



LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA DE VIRUS INFLUENZA Y
OTROS VIRUS RESPIRATORIOS

DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE
PÉPTIDOS ANÁLOGOS DE DEFENSINAS DE INVERTEBRADOS
CONTRA EL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO HUMANO.

Tesis presentada en opción al Título Académico de
Maestro en Microbiología

Mención: Virología

DAYANA DOCE SOSA

La Habana

2019



LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA DE VIRUS INFLUENZA Y
OTROS VIRUS RESPIRATORIOS

DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE
PÉPTIDOS ANÁLOGOS DE DEFENSINAS DE INVERTEBRADOS
CONTRA EL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO HUMANO.

Tesis presentada en opción al Título Académico de
Maestro en Microbiología

Mención: Virología

Autor(a): Lic. DAYANA DOCE SOSA

Tutor(as): Lic. Odalys Valdés Ramírez, DrC

Lic. Lissette Pérez Santos, DrC

Asesor(as): Lic. Mayra Muné Jiménez, DrC

Lic. Vivian Montero Alejo, DrC

La Habana

2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

A mi hija, por ser mi fuente de inspiración.

A mis padres, por prepararme para la vida, por confiar siempre en mí, por la fuerza y el aliento constante.

A mi esposo, por su infinita paciencia, su amor incondicional, por las largas noches de desvelo sentado a mi lado, esperando por mí.

A mi hermana y mi familia toda, por el amor, por entender mi ausencia, por apoyar mis metas y alegrarse por mis triunfos.

A mis amigas de toda la vida, por compartir conmigo mis anhelos y sueños.

A mis dos excelentes tutoras. A Odalys por la paciencia, por su dedicación, por la guía certera. A Lissette por su experiencia en cultivo celular, su disponibilidad, su preocupación. A las dos miles de gracias por confiar en mí, por el cariño brindado en estos largos meses de preparación, por su amistad.

A Mayra por su esfuerzo, colaboración y asesoría crítica en la revisión de este trabajo.

A Yudira por su apoyo y asesoría en el área de la estadística.

A mis compañeras de maestría: Yanet, Daylin y Anamarys, por su amistad, por el apoyo colectivo, la camaradería, por las horas de estudio y nervios compartidas, sin ustedes este camino hubiese sido mucho más difícil.

A Lissette, Magile, Yani, Yaicel por estar ahí para nosotras cuatro, compartiendo historias de vida, experiencias, por hacernos reír, por mitigar nuestros nervios, incertidumbres...

A mis compañeras del laboratorio de Microbiología del hospital CIMEQ, donde comencé dando mis primeros pasos en el infinito mundo de la Microbiología.

A mi Jefa y compañera Aymara, por abrirme las puertas al mundo de la Biotecnología y la Virología.

A Yamira, por ser mi compañera, mi amiga, mi otra mami.

AGRADECIMIENTOS

A mis compañeros del Laboratorio de Control de la Calidad del CIM, por echar de menos mi ausencia, por preocuparse por la evolución de mi tesis, por alegrarse por las metas alcanzadas.

Y por último y no por ello menos importantes: A todos los integrantes del Departamento de Virología del IPK, muy especialmente a los del Laboratorio de virus influenza y otros virus respiratorios, que me hicieron sentir parte de su colectivo, sufrieron conmigo las decepciones de los ensayos fallidos y se alegraron con los éxitos alcanzados.

GRACIAS a todos, a los que mencioné y a los que sin querer, olvidé nombrar. **MILES DE GRACIAS!!!!!!!!!!**

DEDICATORIA

A mis padres: por su apoyo incondicional.

A mi esposo: por su amor infinito, por su paciencia.

A mi pequeña Ana Laura, la luz de mi vida: este trabajo es por y para tí.

“La ciencia no sabe de países, porque el conocimiento le pertenece a la humanidad y es la antorcha que ilumina al mundo. La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de todo progreso”.

Louis Pasteur

RESUMEN

El virus sincitial respiratorio humano es la principal causa de infecciones del tracto respiratorio inferior en niños pequeños, ancianos y pacientes inmunocomprometidos. En la actualidad, no existe tratamiento antiviral específico por lo que el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas es de elevada prioridad. En este sentido, los péptidos análogos de defensinas de invertebrados constituyen candidatos prometedores por sus atractivas propiedades antivirales. En este estudio se evaluó la actividad antiviral *in vitro* de variantes peptídicas sintéticas derivadas de moldes naturales de la familia *panusin* frente al virus sincitial respiratorio humano en la línea celular Vero. Los estudios de citotoxicidad de estas variantes peptídicas se realizaron a concentraciones entre 6,25-100 μ M. Seguidamente se determinó la actividad antiviral de estos péptidos mediante los ensayos de evaluación primaria de la actividad antiviral, reducción del título infectivo y ensayo virucida. Las variantes peptídicas a las concentraciones evaluadas no fueron citotóxicas en las células Vero. El péptido correspondiente a la región carboxilo terminal de *panusin* mostró actividad antiviral parcial frente a los subgrupos A y B del virus sincitial respiratorio humano. Algunos péptidos redujeron el título viral indicando la capacidad de estos para inhibir la formación de nuevas partículas virales infectivas. Las variantes peptídicas evaluadas no mostraron actividad neutralizante sobre la partícula viral. Estos resultados sugieren que el péptido correspondiente a la región carboxilo terminal de *panusin* pudiera tener un efecto importante en la protección celular contra la infección por el virus sincitial respiratorio humano.

LISTADO DE ABREVIATURAS

IRA: infecciones respiratorias agudas

VSRh: Virus Sincitial Respiratorio humano

MINSAP: Ministerio de Salud Pública de Cuba

LNR: Laboratorio Nacional de referencia

IPK: Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí

TRI: tracto respiratorio inferior

AcMh: anticuerpo monoclonal humanizado

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos (del inglés, *Food and Drugs Administration*)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAMs: péptidos antimicrobianos

hBD: beta defensinas humanas

PADs: péptidos análogos de defensinas

CIDEM: Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos

CCA: agente de la coriza del chimpancé (del inglés, *chimp coryza agent*)

ARN: ácido ribonucleico

aa: aminoácidos

C-terminal: carboxilo terminal

gp: glicoproteína

nt: nucleótidos

LISTADO DE ABREVIATURAS

N-terminal: amino terminal

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

ORF: marco abierto de lectura (del inglés, *open reading frame*)

IFN- α : interferón alfa

Stat-2: señal de transducción y activación de la transcripción 2 (del inglés, *signal transducer and activator of transcription*)

IRF-3: factor regulador del interferón 3 (del inglés, *interferón regulatory factor 3*)

NF- κ B: factor nuclear Kappa activador de células B (del inglés, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

RANTES: regulador de la expresión, activación y secreción de células T normales (del inglés, *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*)

CAP: caperuza

TLR-4: receptor tipo Toll 4 (del inglés, *toll like receptor*)

TRS: tracto respiratorio superior

Ag: antígeno

DCs: células dendríticas

IL: interleuquinas

Th: T auxiliaoras (del inglés: *helper*)

Ac: anticuerpos

IAAS: infecciones asociadas a la asistencia sanitaria

LISTADO DE ABREVIATURAS

AAP: Asociación Americana de Pediatría

NICE: Instituto Nacional de Excelencia en Salud y Atención (del inglés: *National Institute of Excellence in Health and Care*)

Ig: inmunoglobulina

siRNA: ARN pequeños de interferencia (del inglés, *small interference RNA*)

NK: asesinas naturales (del inglés, natural killer)

VIH-1: virus de la inmunodeficiencia humana -1

HSV-2: virus herpes simple-2

VSV: virus de la estomatitis vesicular

CMV: citomegalovirus

ECP: efecto citopático

CIGB: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

ATCC: American Type Culture Collection

CIM: Centro de Inmunología Molecular

EMEM: Medio mínimo esencial de Eagle (del inglés: *Eagle's Minimum Essential Medium*)

SFBI: suero fetal bovino inactivado

EDTA: ácido tetra acético diamino etileno (del inglés, *Ethylene diamine tetra acetic acid*)

DMSO: dimetilsulfóxido anhidro

LISTADO DE ABREVIATURAS

PBS: tampón fosfato salino (del inglés, *phosphate buffer saline*)

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio

DO: densidad óptica

CC₅₀: concentración citotóxica media

R²: coeficiente de determinación

DICT₅₀/mL: dosis infectiva media en cultivo de tejidos

IC₉₅%: intervalo de confianza del 95%

CV: coeficiente de variación

DS: desviación estándar

IFI: inmunofluorescencia indirecta

CE₅₀: concentración efectiva media

IS: índice selectivo

RAV: reducción del título infectivo por acción virucida

ÍNDICE	ÍNDICE
	“Pág.”
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	4
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
III.1. Virus Sincitial Respiratorio humano	5
III.1.1. Clasificación y Características generales	5
III.1.2. Proteínas virales	6
III.1.3. Genoma	9
III.1.4. Replicación viral	10
III.1.4.1. Receptores celulares	10
III.1.4.2. Ciclo replicativo	10
III.1.5. Manifestaciones clínicas	11
III.1.6. Patogenia y patología	12
III.1.7. Respuesta Inmune	13
III.1.8. Epidemiología	14
III.1.9. Prevención y tratamiento	15
III.1.9.1. Vacunas	16
III.1.9.2. Inmunización pasiva	16
III.1.9.3. Terapia antiviral	17
III.1.9.3.1. Inmunoglobulina	17

ÍNDICE

III.1.9.3.2. Análogos de nucleósidos	18
III.1.9.3.3. ARN de interferencia	18
III.1.9.3.4. Inhibidores de la fusión	18
III.2. Péptidos antimicrobianos	19
III.2.1. Características generales de los péptidos antimicrobianos	19
III.2.2. Mecanismos de acción antiviral	21
III.3. Defensinas	21
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	25
IV.1. Células y Medios de cultivo	25
IV.1.1. Líneas celulares	25
IV.1.2. Medios de cultivos	25
IV.1.3. Reactivos y soluciones	25
IV.2. Cepas Virales	26
IV.3. Péptidos truncados análogos de β -defensinas	26
IV.4. Determinación de la citotoxicidad de las variantes peptídicas en la línea celular Vero	27
IV.5. Caracterización de la actividad antiviral <i>in vitro</i> de variantes peptídicas sintéticas derivadas de moldes naturales de la familia <i>panusin</i> frente a las cepas de VSRh-A y VSRh-B	28
IV.5.1. Obtención y titulación de bancos virales	28
IV.5.2. Ensayo de Inmunofluorescencia indirecta	30

ÍNDICE

IV.5.3. Ensayo de evaluación primaria de la actividad antiviral	30
IV.5.4. Ensayo de inhibición del título infectivo	31
IV.5.5. Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta	32
IV.5.6. Ensayo de Actividad Virucida	32
IV.6. Análisis estadístico	33
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
V.1. Determinación de la citotoxicidad de las variantes peptídicas en la línea celular Vero	34
V.2. Caracterización de la actividad antiviral <i>in vitro</i> de variantes peptídicas sintéticas derivadas de moldes naturales de la familia <i>panusin</i> frente a las cepas de VSRh-A y B	36
V.2.1. Obtención y titulación de los bancos virales	37
V.2.2. Ensayo de Inmunofluorescencia	38
V.2.3. Ensayo de evaluación primaria de la actividad antiviral	40
V.2.4. Ensayo de inhibición del título infectivo	44
V.2.5. Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta	47
V.2.6. Ensayo de Actividad Virucida	50
VI. CONCLUSIONES	55
VII. RECOMENDACIONES	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad en todos los grupos de edades, especialmente en niños pequeños, adultos mayores y pacientes inmunocomprometidos. El virus sincitial respiratorio humano (VSRh) es la principal causa de bronquiolitis y neumonía en lactantes y niños pequeños (Hall, 2001; Shay et al., 2001; Thompson et al., 2003). Cada año ocurren 34 millones de nuevas infecciones por VSRh en niños menores de 5 años, alrededor del 10% de estos niños requieren hospitalización y de ellos más de 200 000 mueren. La mayoría de los casos fatales ocurren en países subdesarrollados, donde este virus es la segunda causa de muerte después de la malaria. No obstante, en los países industrializados es la causa principal de hospitalización en lactantes (Lozano et al., 2012; Nair et al., 2010).

