl-1H-imidazole-4-carboxamide core with a diazenyl group (-N=N-) attached to the carbonyl oxygen, which is further linked to a pyridine ring.</p>
1202	283	3.5	 <p>Chemical structure of 1-(pyridin-2-yl)diazenyl-2-methyl-1H-imidazole-4-carboxamide. It features a 2-methyl-1H-imidazole-4-carboxamide core with a diazenyl group (-N=N-) attached to the carbonyl oxygen, which is further linked to a pyridine ring.</p>

ANEXO II

Cálculos para la preparación de moléculas en DMSO. Para una concentración inicial de 50mM.

$$n = \frac{\text{masa (gr)}}{\text{PM (g/mol)}} \quad \text{Volumen de DMSO (ml)} = \frac{n}{C_i \text{ (mM)}}$$

MOLÉCULA	PESO MOLECULAR (g/mol)	MASA (mg)	Volumen de Dimetil Sulfoxido (µL)
1167	188	1,77	18
1168	325	2,6	160
1172	262	1,54	118
1173	314	1,23	78
1174	252	2,76	219
1175	352	2,38	135
1176	326	1,03	63
1177	306	1,84	120
1178	246	1,7	138
1179	330	2,7	164
1180	309	1,2	78
1181	306	1,7	111
1182	290	2,9	200
1183	291	1,04	71
1184	336	2,12	126
1185	236	1,07	91
1186	297	1,67	112
1187	303	1,65	109
1188	281	2	142
1189	262	0,83	63
1190	268	1,06	79
1191	292	1,91	131
1199	289	0,6	42
1200	290	1,25	86
1201	217	1,9	154
1202	247	1,25	86
1203	247	1,5	121
1205	309	0,5	32
1207	312	0,6	38
1210	250	0,5	40
1213	300	1,4	93
1214	292	1,04	71
1215	290	0,85	59
1253	246	2,22	180
1283	201	0,8	80

Tabla 7.-Compuestos derivados de la molécula twin 28 a Los datos del peso molecular (PM) son proporcionados por el laboratorio que sintetizó las moléculas. La masa (mg) se midió en el laboratorio en un balanza de precisión.

ANEXO III

Titulación de dosis infectante DICT50%

A) Este método toma en cuenta el efecto citopático (ECP) que exhibe cada pozo, buscando el 50% del total de los pozos. En cada dilución se registro el desarrollo del ECP :

0- sin ECP

1-parcial con menos 50% presentan ECP

2-cerca del 50% presentan ECP

3-cerca del 75% presentan ECP

4-la monocapa esta totalmente destruida

Se consideró positivo 1-4 para ECP. Los cálculos para hallar la dilución al 50% se tomo en cuenta los valores cercanos (superior e inferior). Siendo la distancia proporcional entre las diluciones calculadas como:

$$\text{Distancia proporcional} = \frac{(\% \text{ superior } 50\% - 50\%)}{(\% \text{ superior } 50\% - \% \text{ abajo } 50\%)}$$

$$\text{DICT}_{50} = (\log \text{ dilucion superior } 50\%) + (\text{distancia proporcional} \times \log \text{ factor de dilución})$$

B) Tinción con cristal violeta

1% Solución stock de cristal violeta (100 ml)

1 g cristal violeta

20 ml 100% ethanol

80 ml dH₂O

Solución de trabajo cristal violeta

40 ml 1% solución stock cristal violeta

80 ml metanol

180 ml dH₂O

Log de la dilucion viral	Pocillos infectados	Pocillos no infectados	Frecuencia acumulada de infectados (A)	Frecuencia acumulada de no infectados (B)	A/(A+B)	Porcentaje de infecci3n
-2	7/7	0/7	27	0	27/27	100
-3	7/7	0/7	20	0	20/20	100
-4	7/7	0/7	13	0	13/13	100
-5	6/7	1/7	6	1	6/7	86
-6	0/7	7/7	0	8	0/8	0
-7	0/7	7/7	0	15	0/15	0
-8	0/7	7/7	0	22	0/22	0
-9	0/7	7/7	0	29	0/29	0
-10	0/7	7/7	0	36	0/36	0

Tabla 5.- Datos de las observaciones de la infecci3n con la cepa 94N/230 utilizando el m3todo de Reed and Muench, (Reed aet al 1938)

Log de la dilucion viral	Pocillos infectados	Pocillos no infectados	Frecuencia acumulada de infectados (A)	Frecuencia acumulada de no infectados (B)	A/(A+B)	Porcentaje de infecci3n
-2	9/9	0/9	79	0	0/79	100
-3	9/9	0/9	70	0	0/70	100
-4	9/9	0/9	61	0	0/61	100
-5	9/9	0/9	52	0	0/52	100
-6	9/9	0/9	43	0	0/43	100
-7	9/9	0/9	34	0	0/34	100
-8	9/9	0/9	25	0	0/25	100
-9	7/9	2/9	16	2	16/18	90
-10	9/9	0/9	9	2	9/11	81

Tabla 6- Datos de las observaciones de infecci3n con la cepa 98B/701 utilizando el m3todo de Reed and Muench, (Reed et al 1938).

ANEXO IV

Ensayo de rojo neutro

Preparación de la solución de stock de rojo neutro 4mg/ml:

40mg de rojo neutro en 10ml de PBS.

Se guarda hasta por 2 meses temperatura ambiente (20-30°C) protegido de la luz.

Preparación de la solución de extracción de rojo neutro:

30% etanol en agua miliq

1% ácido acético glacial

Cálculo de la densidad óptica (DO) :

DO: Medida de la densidad óptica del rojo neutro presente en el sobrenadante.

% de inhibición del crecimiento celular = $100 - (DO(t)/DO(c) \times 100)$

donde:

DO (t) es la densidad óptica después de la exposición a una concentración de la molécula.

DO (c) es la densidad óptica del control. En el cual no debe haber salida de rojo neutro al medio

ANEXO V

Estructura de la molécula de ribavirina

Es un análogo de nucleósido con actividad antiviral de amplio espectro incluso contra virus respiratorio sincial.

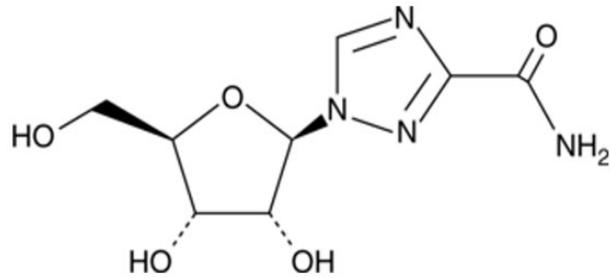


Fig. 21 Estructura química de la ribavirina.