En Cuba, las IRA constituyen la primera causa de consultas en los distintos niveles del Sistema Nacional de Salud. Según los diferentes grupos de edades, los niños menores de 5 años son los más afectados por estas infecciones (MINSAP, 2018). Desde el año 2000, el Ministerio de Salud Pública de Cuba (MINSAP) implementó un Programa Integral de Atención y Control de las IRA para la prevención y control de estas infecciones respiratorias (MINSAP, 2013). Los datos del Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) de virus influenza y otros virus respiratorios del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK) muestran que el VSRh es el principal patógeno que causa infecciones del tracto respiratorio inferior (TRI) en lactantes y niños pequeños cada año.

El desarrollo de una vacuna contra este importante patógeno, es de alta prioridad para la salud pública mundial. Actualmente, no existe una vacuna o un tratamiento seguro y efectivo contra este virus (Englund and Chu, 2017). Para el tratamiento profiláctico, solo se encuentra disponible un anticuerpo monoclonal humanizado (AcMh) (Palivizumab), el que reduce significativamente la severidad de la enfermedad y la estadía hospitalaria (Feltz et al., 2003), sin embargo, es altamente costoso y solo se recomienda su uso en niños con alto riesgo para la vida (Palivizumab, 1998).

La Ribavirina es actualmente la única droga antiviral aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, del inglés *Food and Drugs Administration*) de los Estados Unidos, para el tratamiento de las infecciones severas por el VSRh, sin

embargo, debido a su poca efectividad, alto costo y toxicidad, su uso es limitado. El tratamiento de sostén (suministro de oxígeno, eliminación de secreciones e hidratación intravenosa) constituye la principal medida para mejorar la gravedad del cuadro clínico del paciente (Diseases, 2014; Evans and Yanney, 2015).

En los últimos 10 años la comunidad internacional ha mostrado un gran interés en el desarrollo de nuevos compuestos antivirales. De igual forma, se han desarrollado varios candidatos vacunales que se encuentra en fase I y II de ensayos clínicos (Walsh, 2017). Es por ello que, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en los próximos 5-10 años estarán disponibles nuevos antivirales y una vacuna eficaz y segura dirigida a poblaciones de riesgo que desarrollen infección severa por el VSRh (Drysdale et al., 2016).

A pesar de los avances obtenidos en el desarrollo de nuevos candidatos terapéuticos o profilácticos contra el VSRh, se hace necesaria la búsqueda de terapias más efectivas. En este sentido, los péptidos antimicrobianos (PAMs) se han convertido en una alternativa prometedora en el desarrollo de nuevos compuestos o sustancias antivirales (Hoover et al., 2003). Estos son moléculas de bajo peso molecular que se producen por todos los organismos vivos. En general, son hidrofóbicos y anfipáticos a pH fisiológico (Otero-González et al., 2010). Los PAMs constituyen los componentes efectores fundamentales de la respuesta inmune innata, presentan un amplio espectro de actividad contra bacterias, virus, hongos y protozoos (Bulet and Stocklin, 2005; Castro and Fontes, 2005; Groot et al., 2006).

En los mamíferos, los PAMs se dividen en catelicidinas y defensinas (Guaní-Guerra et al., 2010). Las defensinas son péptidos catiónicos y anfipáticos, con una estructura terciaria muy conservada estabilizada por enlaces disulfuros, que contienen seis residuos de cisteínas. En humanos solo se expresan 6 α -defensinas y 31 β -defensinas (Boman, 1995; Ganz et al., 1985). Las α -defensinas son péptidos altamente conservados y se subdividen en mieloides (HNP1-4) y entéricas (HD5 y HD6) (Selsted and Ouellette, 2005). Las β -defensinas humanas (hBDs) se expresan ampliamente en las células epiteliales de la piel y de la superficie mucosa en contacto con el medio ambiente. Los tres miembros fundamentales son hBDs 1-3, los cuales difieren en su capacidad para eliminar microorganismos (Bauer et al., 2001). Las hBD-1 y 2 muestran actividad bactericida *in vitro* frente a bacterias Gram negativas y levaduras, actividad

bacteriostática frente a bacterias Gram positivas (Harder et al., 1997) y actividad fungistática (Newman SL, 2000). Su acción antimicrobiana se afecta por altas concentraciones de sales en el medio (Goldman et al., 1997; Hoover et al., 2001; Valore et al., 1998). La hBD-3 es más catiónica y la única que presenta un amplio espectro antimicrobiano, muy baja actividad hemolítica y es resistente a concentraciones de sales en el medio de hasta 150 μM , aspectos que la destacan como una molécula promisoría para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos (Hoover et al., 2003; Montero-Alejo et al., 2017).

Los péptidos análogos de defensinas (PADs) muestran un amplio espectro de actividad antiviral, principalmente frente a los virus envueltos. La neutralización de la partícula viral o la interacción con las proteínas virales de la cápside son los mecanismos de acción más reportados (Wilson et al., 2013). En la última década, se han identificado a nivel de transcritos, una nueva familia de péptidos de tipo β -defensinas en invertebrados marinos, específicamente en crustáceos (Montero-Alejo et al., 2012; Pisuttharachai et al., 2009a; Pisuttharachai et al., 2009b). Recientemente, Montero-Alejo y colaboradores identificaron el primer miembro peptídico con actividad antimicrobiana, obtenido de los hemocitos de la langosta espinosa *Panulirus argus*, denominado *panusín*, que presenta cierta similitud e identidad de secuencia con las hBD-3 (Montero-Alejo et al., 2017). *Panusín* muestra actividad antimicrobiana de amplio espectro y es resistente a altas concentraciones de sales en el medio. Debido a la similitud presentada entre las hBD y los PADs en crustáceos, es posible que estos últimos también muestren acción antiviral como parte de su actividad biológica.

Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado, en el presente estudio nos proponemos evaluar la actividad antiviral *in vitro* de los péptidos sintéticos truncados análogos de la familia de β -defensinas de invertebrados, obtenidos en el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Los resultados de esta investigación son de gran importancia para desarrollar nuevos o posibles candidatos o fármacos antivirales de forma segura y efectiva contra el VSRh.

II. OBJETIVOS

General

Evaluar la actividad antiviral *in vitro* de péptidos sintéticos análogos de β -defensinas de invertebrados, contra el virus sincitial respiratorio humano.

Específicos:

1. Determinar la citotoxicidad de las variantes peptídicas sintéticas derivadas de moldes naturales de la familia *panusin* en las células Vero.
2. Caracterizar la posible actividad antiviral *in vitro* de las variantes peptídicas contra las cepas de VSRh- A y B.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

III.1. Virus Sincitial Respiratorio humano

El VSRh es el causante principal de infecciones respiratorias agudas en niños, ancianos y pacientes inmunocomprometidos (Avadhanula et al., 2014; Gonzalez et al., 2012). Este virus causa bronquiolitis severa y neumonía en niños menores de 2 años, los principales signos clínicos son: tos frecuente y sibilancias (Halasa et al., 2015; Hirano et al., 2014). El VSR se aisló por primera vez en el año 1956 del aparato respiratorio de un chimpancé con enfermedad respiratoria, durante un brote de una enfermedad semejante al resfriado común, por lo que fue llamado inicialmente "agente de la coriza del chimpancé" (CCA, por sus siglas en inglés). Posteriormente, Chanock y colaboradores en 1957 aislaron el virus en dos niños hospitalizados con bronconeumonía y laringotraqueobronquitis, el mismo fue indistinguible serológica (neutralización por sueros anti CCA) y fenotípicamente (efecto citopático) del CCA. A partir de entonces, el virus se denominó "Virus Sincitial Respiratorio", debido a su capacidad de formar sincitios en cultivos celulares infectados y por considerarse un patógeno del tracto respiratorio (Chanock and Finberg, 1957).

III.1.1. Clasificación y características generales

El VSR pertenece al género *Orthopneumovirus*, dentro de la familia *Pneumoviridae*, se clasifica dentro del grupo V de la clasificación de Baltimore, orden *Mononegavirales*. Los miembros de este género son el VSR humano, VSR bovino y virus de la neumonía del ratón (Rima et al., 2017). Entre las características que la distinguen están: virión pleomórfico, esférico y filamentoso con un diámetro de 150 a 300 nm; genoma compuesto por ARN de polaridad negativa, lineal y no segmentado de 16 a 20 kilobases (kb), que se encuentra en el interior de una nucleocápside helicoidal, la cual lo hace resistente a la digestión con ribonucleasas. La replicación ocurre en el citoplasma. La penetración en la célula es mediante el mecanismo de fusión. Los viriones adquieren la envoltura lipídica al salir de la célula infectada por gemación (Collins et al., 2007) (Figura 1).

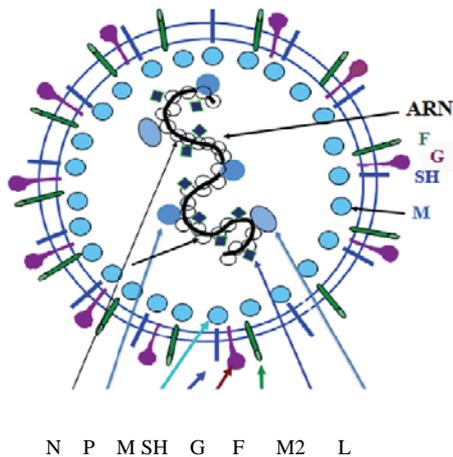


Figura 1: Esquema de la estructura del VSRh
Fuente: (Díaz et al., 2017)

III.1.2. Proteínas virales.

Proteínas estructurales.

Nucleoproteína (N): Es la proteína principal de la nucleocápside. Sus abundantes monómeros conforman la cápside viral, donde se encuentra el genoma viral. Su tamaño oscila entre 489 y 553 aminoácidos (aa). Esta se localiza con las proteínas P y M2 (22K), en inclusiones citoplasmáticas presentes en las células infectadas con el virus o transfectadas con plásmidos que expresan los genes P y M2 (22K). El complejo N-ARN es el molde funcional para la transcriptasa y la replicasa viral. La proteína N posee varias funciones en la replicación viral: participa en la encapsidación del ARN geonómico, se asocia con las proteínas P-L durante la transcripción y la replicación del virión, y puede interactuar con la proteína M durante el ensamblaje del virus (Collins et al., 2007).

Fosfoproteína (P): Es una proteína altamente fosforilada en los residuos de serina, que se encuentran localizados principalmente en las zonas central y carboxi terminal (C-terminal) de la molécula (Lopez et al., 1988; Mazumder and Barik, 1994; Villanueva et al., 1994). Actúa como cofactor de la ARN polimerasa, facilita la actividad de la replicasa y la transcriptasa viral e interactúa, mediante fuerzas hidrofóbicas, con la proteína N, permitiendo que esta se mantenga en forma soluble y disponible para el ensamblaje de la nucleocápside (Collins et al., 2007).

Polimerasa viral (L): A esta proteína se le atribuye la actividad de ARN polimerasa ARN dependiente. Es muy similar en longitud a las polimerasas de otros virus ARN de genoma no segmentado y polaridad negativa. Se encarga de la transcripción y replicación del genoma viral. Es

poco hidrofóbica, con un alto contenido de leucina e isoleucina. Junto con las proteínas P y N forman el complejo requerido para la actividad polimerasa (Collins et al., 2007).

Proteína Matriz (M): Es una proteína no glicosilada que se localiza en la cara interna de la envoltura viral. Posee un dominio hidrofóbico en el tercio C-terminal de la molécula, que media la interacción con la membrana. Se acumula en la membrana plasmática e interactúa con la nucleocapside y la proteína F para regular el proceso de morfogénesis del virión, siendo esencial en la formación de la partícula viral (Collins et al., 2007).

Glicoproteínas (gp) de la envoltura: Las proteínas G, F y SH son gp de superficie (que además son estructurales y transmembranales) y su función es mediar la entrada del virus a la célula hospedera.

Glicoproteína de fusión (F): Es una proteína integral de membrana tipo I, que se inserta en la membrana por la región hidrofóbica C-terminal. Se sintetiza como un precursor inactivo F₀. Dicho precursor se escinde por la acción de una proteasa extracelular, generando dos subunidades F1 y F2 que permanecen unidas por puentes disulfuros, obteniéndose una proteína biológicamente activa (González-Reyes et al., 2001). Esta proteína tiene la función de inducir la fusión (independiente del pH) de la envoltura viral con la membrana plásmática de la célula huésped y entre las células adyacentes; lo que promueve la formación de sincitios y permiten la propagación directa del virus (Walsh and Hruska, 1983). Es esencial para la replicación viral (Heminway et al., 1994).

Glicoproteína de unión (G): Es la responsable de la unión del virus al receptor celular en las primeras etapas del ciclo replicativo (Sullender et al., 1991). No posee actividad hemaglutinina ni neuraminidasa. La secuencia de nucleótidos (nt) del gen codifica para un polipéptido de 282-321 aa. Está altamente glicosilada y tiene una estructura no globular, cuyo ectodominio presenta similitud con las mucinas (Collins et al., 2007). Es una gp transmembrana tipo II. Presenta una región hidrofóbica cerca del extremo amino-terminal (N-terminal), que actúa como péptido señal y como anclaje a la membrana, dejando dos terceras partes de la molécula orientadas hacia el exterior en el extremo C-terminal. Se sintetiza como forma soluble, debido a la iniciación de la traducción en un segundo codón de iniciación, que está en fase con el primero, situado en el aa 48, el cual se encuentra dentro de la región hidrofóbica (Hendrickson et al., 1998; Roberts et al., 1994).

Glicoproteína pequeña e hidrófoba (SH): Es una proteína transmembrana, que presenta una región hidrofóbica central extensa y dos sitios potenciales de glicosilación, uno a cada extremo de la proteína. Esta se acumula en las células infectadas en cuatro formas diferentes (SH₀, SH_t, SH_g y SH_p), dos de

ellas glicosiladas (SHg y SHp). Participa junto con las gps F y G en la formación de sincitios en las células infectadas (Collins et al., 2007). Se desconoce cuál es su papel biológico, aunque algunos estudios sugieren que podría participar en varios aspectos como: la fusión celular, en el cambio de permeabilidad de la membrana y el bloqueo de la apoptosis mediada por el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Masante et al., 2014).

Proteína codificada por el gen M2: El gen M2 tiene la peculiaridad de que cuenta con 2 marcos abiertos de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) que se solapan en 32 nt. Esto da origen para que el producto del primer ORF sea una proteína **M2-1** (ORF-1) que da lugar a un polipéptido de 22KDa. Esta es un antiterminador de la transcripción, esencial para la infectividad del virus. El segundo ORF, codifica para la proteína **M2-2**, que actúa como un factor regulador implicado en el equilibrio entre la replicación y la transcripción del ARN (Shahriari et al., 2016). Es poco hidrofílica. Se localiza con las proteínas N y P, en los cuerpos de inclusión citoplasmáticos presentes en las células infectadas por el VSRh.

Proteínas no estructurales

NS1 y NS2: Proteínas constituidas por 139 y 124 aa, respectivamente. No están presentes en los viriones maduros, aunque abundan en las células infectadas. No son esenciales para la replicación, pero se ha demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo* en ratas de algodón, chimpancés y monos verdes africanos, que la delección de cualquiera de los genes de estas proteínas, atenúan significativamente la replicación viral (Jin et al., 2003; Jin et al., 2000; Teng et al., 2000). Además se conoce que estas proteínas están implicadas en la evasión de la respuesta inmune innata durante una infección viral. Esto se debe a que ambas tienen funciones inmunomoduladoras, porque bloquean la señalización intracelular del interferón alfa (IFN- α) al inhibir la proteína Stat-2 (del inglés, *signal transducer and activator of transcription 2*), que se trasloca al núcleo en respuesta a IFN α/β y funciona como activador de la transcripción (Lo et al., 2005). Otros factores intracelulares inhibidos por NS1 y NS2 son el IRF-3 (del inglés, *interferón regulatory factor 3*) y el NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), que son los responsables de la transcripción de IFN- α/β y otras citoquinas como las RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), cuya función como quimiocinas es importante porque ayuda a atraer células T, eosinófilos y basófilos durante la respuesta inmune antiviral (Spann et al., 2005).

III.1.3. Genoma

El genoma del VSRh está constituido por una molécula de ARN monocatenario, de polaridad negativa y de aproximadamente 15 kb, que contiene 10 genes y codifica para 11 ARNm. Cada uno de ellos contiene un ORF, con excepción del gen M2 que contiene dos ORF. Los ARNm presentan una caperuza (CAP) en el extremo 5' y están poliadenilados en el extremo 3'. Cada gen comienza con una secuencia de 10 nt altamente conservada, a excepción del gen L, cuya función es controlar el inicio de la transcripción y la adición de la CAP, y concluye con una secuencia semiconservada de 12-13 nt, que dirige la terminación de la transcripción y la poliadenilación del ARNm. Los nueve primeros genes, están separados por regiones intergénicas que varían en longitud de 1-56 nt y carecen de secuencias consenso (Kuo et al., 1996, 1997). Los dos últimos genes, M2 y L, se solapan en 68 nt, por lo que la señal de inicio del gen L se localiza dentro del gen M2 (Fearn and Collins, 1999). En cada extremo del ARNv se encuentran dos regiones no codificantes, una hacia el extremo 3' de 44 nt, y otra de 159 nt en el extremo 5'. Veintiuno de los últimos 24-26 nt de ambos extremos, son complementarios, lo que indica un alto grado de identidad entre los promotores de los extremos 3' del ARN genómico y antigenómico (Mink et al., 1991) (Figura 2).

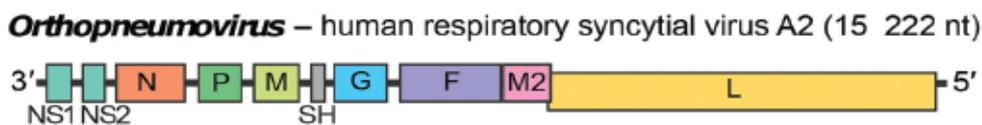


Figura 2: Organización del genoma del VSRh.

Fuente: (Rima et al., 2017)

Mediante estudios de cinéticas de inactivación de la transcripción por luz ultravioleta y experimentos con minigenomas dicistrónicos, se comprobó que la transcripción se produce de forma secuencial desde el extremo 3'. En el modelo propuesto, la polimerasa viral se detiene y reinicia la síntesis de ARNm en cada secuencia intergénica (Dickens et al., 1984). Como consecuencia de la superposición, la señal de inicio del gen L se encuentra dentro de la señal de terminación del gen M2. Debido a esto, la polimerasa transcribe dos veces la señal de terminación, una durante la síntesis del ARNm del gen M2 y la otra durante la síntesis del ARNm del gen L. Como en todos los *Mononegavirus*, existe un gradiente transcripcional, de manera que los genes más próximos al promotor se transcriben con mayor frecuencia (Collins et al., 2007). Este mecanismo, junto con la presencia de regiones intergénicas y la longitud de los genes, actúan como reguladores de la transcripción (Hardy et al., 1999; Kuo et al.,

1997). Se ha descrito, que la transcripción es dependiente de las proteínas celulares actina y profilina (Burke et al., 1998; Burke et al., 2000).

III.1.4. Replicación viral

III.1.4.1. Receptores celulares

Los receptores constituyen las dianas obvias para el desarrollo terapéutico ya que le permiten al virus la entrada a la célula hospedera. Entre los receptores descritos que participan en la entrada del VSRh a la célula se encuentran: anexina II (Malhotra et al., 2003), receptor 1 de quimiocina CX3C (Johnson et al., 2015; Tripp et al., 2001), receptor del factor de crecimiento epidérmico (Currier et al., 2016), lectinas dependientes de calcio (Malhotra et al., 2003), receptor tipo Toll 4 (TLR-4) (Kurt-Jones et al., 2000; Marchant et al., 2010), molécula de adhesión intercelular 1 (Behera et al., 2001), nucleolina (Holguera et al., 2014; Tayyari et al., 2011), y proteoglicanos de sulfato heparán (Krusat and Streckert, 1997).

III.1.4.2. Ciclo replicativo

La expresión y replicación de los genes virales se produce en el citoplasma, una vez allí se libera la nucleocápside y el genoma viral. El gen M2-2 inicia el proceso de transcripción, la polimerasa ingresa al genoma en su extremo 3' y los genes se transcriben en ARNm mediante la síntesis de inicio-parada-reinicio. Esto crea un gradiente de transcripción en el que los genes de inicio del promotor se transcriben con más frecuencia que los genes que están al final. La replicación genera un ARN complementario de sentido positivo denominado antígenoma, que actúa como una plantilla para la síntesis del genoma viral (Cowton et al., 2006). El genoma y el antígenoma están recubiertos con la proteína N en todo momento, lo que sirve como plantilla para la síntesis de ARN. La proteína M regula el ensamblaje del VSRh al interactuar con las proteínas F y G de la envoltura y con las proteínas N, P y M2-1 de la nucleocápside. Las nuevas proteínas sintetizadas son autoensambladas para formar la partícula viral adquiriendo la envoltura de la membrana de las células infectadas. El genoma de VSRh consiste en una sola hebra de ARN de sentido negativo, que se transcribe y replica por la ARN polimerasa dependiente de ARN del virus en el citoplasma de la célula huésped (Ashrafuzzaman et al., 2017) (Figura 3).

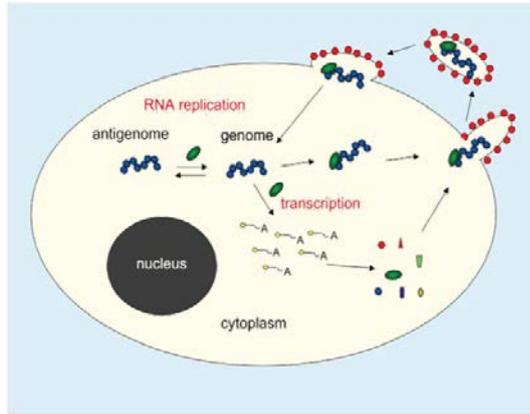


Figura 3: Transcripción y replicación del VSRh

Fuente: (Ashrafuzzaman et al., 2017)

III.1.5. Manifestaciones clínicas

El VSRh causa un amplio rango de enfermedad que varía desde un resfriado común hasta una infección del TRI, como la bronquiolitis y la neumonía, las cuales requieren hospitalización (Iwane et al., 2013; Midulla et al., 2010). El inicio de los síntomas incluye astenia, coriza, congestión nasal y rinitis, también puede presentarse fiebre ($\leq 38^{\circ}\text{C}$) intermitente. Una vez que se desarrolla la tos, los niños pueden comenzar con sibilancia y frecuentemente se produce otitis. Si la enfermedad es leve, los síntomas no progresan más allá de esta etapa. El examen médico muestra taquipnea moderada, ronquidos difusos y sibilancia. La radiografía es generalmente normal y la recuperación ocurre entre los 7-12 días después del inicio de los síntomas (Collins et al., 2007; Dawson-Caswell and Muncie, 2011).

En los casos en que la enfermedad es severa, la tos y la sibilancia progresan, los niños comienzan con disnea, se hace evidente la hiperexpansión del tórax y puede ocurrir una retracción intercostal y subcostal. La taquipnea severa es común, incluso en ausencia de una cianosis visible. En etapas avanzadas de la enfermedad donde la hipoxia es extrema, ocurre fallo respiratorio. La radiografía muestra una combinación de atrapamiento de aire (hiper-expansión) y condensación peribronquial o neumonía intersticial. Ocasionalmente se presenta una consolidación lobular, la cual involucra usualmente el lóbulo derecho superior, en estos casos la efusión pleural es rara (Collins et al., 2007).

Las infecciones por el VSRh son particularmente peligrosas y mortales en niños con factores de riesgo como: nacer antes de las 34 semanas de gestación, y/o se acompaña de morbilidades como: displasia broncopulmonar, cardiopatía congénita con afectación hemodinámica severa, traqueomalacia, laringomalacia y enfermedad neuromuscular (Mullard, 2015). La exposición pasiva al humo del

cigarro, el hacinamiento y las condiciones socioeconómicas bajas constituyen otros factores que pueden incrementar el riesgo de severidad de las infecciones por este virus (Okiro et al., 2008; Wu et al., 2015).

En niños mayores y adultos (en su mayoría corresponden con reinfecciones), las manifestaciones clínicas suelen ser leves y en algunos casos, asintomáticas. En ocasiones, en especial, en las personas mayores, se producen neumonías y bronquitis, siendo también la infección por este virus causa de exacerbación de la bronquitis crónica (Volling et al., 2014). Existen evidencias que los niños que desarrollan síntomas del TRI durante infecciones repetidas por el VSRh en el primer año de vida, incrementan el riesgo de desarrollar síntomas similares a los de asma durante la edad escolar (Halfhide and Smyth, 2008; Zeng et al., 2011).

El VSRh se ha relacionado con el síndrome de muerte súbita en la infancia (Collins et al., 2007).

III.1.6. Patogenia y patología

El VSRh es un patógeno altamente contagioso. Se disemina por contacto directo con secreciones respiratorias de individuos infectados o indirectamente mediante el contacto con fómites o superficies contaminadas. Precisa de un contacto estrecho para transmitirse y puede sobrevivir 6 horas en la superficie contaminada, 2 horas en los guantes y hasta 25 minutos en las manos. El período de incubación entre el tiempo de exposición y el inicio de los síntomas, es de 4-6 días (Lessler et al., 2009). La excreción viral puede persistir desde 1-3 semanas. La infección se inicia por multiplicación del virus en las células epiteliales del tracto respiratorio superior (TRS). Este virus infecta también células como los macrófagos y los monocitos, lo que interfiere en algunas de sus funciones. El virus alcanza el TRI de entre 1-3 días, probablemente a través de la aspiración de secreciones infectadas, aunque también puede extenderse de célula a célula, mediante la fusión de sus membranas (Collins et al., 2007).

El VSRh es el principal agente causante de bronquiolitis y neumonía en lactantes y niños pequeños (Hall et al., 2009). La infección severa del TRI ocurre con una mayor incidencia en lactantes de 2-3 meses (Collins and Melero, 2011).

El VSRh es neumotrópico, sin embargo, no está estrictamente limitado al tracto respiratorio. En los niños o adultos inmunocomprometidos, donde la infección con este virus en algunos casos puede ser fatal, el virus puede diseminarse a otros órganos como riñón, hígado y miocardio (Guan et al., 2010;

Milner et al., 1985). Se han detectado antígenos (Ag) del virus en leucocitos mononucleares circulantes (Wang et al., 2001) y el ARN genómico y el ARNm viral se ha encontrado en células de sangre periférica (O'Donnell et al., 1998; Yui et al., 2003), no obstante, la viremia no se ha descrito durante la infección en lactantes y niños sin antecedentes patológicos personales (Collins et al., 2007).

III.1.7. Respuesta Inmune

La respuesta inmune frente a una infección natural por VSRh puede ser tanto de tipo humoral como celular. Sin embargo, la inmunidad humoral es incompleta, lo que se evidencia por la ocurrencia de infecciones recurrentes a lo largo de la vida tanto en la infancia como en la vida adulta (Holgate et al., 2015).

La respuesta inmune innata es determinante en el control temprano de la infección por VSRh, la cual se inicia con la infección de las células epiteliales ciliadas, macrófagos y células dendríticas (DCs) del TRS. Una vez que las células se infectan, las partículas virales son identificadas por los receptores de reconocimiento de patrones asociados a patógenos presentes en las células infectadas, que incluyen los TLR-2 y 6, receptores similares al gen I inducible del ácido retinoico y receptores tipo dominio de oligomerización nucleótido (Zeng et al., 2012). Las señales de estos receptores inducen que se activen los genes correspondientes y se secreten una amplia variedad de mediadores solubles proinflamatorios y/o quimioatrayentes como interleuquinas (IL) 1, 6, 11, CXCL10, CXCL8, CCL-5, MCP-1, MIP-1 α , TNF- α , IFN- α/β y el factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos. Además se induce la secreción de las proteínas surfactantes, que funcionan como opsoninas (Farrag and Almajhdi, 2016).

Después de la respuesta inmune innata, se inicia la respuesta inmune adaptativa, la cual juega un papel importante en la eliminación del virus y en la protección contra infecciones subsiguientes por el VSRh (Varga and Braciale, 2013). Las DCs son determinantes en la activación de la respuesta adaptativa del hospedero. Posterior a la infección viral las DCs captan el Ag, migran hacia los nodos linfáticos del pulmón y activan las células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas del virus (Cannon et al., 1987; Graham et al., 1991). Las células T CD4⁺ también juegan un papel importante durante la infección ya que tienen la capacidad de diferenciarse en múltiples subpoblaciones en la que se incluyen Th1, Th2, Th17 y las células T reguladoras. Las células Th1 ayudan a eliminar el virus mediante la producción de IFN- γ , mientras que las células Th2, productoras de IL- 4, IL- 5 y IL- 13, se asocian con una mayor severidad de la enfermedad (Boyoglu-Barnum et al., 2014; Lukacs et al., 2006). Las células Th17, involucradas en la producción de IL-17, se relacionan con la producción de mucus y la hiperreactividad en las vías

respiratorias, sin embargo, pueden contribuir también a la eliminación del virus (Fujisawa et al., 2011; Mukherjee et al., 2011; Zhang et al., 2016).

III.1.8. Epidemiología

Las infecciones por el VSRh ocurren más comúnmente en niños menores de 2 años, la enfermedad es más severa en los seis primeros meses de vida y la frecuencia de hospitalización es 3 veces mayor en niños prematuros (Parikh et al., 2017). La mitad de los niños se infectan por este virus en el primer año de vida, a los dos años de edad casi todos los niños se han infectado con él y aproximadamente un 50% se han infectado dos veces (Cane, 2001). La infección primaria ocurre en presencia de los anticuerpo (Ac) maternos y las reinfecciones pueden ocurrir a lo largo de la vida, aunque con la edad, disminuye la incidencia de la infección y la gravedad de los síntomas (Collins and Graham, 2007).

Las hospitalizaciones por el VSRh ocurren en más del 70% de los niños menores de seis meses, en más del 50% de los menores de tres meses y en más del 20% de los menores de 2 meses (Parikh et al., 2017). Este virus se reconoce como un patógeno importante de las infecciones asociadas a la asistencia sanitaria (IAAS) en países desarrollados. Durante una epidemia por este virus, las IAAS se identificaron en el 32% de los niños hospitalizados por una enfermedad no relacionada con el VSRh (French et al., 2016).

El VSRh anualmente causa entre 66 000 -199 000 muertes en niños menores de 5 años, el 99% ocurre en los países subdesarrollados (Shi et al., 2017). La tasa de mortalidad es de 2-3% en el período neonatal, de 6-7% entre 1 mes -1 año y de 1,6% entre 1-4 años. En los países desarrollados, la tasa de mortalidad es baja y las infecciones severas ocurren solo en pacientes de alto riesgo como asmáticos e inmunodeprimidos (Scheltema et al., 2017).

En las últimas décadas, diferentes estudios muestran que el VSRh causa infección severa en ancianos y adultos inmunocomprometidos (Johnstone et al., 2008; Thompson et al., 2004). Actualmente, existen cada vez más evidencias que las tasas de hospitalización, morbilidad y mortalidad son similares entre adultos infectados por los virus influenza y el VSRh (Falsey et al., 2005; Lee et al., 2013; Zhou et al., 2012). En un estudio prospectivo en adultos (18-60 años) previamente saludables infectados con VSRh, se encontró que el 26% presentaba síntomas del TRI y el 38% causó ausencia laboral durante la enfermedad (Hall et al., 2001).

El VSRh tiene una distribución mundial y la transmisión sigue un marcado patrón estacional en las regiones con clima templado. Las epidemias por este virus ocurren durante el otoño, invierno y primavera. En las zonas ecuatoriales y otras áreas con clima tropical, las infecciones por VSRh se asocian más frecuentemente con la estación de lluvia, no obstante, la estacionalidad en los trópicos no está tan bien definida, como en las regiones templadas (Hall et al., 1990; Tang and Loh, 2014; Weber et al., 1998).

El VSRh se divide en dos subgrupos A y B, en base a su reacción frente a AcM contra los Ag de superficie (Anderson et al., 1985). Cada subgrupo se subdivide en múltiples genotipos en base a la variabilidad genética del gen de la gp G. Durante una epidemia co-circulan ambos subgrupos y diferentes genotipos (Agoti et al., 2015; Otieno et al., 2016).

III.1.9. Prevención y tratamiento

Hasta el momento no existe una vacuna efectiva para la prevención de la infección por el VSRh. La prevención es el aspecto más importante de la asistencia sanitaria y tiene una contribución mayor en la culminación de la enfermedad que las medidas de tratamiento. Las medidas preventivas efectivas reducen la mortalidad y la carga económica de la enfermedad. La desinfección y el lavado de manos con productos a base de alcohol o jabón y agua son muy efectivos para reducir la propagación viral, y para prevenir las IAAS. El uso de guantes, batas y máscaras también puede ayudar a limitar la transmisión (Hall and Douglas, 1981).

En las infecciones producidas por VSRh, la Asociación Americana de Pediatría (AAP) y el Instituto Nacional de Salud y Atención de Excelencia (NICE, del inglés *National Institute for Health and Care Excellence*), recomiendan el monitoreo del cuadro clínico y tratamiento de sostén (hidratación por vía intravenosa y suministro de oxígeno). (Gadomski and Scribani, 2014; Mazur et al., 2015; Ricci et al., 2015). No se recomienda el uso de corticoesteroides y broncodilatadores ya que no se ha demostrado que sean efectivos para reducir la morbi-mortalidad. Desafortunadamente, ambos se usan todavía con demasiada frecuencia en la atención clínica (Xing and Proesmans, 2019b).

La Ribavirina es el único tratamiento antiviral contra el VSRh aprobado por la FDA de los Estados Unidos. Este fármaco es un análogo de nucleósido sintético que inhibe la replicación de los virus ARN y ADN (Sidwell et al., 1972). Desde 1996, la AAP no recomienda el uso de la ribavirina en niños infectados por VSRh, debido a los efectos adversos que produce. Dentro de estos efectos se

encuentran: la anemia hemolítica, isquemia miocárdica y daño renal por el riesgo de toxicidad (teratogénica) (Ralston et al., 2014a).

III.1.9.1. Vacunas

El desarrollo de vacunas frente al VSRh comenzó en la década de 1960, con una vacuna inactivada con formalina que indujo una respuesta inflamatoria pulmonar grave. El 80% (16/20) de los niños vacunados fueron hospitalizados y el 10% (2/20) fallecieron (Kapikian et al., 1969). El fracaso de esta vacuna se atribuyó a diferentes características inmunológicas asociadas con la respuesta inmune humoral y celular. Diferentes estrategias se han empleado para el desarrollo de una vacuna segura y efectiva contra el VSRh. Entre ellas tenemos: vacunas atenuadas, vacunas de subunidad y vacunas de vectores (Graham, 2016; Green et al., 2015; Neuzil, 2016). El desarrollo de nuevas vacunas debe estar encaminado a beneficiar fundamentalmente a cuatro grupos poblacionales: lactantes, niños menores de 2 años, mujeres embarazadas y adultos mayores de 65 años de edad (Anderson et al., 2013).

III.1.9.2. Inmunización pasiva

La inmunización pasiva es la administración intramuscular de un AcM neutralizante contra el VSRh. Se han desarrollado varios productos de primera y segunda generación que se unen al sitio antigénico de la gp F del VSRh, entre ellos se encuentran: RSV-IVIG (RespiGam) (Oertel, 1996), Palivizumab (Synagis) (Blanken et al., 2013; Group, 1998), Motavizumab (MEDI-524, Numax) (Carbonell-Estrany et al., 2010; O'Brien et al., 2015), Suptavumab (REGN-2222) y Nirsevimab (MEDI-8897).

RespiGam: es una inmunoglobulina (Ig) policlonal preparada a partir de una mezcla de plasma con altos título de Ac neutralizantes contra el VSRh. Esta Ig se licenció en 1996, pero se retiró del mercado en 2004 debido a la necesidad de acceder a la vía intravenosa repetidas veces y durante un período de tiempo prolongado (4-6 horas) (O'Shea et al., 1998).

Palivizumab: es un AcMh que se administra por vía intramuscular. Actualmente, la AAP recomienda el uso de este AcM durante el primer año de vida en niños prematuros con enfermedad pulmonar crónica, enfermedad congénita del corazón e inmunodeficiencia (Ralston et al., 2014b).

Motavizumab (MEDI-524, Numax): es un AcMh derivado de Palivizumab desarrollado a principios de la década de 2000. *In vitro*, este AcM se une al Ag F con mayor avidéz que el Palivizumab y también fue superior en la neutralización viral (Wu et al., 2007). Durante su evaluación en el 2010, la FDA no

aprobó su licenciamiento debido a las reacciones de hipersensibilidad cutánea en un grupo de niños tratados (Lagos et al., 2009).

Suptavumab (REGN-2222): es un AcMh que se administra por vía intramuscular y se recomienda su uso en niños nacidos con menos de 35 semanas de gestación, los cuales no clasifican para el tratamiento con el Palivizumab. *In vitro*, la actividad neutralizante fue más potente que el Palivizumab (Sivapalasingam et al., 2015).

Nirsevimab (MEDI-8897), es un AcMh más potente *in vitro* que el palivizumab (Kwakkenbos et al., 2010; Robbie et al., 2013; Yu et al., 2017).

III.1.9.3. Terapia antiviral

En el presente no existe ninguna terapia que acorte el curso de la infección por el VSRh o acelere la eliminación de los síntomas. El desarrollo de un antiviral efectivo contra este virus no ha sido posible debido a diferentes obstáculos. Dentro de estos se conoce, que durante la replicación viral pueden ocurrir cambios genéticos tales como polimorfismo de un solo nt y otras mutaciones, permitiendo al virus escapar de las vacunas y de las terapias antivirales (Agoti et al., 2014; Griffin et al., 2017). Otro obstáculo lo constituye el grupo de riesgo (lactantes con infección severa) al cual va dirigido la terapia antiviral, ya que se hace muy difícil incluir a este grupo en la fase temprana de los ensayos clínicos. No obstante, múltiples antivirales se encuentran en diferentes etapas de desarrollo. Estos se dividen en 4 clases terapéuticas llamadas: Ig, análogos de nucleosidos, ARN pequeños de interferencia (siRNA) e inhibidores de fusión (Xing and Proesmans, 2019a).

III.1.9.3.1. Inmunoglobulinas

ALX-0171: es un nanoanticuerpo trivalente que se une a la proteína F inhibiendo la entrada del virus a la célula. La nebulización es la vía óptima para suministrarlo eficientemente en el organismo y es liberado directamente en el sitio de infección para asegurar su acción rápida. (Depla, 2014, 2015; Detalle et al., 2016).

RI-001: es una Ig intravenosa preparada a partir de una mezcla de plasma humano con altos títulos de Ac neutralizantes contra el VSRh y con efectos anti-inflamatorios. La misma reconoce epítopes que se encuentran en la superficie de las gps G, F y SH del virus. Para obtener mejores resultados con esta Ig se recomienda su administración tempranamente en el curso de la infección (Falsey et al., 2017).

III.1.9.3.2. Análogos de nucleósidos

Los análogos de nucleósidos son fármacos que contienen un nucleósido sintético que es muy similar a un nucleósido natural, pero este es diseñado para incorporarse de forma preferencial en el ADN o ARN viral produciendo la inhibición de la replicación viral.

ALS-008176: es un fármaco derivado del ALS-008112, este último es un inhibidor potente y selectivo de la polimerasa del VSRh y análogo de nucleósido de citidina (Wang et al., 2015). En el tracto respiratorio el ALS-008112 es fosforilado pasando a ALS-008112-TP. Esta forma es esencial para su actividad antiviral (Deval et al., 2015; DeVincenzo et al., 2015).

III.1.9.3.3. ARN de interferencia

Los siRNA son fragmentos de ARN de doble cadena que funcionan como un mecanismo natural en la represión de la síntesis de proteínas. El mecanismo de acción es la neutralización de una secuencia específica de ARNm postranscripcional (DeVincenzo et al., 2008; DeVincenzo et al., 2010).

ALN-RSV01: es un siRNA que está dirigido contra el ARNm que codifica la proteína N del VSRh. Este fármaco impide la síntesis de la proteína N mediante su unión y corte del ARNm que codifica para esta proteína (DeVincenzo et al., 2008; DeVincenzo et al., 2010).

III.1.9.3.4. Inhibidores de la fusión

La gp F del VSRh durante la infección viral es esencial para la fusión de la membrana viral con la membrana plasmática de la célula huésped. Se han desarrollado pequeñas moléculas con fines terapéuticos que se unen a la gp F e inhiben la fusión de la membrana.

MDT-637: llamado previamente VP14637, es una molécula pequeña que reduce la replicación del VSRh al inhibir la gp F, el mecanismo exacto de acción aún se desconoce (Douglas et al., 2003).

JNJ-53718678: es una molécula pequeña que se une fuertemente a la cavidad central simétrica de la proteína F en la conformación pre-fusión. De esta manera, impide el plegamiento conformacional de la proteína F de pre-fusión a post-fusión y por lo tanto inhibe la fusión celular. (Roymans et al., 2017).

GS-5806: es una molécula pequeña inhibitoria de la fusión cuya diana es la gp F de VSRh en su conformación de pre-fusión. Este fármaco al igual que JNJ- 53718678, MDT-637 y la mayoría de los inhibidores de la fusión, interfiere en el cambio conformacional de la gp F de pre a post fusión, por su

unión en la cavidad central simétrica de la proteína en pre-fusión (Battles et al., 2016; Roymans et al., 2017; Samuel et al., 2015). Sin embargo, no comparte el mismo sitio de unión con el Palivizumab y por lo tanto mantiene su actividad contra variantes resistentes al Palivizumab (Samuel et al., 2015).

AK0529: es otro potente inhibidor de la fusión de las cepas de VSRh cuya diana también es la gp F (Xing and Proesmans, 2019a).

III.2. Péptidos antimicrobianos

La aparición de resistencia a los fármacos virales constituye la principal preocupación para la salud pública mundial. En la actualidad existen un número limitado de antivirales y su uso indebido, produce una presión selectiva sobre los virus durante la replicación, lo que permite la adaptación al tratamiento antiviral y la aparición de cepas resistentes (Irwin et al., 2016). Las consecuencias de la resistencia recién adquirida son particularmente graves en las infecciones virales crónicas, lo que conlleva a un fracaso terapéutico. Además, los costos de los nuevos fármacos son extremadamente altos, lo que hace que estas terapias sean inaccesibles para los países subdesarrollados. Por lo tanto, se necesita desarrollar nuevos antivirales para suplementar o reemplazar los ya existentes (Antonelli and Turriziani, 2012; Organization, 2019). En este contexto, recientemente se ha centrado la atención en la utilización de péptidos naturales o sintéticos con actividad antiviral, como posibles alternativas de los agentes terapéuticos actuales (Chi et al., 2014; ElSawy et al., 2012; Gwyer Findlay et al., 2013; Shartouny and Jacob, 2019).

Los PAMs constituyen una alternativa prometedora porque presentan propiedades terapéuticas atractivas. De esta manera, se consideran antibióticos naturales que están presentes en todas las formas de vida, desde organismos unicelulares hasta mamíferos. Entre las ventajas que ofrece la utilización de estos péptidos como agente terapéutico están: ser altamente específicos y efectivos; biodegradables por la acción de las peptidasas limitando su acumulación en los tejidos, lo que conlleva a una menor toxicidad; y lo más importante es que poseen un amplio espectro de actividad frente a hongos, bacterias, protozoos y virus, por lo que tienen una importante acción protectora en los organismos que carecen de sistema inmune, mientras que en los vertebrados forman parte de la inmunidad innata (Guaní-Guerra et al., 2010; Otero-González et al., 2010; Sánchez, 2016).

III.2.1. Características generales de los péptidos antimicrobianos

Los PAMs son moléculas de bajo peso molecular, constituidas por 15-50 aa, están cargados positivamente debido al exceso de residuos de arginina y/o lisina. Generalmente son hidrofóbicos y anfipáticos a pH fisiológico (Sierra et al., 2017). Debido a la abundancia y diversidad de los PAMs

existentes, se han publicado numerosas clasificaciones teniendo en cuenta el organismo productor, células blanco, mecanismo de acción, etc. Una de las más empleadas se basa en los tipos de estructuras secundarias, lo que permite clasificarlos en 4 familias: α , β , $\alpha\beta$, y no $\alpha\beta$ (Figura 4) (Wang, 2010)

- Familia α : contienen una estructura helicoidal α como principal estructura secundaria. Ej: catelicidinas (LL-37), histamina, dermaceptinas, gramicidina (Figura 4a)
- Familia β : contiene al menos un par de cadenas β en su estructura. Ej: α -defensinas humanas. Hecpidinas, SLP1(Figura 4b)
- Familia $\alpha\beta$: contiene estructuras α y β . Ej: β -defensinas 1, 2, 3, LEAP-2 y CCL (1, 8, 13, 20, 27) (Fifgura 4c)
- Familia no $\alpha\beta$: no contiene estructuras α ni β en su estructura. No existen ejemplos en el cuerpo humano (Figura 4d)

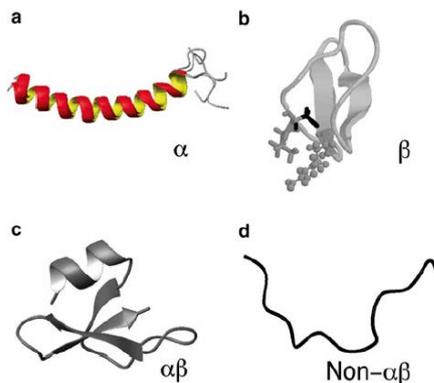


Figura 4: Clasificación de las 4 familias de PAMs
Fuente: (Wang, 2015)

En los mamíferos, los PAMs se dividen en dos familias: defensinas y catelicidinas, clasificación en la cual tienen mayor peso los dominios estructurales altamente conservados. Los PAMs pueden ser identificados en diferentes secreciones, tejidos y células (saliva, lágrimas, leche materna, células de la mucosa epitelial, macrófagos, neutrófilos, NK, monocitos, leucocitos eosinófilos, células de Paneth, células T y B (Andersson et al., 2016). Son sintetizados constitutivamente en granulos de células fagocíticas (defensinas, neutrófilos y células de paneth), inducibles (defensinas, células TCD8 y células epiteliales) o constitutivos e inducibles (catelicidinas, defensinas y una variedad de células, incluidos neutrófilos, células epiteliales y macrófagos) (Beisswenger and Bals, 2005)

III.2.2. Mecanismos de acción antiviral

En los últimos años, las investigaciones han demostrado que existen diferentes mecanismos de acción mediante los cuales los PAMs pueden ejercer su acción antiviral, entre ellos tenemos:

1. Los péptidos pueden bloquear la entrada del virus en la célula a través de su interacción con el sulfato de heparán presente en la superficie celular. El sulfato de heparán es el glucosaminoglucano más importante al cual se unen muchos virus (Mettenleiter, 2002; Spillmann, 2001).

2. Los péptidos pueden bloquear la diseminación viral entre las células vecinas o la inhibición de la formación de células gigantes (Mikloska and Cunningham, 2001)

3. Los péptidos pueden bloquear la entrada del virus en la célula a través de su interacción con receptores específicos, presentes en la célula huésped. El ejemplo más estudiado es el análogo de polimefusina T22, que se une al receptor de quimiocina CXCR4, el cual sirve como co-receptor para la entrada del virus de la inmunodeficiencia humana -1 (VIH-1) en las células T (Tamamura et al., 1996).

4. Los péptidos pueden bloquear la entrada del virus a la célula a través de su interacción directa con gp virales localizadas en la envoltura viral. Por ejemplo, se ha visto que la θ -defensina (retrociclina II), interactúa con alta afinidad con la gp B del virus herpes simple-2 (HSV-2), protegiendo eficientemente a las células de la infección viral (Yasin et al., 2004).

5. Los péptidos pueden interactuar con la membrana lipídica de la envoltura viral, dando como resultado su desestabilización, la formación de poros y lisis (Dathe and Wieprecht, 1999; Sitaram and Nagaraj, 1999)

III.3. Defensinas

Las defensinas constituyen una de las familias más extensas y mejor estudiadas dentro de los PAMs. Se encuentran distribuidas en una amplia gama de grupos taxonómicos que se derivan de un ancestro común y que durante su evolución conservaron las mismas funciones (Yount and Yeaman, 2004). Estas son moléculas pequeñas producidas en organismos vertebrados principalmente por leucocitos y células epiteliales, con un amplio rango de acción contra microorganismos (Ganz, 2003; Yang et al., 2004). Aunque su actividad antiviral fue primeramente publicada en 1986 (Daher et al., 1986), estudios posteriores arrojaron a la luz mecanismos complejos y múltiples mediante los cuales, las defensinas inhiben la infección viral. Esta inhibición puede ocurrir por la acción directa sobre el virión o afectando la célula blanco y por tanto interfiriendo indirectamente con la infección viral (Klotman and Chang, 2006).

Las defensinas de primates según sus características estructurales y localización celular se clasifican en 3 grandes subfamilias (α , β y θ defensinas). Las α -defensinas son péptidos altamente conservados y se subdividen en hNP1-4 y hD5 y hD6 (Selsted and Ouellette, 2005). Su estructura consiste en una triple hoja β estabilizada por tres puentes disulfuro, con el arreglo Cys1- Cys6, Cys2- Cys4 y Cys3- Cys5 (Lehrer, 2007). Las hBDs, se expresan en una gran variedad de tejidos epiteliales y presentan 6 cisteínas unida por tres enlaces disulfuro intramoleculares en las posiciones Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 y Cys3-Cys6 (Lehrer and Lu, 2012). Por último, las θ -defensinas se encuentran únicamente en especies de primates no humanos. Son octadecapéptidos circulares con dos hojas β antiparalelas, unidas entre sí por dos giros β y estabilizadas por enlaces disulfuro (Conibear and Craik, 2014; Munk et al., 2003; Yasin et al., 2004).

La actividad antiviral de las defensinas se ha estudiado frente a una gran variedad de virus envueltos. En el primer estudio publicado se encontró que el efecto inhibitorio de la hPN1 fue potente contra el VHS 1 y 2, moderado contra el virus de la estomatitis vesicular (VSV) y virus influenza, y ligero contra citomegalovirus (CMV) (Daher et al., 1986). Más adelante se estudió la actividad antiviral de todas las α -defensinas contra el VHS y mostraron actividad inhibitoria. Sin embargo, en el caso de la hBD, solamente la hBD3 tuvo un efecto inhibitorio importante contra este virus. El mecanismo de acción para ambas defensinas, ocurrió a través de la interacción del péptido con la gp B del virus o con el sulfato de heparán (receptor para el HSV) (Hazrati et al., 2006).

El VIH es otro de los virus donde también se ha confirmado la actividad antiviral de las defensinas. Se ha demostrado que hPN1-3, hBD2 y 3 inhiben múltiples pasos en la entrada del virus a la célula. Estos péptidos se unen a las células T CD4 y a la gp de envoltura viral, induciendo una regulación negativa de CD4 y CXCR4 y bloquean la interacción de la gp de envoltura con el co-receptor (Demirkhanyan et al., 2012; Quinones-Mateu et al., 2003; Sun et al., 2005).

La actividad antiviral de hNP1 contra la cepa de influenza (WSN) fue descrita por primera vez en 1986. Más tarde se confirmó en otras cepas de influenza que hNP1 y 2 disminuyen la infectividad viral por su acción directa sobre la partícula viral (Tecele et al., 2007). Otros estudios evaluaron la actividad antiviral de β -defensinas recombinantes: hBD2, mBD2 y 3 (ratón). Los tres péptidos inhibieron la multiplicación viral en células MDCK. Esta protección fue efectiva durante la unión y la entrada del virus en la célula (Gong et al., 2010; Jiang et al., 2012; Ryan et al., 2011).

La actividad antiviral de las hBD también se evaluó contra el VSRh. La hBD2 inhibió la multiplicación viral, en este caso el péptido fue capaz de bloquear la entrada del virus a la célula. La

mBD4 (homóloga a hBD2) se encontró sobre-expresada *in vivo* en el pulmón de ratón en respuesta a una infección con este virus (Kota et al., 2008). La evaluación de la actividad antiviral de la hBD-2 recombinante fue capaz de reducir la replicación viral y el efecto citopático (ECP) en células Hep-2 (Morales et al., 2015).

En general se ha encontrado que las θ -defensinas tienen actividad antiviral *in vitro* contra VHS 1 y 2. Estos péptidos se unen a la gp B, bloqueando la unión y la entrada del virus en la célula (Yasin et al., 2004). En el VIH estas defensinas se unen con la gp 120 e inhiben su unión a las células T CD4 (Gallo et al., 2006). En los virus respiratorios la evaluación de la actividad antiviral se realizó en virus influenza H5N1 y coronavirus SARS. En el caso de virus influenza la inhibición ocurrió a nivel del endosoma y en el SARS, se constató una modulación de la respuesta inflamatoria (Doss et al., 2012; Wohlford-Lenane et al., 2009).

En invertebrados las defensinas constituyen un grupo diverso, perteneciente a la familia $\alpha\beta$ (Bulet et al., 2004). Se clasifican en subfamilias según sus propiedades biológicas y criterios evolutivos: uno ancestral que incluye insectos, arácnidos y moluscos y otro grupo, más extenso, en cuanto al número de miembros (Rodríguez de la Vega and Possani, 2005). Dentro de este último grupo, se encuentran las llamadas defensinas grandes (*big defensines*). Estas son proteínas antimicrobianas encontradas exclusivamente en invertebrados marinos (Shafee et al., 2016). Las similitudes encontradas entre el extremo C-terminal de las defensinas grandes y las β -defensinas, en cuanto a su estructura tridimensional y actividad biológica, aportan evidencias convincentes de una posible relación evolutiva entre ambas familias de PAMs (Shafee and Lay, 2017; Zhu and Gao, 2013).

En el 2009, se identificó un nuevo miembro de las defensinas en la langosta espinosa japonesa *Panulirus japonicus* (Pisuttharachai et al., 2009b). En esta especie, se detectaron dos isoformas diferentes (PjD1 y PjD2) en varios tejidos (Pisuttharachai et al., 2009a). Ambas isoformas poseen un péptido N-terminal y un dominio tipo defensina C-terminal. El patrón de cisteína que se encuentra en las defensinas de esta especie (CX4-8-C-X3-5-C-X9-13-C-X4-7-CC) es distinto a los patrones presentes en las defensinas de invertebrados, pero es idéntico al de las β -defensinas encontradas en vertebrados (Taylor et al., 2008). Hasta la fecha, estas defensinas en los crustáceos se consideran simplemente "PAMs putativos", su espectro de actividad antimicrobiana aún no se ha determinado.

En Cuba, en el 2012, a partir de hemocitos de la langosta espinosa caribeña *Panulirus argus*, recolectada en el Golfo de Batábano, se obtuvieron dos isoformas de péptidos similares a defensinas, las que mostraron un patrón de cisteína característicos de β -defensinas (Montero-Alejo et al., 2012).

Más tarde en el 2017, se identificó el primer PaDs con actividad antimicrobiana, denominado *panusin* (Montero-Alejo et al., 2017).

Panusin es un PAMs catiónico (carga neta de +3) de 4.26 kDa. Su secuencia primaria contiene 39 aa, de los cuales 6 son cisteínas que se encuentran formando enlaces disulfuro, en un arreglo predicho de Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 y Cys3-Cys6, similar a β -defensinas en vertebrados (Montero-Alejo et al., 2017) (Figura 5).

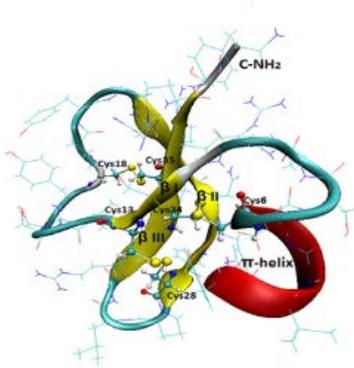


Figura 5: Estructura 3D de *panusin*
Fuente: (Montero-Alejo et al., 2017)

La actividad antimicrobiana de *panusin* se verificó en bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) y Gram positivas (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*), así como en la levadura *Candida albicans*, con ausencia de efectos hemolíticos sobre eritrocitos humanos. Su actividad antimicrobiana no es sensible a las concentraciones de sales ya que resiste una fuerza iónica de hasta 300 μ M de NaCl en el medio de cultivo (Montero-Alejo et al., 2017). Además de dicha actividad, se encontró que *panusin* es capaz de inhibir la expresión de algunas citoquinas pro-inflamatorias como: IL-1 β , IL-6 y TNF (Alejo, 2017). Esta actividad inmunomoduladora de la respuesta inflamatoria se publicó previamente para otros péptidos de la familia de las β -defensinas, como es el caso de las hBD-3 (Semple et al., 2011). Estas características descritas y su similitud con las hBD-3 los convierte en interesantes PAMs con potencialidades para el desarrollo de novedosos antimicrobianos en el tratamiento de enfermedades infecciosas (Montero-Alejo et al., 2017).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Células y Medios de cultivo

IV.1.1. Líneas celulares:

Las líneas celulares utilizadas pertenecen al cepario del laboratorio de cultivo celular del IPK. Sus características se describen a continuación:

- Vero (ATCC CCL-81): línea continua obtenida en 1962 a partir del riñón de un mono verde africano adulto normal (Yasumura, 1962). Se recibió en el laboratorio de Cultivo Celular proveniente de la ATCC en el subcultivo (Sc) 126. Se empleó para el estudio entre los Sc 131-136. Se mantuvieron en el área de Cultivo Celular del laboratorio de Control de la Calidad EPOVAC del Centro de Inmunología Molecular (CIM).
- Hep-2 (ATCC CCL-23): línea continua obtenida en 1952 a partir de un carcinoma epidermoide de laringe humano (Moore et al., 1955). Se recibió en el laboratorio de Cultivo Celular proveniente de la ATCC en el Sc 363 y se utilizó para el estudio entre los Sc 367-372. Se mantuvieron en el laboratorio de Cultivo Celular del IPK.

IV.1.2. Medios de cultivos

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las líneas celulares fue: Medio Mínimo Esencial de Eagle (EMEM) (GIBCO, EE.UU), el cual contiene solución salina balanceada de Earle, aa no esenciales, L-glutamina, piruvato de sodio y bicarbonato de sodio a una concentración de 1500 mg/mL suplementado con suero fetal bovino inactivado (SFBI) (SIGMA, EE.UU) al 10%. Para el mantenimiento de las líneas el mismo fue suplementado con SFBI al 2%.

IV.1.3. Reactivos y soluciones

Los diferentes reactivos y soluciones empleados para el desarrollo de este trabajo se describen a continuación:

- Tripsina 0,25% con EDTA 1 mM (GIBCO, EE.UU): empleado para separar la monocapa celular.
- Dimetilsulfóxido anhidro (DMSO) (SIGMA, EE.UU): agente criopreservante

- Azul de tripano: (Thermo Fisher Scientific, EE.UU) al 0,4% en tampón fosfato salino (PBS, del inglés *Phosphate Buffer Saline*) colorante utilizado para el conteo celular en cámara de Neubauer.
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) (SIGMA, EE.UU): empleado en el ensayo colorimétrico para medir citotoxicidad
- Metanol: empleado para fijar las células en las placas.
- PBS (CAPRICORN, Alemania): empleado para los lavados de la monocapa celular. Contiene NaCl (137 mmol/L), KCl (2,7 mmol/L), Na₂HPO₄ (10 mmol/L) y KH₂PO₄ (1,8 mmol/L). pH (7,0-7,6)

Las líneas celulares se sembraron a una concentración de 1×10^5 células/mL y se depositaron 100 μ L de las células en cada placa de 96 pocillos CELLSTAR[®] (GreinerBio-One[®], EE.UU), 2 mL en cada pozo de las placas de 6 CELLSTAR[®] (GreinerBio-One[®], EE.UU), 5 mL para los frascos de cultivo de 25 cm² y 20 mL para los frascos de 75 cm² (GreinerBio-One[®], EE.UU). Se incubaron a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5% (Binder, EE.UU) hasta que las monocapas alcanzaron un 90-100% de confluencia (entre 24-48 horas).

IV.2. Cepas virales

Las cepas del VSRh empleadas en el presente trabajo pertenecen al cepario del LNR de virus influenza y otros virus respiratorios del Departamento de Virología del IPK.

- VSRh-A (Chab141/94 9p Hep-2 30/11/98): cepa viral con un alto grado de identidad nucleotídica con la cepa prototipo Long (Valdes et al., 2005). Aislamiento número 141 del año 1994 en Ciudad de la Habana, procedente de un paciente menor de un año, ingresado en la sala de respiratorio del Hospital Pediátrico William Soler, con diagnóstico clínico de IRA baja de posible etiología viral.
- VSRh-B (CH185373p Hep-2 30/11/98): cepa de referencia donada por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), España.

IV.3. Péptidos truncados análogos de β -defensinas

Se emplearon péptidos sintéticos con secuencias homólogas a los péptidos naturales de la familia β -defensina de invertebrados, aislados de los hemocitos de la langosta espinosa *Panulirus argus*. Las estructuras sintetizadas corresponden a los extremos N y C-terminal de las estructuras molde. El

molde 1 corresponde a *panusin* y el 2 corresponde a otro molde natural no descrito hasta al momento. Los péptidos se diseñaron en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular del CIDEM y se sintetizaron bajo BPL en el Departamento de Síntesis de Péptidos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), La Habana, Cuba. Se empleó para la síntesis, la metodología en fase sólida Fmoc/tBu, y se obtuvieron grados de pureza por encima del 97% para cada péptido, determinado por RP-HPLC y caracterizado por ESI-MS. Toda la información relacionada con los péptidos se muestra en la Tabla I.

Tabla I: Características generales de los péptidos utilizados en el estudio.

Péptidos	Molde Natural	Fragmento	No. aa	Enlaces disulfuros	Masa Molecular (Da)	Pureza (%)
Y16P89A	1	carboxilo	23	C1-C4; C2-C3	2822,25	97,75
Y16P90		amino	17		1637,60	97,66
M17P34	2	carboxilo	28	C1-C2	3348,58	98,83
M17P35		amino	20		2073,85	99,58

IV.4. Determinación de la citotoxicidad de las variantes peptídicas en la línea celular Vero

Se utilizaron placas de 96 pocillos sembradas después de 48 horas con monocapa celular completamente confluyente. Se retiró el medio de crecimiento de las células y se añadieron 100 μ L por pocillo de los cuatro péptidos disueltos en medio de cultivo sin SFBI a diferentes concentraciones desde 6,25 μ M hasta 100 μ M. Se utilizaron 6 pocillos por concentración del péptido a evaluar, en los pocillos restantes (6) se adicionaron 100 μ L de medio de cultivo sin SFBI, estos últimos constituyeron el control celular. Las células se incubaron a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5% durante 72 horas, y se observaron diariamente con el objetivo de determinar posibles cambios morfológicos (desprendimiento) en la monocapa celular indicativos de citotoxicidad. Transcurrido este tiempo, se determinó la viabilidad celular en todos los pocillos mediante el ensayo colorimétrico basado en la reducción del compuesto MTT por enzimas mitocondriales activas en las células vivas (Mosmann, 1983). Se añadió a cada pocillo 10 μ L de la solución de MTT a una concentración de 5 mg/mL en PBS. Las células se incubaron nuevamente a 37°C protegidas de la luz, en atmósfera de CO₂ al 5% durante 4 horas. Posteriormente, se eliminó todo el contenido del medio de las células y se decantó suavemente sobre papel de filtro. El precipitado formado, se resuspendió mediante la adición de 100 μ L de DMSO anhidro a cada pocillo, agitando ligeramente la placa durante 5 minutos. La absorbancia se leyó inmediatamente a una densidad óptica (DO) de 540 nm con filtro de referencia a 630 nm, en un espectrofotómetro lector de placas multipozos ELX 808 (BIOTEK,

EE.UU) con el programa integrado Gen5 versión 2.00.18. El porcentaje de viabilidad celular asociado a cada concentración del péptido se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{DO_{50} \text{ CT}}{DO_{50} \text{ CC}} \times 100$$

DO₅₀ CT: valor medio de absorbancia de los cultivos de células incubados con los péptidos.

DO₅₀ CC: valor medio de absorbancia de los controles de células considerados como el 100% de la viabilidad celular.

La CC₅₀ se definió como la concentración del péptido que provoca la reducción de la viabilidad celular en un 50%. A partir de los valores obtenidos se construyó una curva de viabilidad celular en función de la concentración del péptido. El ajuste de la tendencia de la curva se realizó con el programa Microsoft Office Excel 2013 y se consideró significativo un valor de coeficiente de regresión (R²) mayor que 0,85 (Chiang et al., 2002). El ensayo se realizó por duplicado para cada concentración de péptidos.

IV.5. Caracterización de la actividad antiviral *in vitro* de variantes peptídicas sintéticas derivadas de moldes naturales de la familia *panusin* frente a las cepas de VSRh-A y VSRh-B.

IV.5.1. Obtención y titulación de los bancos virales.

Con el objetivo de multiplicar las cepas virales después de una prolongada crioconservación e incrementar el título infectivo de estas, se realizaron 3 pases ciegos sucesivos en la línea celular Hep-2 a todas las cepas virales, en frascos de cultivo de 25 cm². Para ello se retiró el medio de crecimiento de las células y se inocularon 500 µL de la cepa viral por frasco. Se incubaron a 37°C durante 1 hora. Luego se añadieron 5 mL de medio de mantenimiento a cada frasco y se incubaron a 37°C. Se observaron diariamente en un microscopio invertido (OLYMPUS®, EE.UU) hasta que se observó un 85-100% de ECP. Las células inoculadas se congelaron a -80°C en un congelador UF-455G (Dometic, Suecia) y se descongelaron en un baño termostático (Thermo Scientific, EE.UU) a 37°C. Se utilizaron 500 µL para inocular las células del siguiente pase. El mismo procedimiento se realizó para adaptar las cepas virales a su multiplicación en la línea celular Vero a continuación de los 3 pases en Hep-2.

Para la obtención de los bancos virales de trabajo, se utilizaron frascos de cultivo de 75 cm² con monocapa confluyente de las células Vero. Se retiró el medio de crecimiento a las células y se

inocularon con 2 mL del contenido de los frascos de 25 cm² del último pase de cada cepa viral. Las células se incubaron a 37°C durante 1 hora. Al cabo de este tiempo, se añadieron 8 mL de medio de mantenimiento a cada frasco y se incubaron hasta la aparición del 80-100% de ECP. Las células inoculadas se congelaron a -80°C y se descongelaron a 37°C, su contenido se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C, en centrifuga refrigerada (SIGMA, EE.UU). Con los sobrenadantes obtenidos se confeccionaron los bancos de trabajo de cada cepa viral. Estos se filtraron por filtros Minisart 0,22 µm (Sartorius, Alemania), se prepararon alícuotas de 500 µL por vial y se congelaron a -80°C hasta su uso posterior.

La titulación de los bancos se realizó en placas de 96 pocillos con monocapa confluyente de células Vero. A partir de una de las alícuotas de cada cepa viral se realizaron diluciones decimales seriadas desde 10⁻¹ hasta 10⁻¹⁰. Se retiró el medio de crecimiento de las células y se inoculó cada pocillo con 100 µL de cada dilución (8 réplicas por dilución). Se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, y se observaron diariamente en un microscopio invertido. Se realizó la lectura final al 7mo día y se determinó como título viral la dilución que produce ECP en la mitad de las réplicas inoculadas, según PNO-0072 “Ensayo para determinar la dosis infectiva media en cultivo de tejidos (DICT₅₀/mL) del CIM.

Para la determinación del número de partículas infecciosas por unidad de volumen (título viral) presentes en la suspensión viral, se empleó el método de Spearman-Kärber (Spearman et al., 1974). El título (T) viral se definió por su valor medio y su intervalo de confianza del 95% (IC_{95%}) ± 0,5 log₁₀ (Q5A, 1999).

Los cálculos se obtuvieron utilizando la plantilla de Excel HCEX-021 “Determinación de dosis infectiva media en cultivo de tejidos”, disponible en la red del CIM.

Para determinar la repetibilidad (precisión intra-ensayo) se determinó el coeficiente de variación (CV) de los títulos según la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{DS}{P} \times 100$$

DS: desviación estándar promedio de los títulos virales

P: promedio de los títulos virales

Se consideró como referencia un valor de CV < 20% (Cubana, 2004; Guideline, 2005)

IV.5.2. Ensayo de Inmunofluorescencia indirecta

Con el objetivo de comprobar la multiplicación de las cepas virales, se realizó el ensayo de IFI a las diluciones decimales seriadas de las mismas. Para ello se utilizaron placas de 6 pozos sembradas con monocapa de células Vero confluentes. Se aspiró el medio de crecimiento y se inocularon 500 μL por pozo de las diluciones a evaluar (virus puro, desde 10^{-1} hasta 10^{-4}), como control celular se utilizó 500 μL de medio de mantenimiento. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 1 hora a 30°C (shell vial). Una vez concluida la centrifugación se aspiró el contenido de cada pozo y se añadieron 2 mL de medio de mantenimiento por pozo. Se incubaron durante 5 días a 37°C , en atmósfera de 5% de CO_2 . Pasado este tiempo se aspiró el medio de cada pozo, se lavó la monocapa celular con PBS y se fijaron las células con 2 mL de metanol frío (4°C) por pozo durante 15 minutos. Posteriormente, se procedió al lavado de la monocapa celular con PBS y a continuación se añadieron 800 μL por pozo del AcM específico contra la proteína F del VSRh (Chemicon) diluido 1:50 en PBS. Se incubó 1 hora en movimiento, a 37°C en cámara húmeda, pasado este tiempo se lavó la monocapa celular 2 veces con PBS, se dejó secar sobre papel de filtro y se añadieron 800 μL por pozo del suero de oveja anti IgG de ratón conjugado con fluoresceína (F6257, SIGMA, EE.UU) diluido 1:32 en PBS con azul de Evans. Se incubó 45 minutos a 37°C en cámara húmeda y posteriormente se procedió al lavado de la monocapa celular 2 veces con PBS durante 5 minutos. Se dejó secar sobre papel de filtro. Se adicionaron 100 μL de agua destilada por pozo y se procedió a observar en un microscopio invertido fluorescente (Lietz Diavert, Gena, Alemania) con un lente de 40x (Savón et al., 2000). Se consideró un resultado positivo la presencia de 5 o más células fluorescentes, según PNO-IRA 09 del LNR de virus influenza y otros virus respiratorios del IPK.

IV.5.3. Ensayo de evaluación primaria de la actividad antiviral

Para evaluar la posible actividad antiviral *in vitro* de los PADs contra las cepas de VSRh, se utilizó la metodología propuesta por Álvarez y colaboradores (Alvarez et al., 2009). Se retiró el medio de crecimiento a las células sembradas en placas de 96 pocillos con monocapa celular confluyente. Posteriormente, se añadieron concentraciones de 25, 50, 75 y 100 μM de los péptidos, por sextuplicado, disueltos en el correspondiente medio de cultivo sin SFBI. Cada placa sembrada se incubó durante 1 hora a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5%. Al cabo de este tiempo se adicionaron a cada pocillo 10 μL de una solución que contenía 100 $\text{DICT}_{50}/\text{mL}$ de cada virus. Se inocularon con cada cepa viral 6 pocillos sin tratar con los péptidos, los que constituyeron los controles de virus y se utilizaron 6 pocillos sin tratar con los péptidos y sin inocular con los virus, que constituyeron el control celular. Para cada concentración de péptido se utilizaron 2 pocillos sin inocular como

controles de citotoxicidad. Las células tratadas se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y se observaron diariamente al microscopio hasta que todas las réplicas del control de virus presentaran evidencia de ECP. Se definió como ECP la degeneración progresiva de la monocapa celular, ocurriendo la destrucción total de la misma en un momento avanzado de la infección *in vitro*, lo que se corresponde con el 100% del ECP, no siendo evidente en esta línea celular, la clásica formación de sincitios (Norrby et al., 1970).

Siguiendo el criterio propuesto por del Barrio y Parra (del Barrio G, 2000) se calculó el Índice Selectivo (IS). Este valor representa una medida de la distancia entre la concentración que resulta tóxica y la concentración antiviral, por tanto, mientras mayor sea su valor, mayor actividad antiviral posee el producto evaluado (Hu and Hsiung, 1989). Algunos autores consideran que compuestos sintéticos con valores de IS mayores que 100 pueden ser considerados agentes antivirales efectivos (Cosa et al., 2006).

$$IS = \frac{CC50}{CE50}$$

Para ello se determinó la CE₅₀ definida como la concentración efectiva de los péptidos que reduce el 50% del ECP. Esta se calculó mediante regresión lineal a partir de la ecuación de la línea de tendencia de la curva dosis-respuesta, utilizando el programa Excel, de Microsoft Office versión 2013 para un valor de coeficiente de regresión (R²) mayor de 0,85. El ensayo se realizó por duplicado para cada concentración de péptidos.

IV.5.4. Ensayo de reducción del título infectivo

Para evaluar la reducción del título infectivo se emplearon las concentraciones de los péptidos que resultaron subtóxicas para las células. Las mismas se añadieron por sextuplicado a las placas de 96 pocillos y se procedió como en el ensayo primario de actividad antiviral. Cuando todas las células sembradas en el pocillo del control de virus mostraron ECP, las placas se congelaron (-80°C) y se descongelaron 3 veces. El contenido de los pocillos correspondientes a cada concentración de péptido se colectó en viales individuales. Estos se centrifugaron a 2000 rpm, a 4°C durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada (SIGMA, EE.UU). Se colectaron los sobrenadantes y se realizaron diluciones decimales de los mismos (10⁻¹ hasta 10⁻¹⁰). Se añadieron por sextuplicado 100 µL de las diluciones de los péptidos en placas de 96 pocillos con monocapa confluyente de células. Las células se incubaron a 37°C en 5% de atmósfera de CO₂ durante 7 días. Transcurrido este tiempo se realizó la determinación del título viral como se describe en el acápite **IV.5.1.**

II.5.5. Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta

Con el objetivo de verificar la disminución de la multiplicación viral como consecuencia de la acción de los péptidos, se realizó el ensayo de IFI a las concentraciones de péptidos que mostraron actividad antiviral. Para ello se utilizaron placas de 6 pozos sembradas con monocapa de células confluyente. Se aspiró el medio de crecimiento y se inocularon 500 µL por pozo de las concentraciones de péptido a evaluar. Se incubaron durante 1 hora a 37°C, en atmósfera de 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo se adicionó 50 µL por pozo del control viral a una concentración de 100 DICT₅₀/ mL a todos los pozos con péptidos y al control viral sin péptido. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 1 hora a 30°C (shell vial). El procedimiento continuó como se describe en el acápite **IV. 5.2.**

IV.5.6. Ensayo de la Actividad Virucida

Con el objetivo de estudiar si los péptidos ejercían acción extracelular o efecto neutralizante sobre las cepas virales empleadas se realizó un ensayo virucida (del Barrio G, 2000). Se mezclaron volúmenes iguales (75 µL) de cada cepa viral y una solución de los péptidos al doble de las concentraciones subtóxicas para las células. Se incubó la mezcla a 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂ durante 1 hora. Al cabo de este tiempo, se realizaron diluciones decimales seriadas (10⁻¹ hasta 10⁻¹⁰) de la misma en medio de mantenimiento, se retiró el medio de crecimiento a las placas de 96 pozos sembradas con monocapa celular confluyente y se inoculó cada pocillo con 100 µL de cada dilución (6 réplicas por dilución). Las células se incubaron a 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂ durante 7 días. Como control positivo de este ensayo, se utilizó una mezcla con el mismo volumen de cada suspensión viral y una cantidad equivalente de medio de mantenimiento. Se incubaron a 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂ durante 1 hora, se realizaron diluciones decimales seriadas (10⁻¹ hasta 10⁻¹⁰) y se inocularon en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Tanto para el control viral como para los péptidos, se determinó la dilución que produce el ECP en la mitad de las réplicas inoculadas y a partir de esta se calculó el título infectivo residual según el procedimiento descrito por Spearman-Kärber (Spearman et al., 1974).

El valor de reducción del título infectivo por acción virucida (RAV) para cada concentración de péptido se obtiene según la siguiente fórmula:

$$\text{RAV} = \log_{10} \text{TC} - \log_{10} \text{TP}$$

Log₁₀ TC: título del control.

Log_{10} TP: título obtenido después de la adición de los péptidos

IV.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa GraphPad PRISM5 versión 5.01 para Windows (Software GraphPad). Los datos obtenidos de los ensayos de citotoxicidad y actividad antiviral se analizaron utilizando un método de regresión lineal con el programa Excel, de Microsoft Office versión 2013. A los datos obtenidos de los ensayos de reducción del título infectivo y actividad virucida, se les aplicó un análisis de varianzas (ANOVA) de dos factores con Bonferroni post-tests. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos si $p < 0,05$.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1. Determinación de la citotoxicidad de las variantes peptídicas en la línea celular Vero.

La primera etapa en el estudio de un producto con posible actividad antiviral consiste en realizar un ensayo cuantitativo que permita evaluar los efectos nocivos sobre las células o la citotoxicidad, expresada CC_{50} . El conocimiento de este valor posibilita posteriormente emplear intervalos de concentración inferiores o subtóxicos en los ensayos de actividad antiviral. Estos ensayos se realizan empleando las mismas células donde se evaluará esta actividad antiviral, utilizando concentraciones crecientes del producto (Fernández, 2008).

El ensayo colorimétrico basado en el empleo de MTT (Mosmann, 1983), permite cuantificar indirectamente la viabilidad celular a través de la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales. En las células viables estas enzimas reducen el MTT, de color amarillo, dando lugar a la formación de un precipitado salino de color púrpura denominado formazán. Los niveles de formazán y por tanto la intensidad de la coloración en el cultivo celular, se corresponden con los niveles de actividad de las deshidrogenasas mitocondriales; y por consiguiente, con la viabilidad celular.

En el presente estudio, se evaluó la citotoxicidad de 4 péptidos sintéticos truncados con secuencias homólogas a péptidos naturales de la familia β -defensina de invertebrados, aislados de los hemocitos de la langosta espinosa *Panulirus argus* en células Vero. Estos péptidos sintéticos se corresponden con los extremos C-terminal (Y16P89A y M17P34) y N-terminal (Y16P90 y M17P35) de *panusin* y un péptido nuevo de la familia de *panusin*, no descrito hasta el momento. Estos difieren en el número de aa y cisteínas que forman los enlaces disulfuros. Estudios previos demostraron la baja toxicidad y la actividad antimicrobiana de *panusin* (Montero-Alejo et al., 2017) y de su homólogo nuevo (datos no publicados), sin embargo, no existen estudios previos en la línea celular Vero que demuestren la actividad antiviral de los mismos.

La evaluación de la citotoxicidad de los péptidos Y16P89A, Y16P90, M17P34 y M17P35 en la línea celular Vero por microscopía óptica no mostró cambios en la morfología de las células y no se observó una disminución marcada de la intensidad del color púrpura en las concentraciones evaluadas (6,25, 12,5, 25, 50, 75, 100 μ M),

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

respectivamente. Los porcentajes de viabilidad celular para los 4 péptidos fueron superiores al 50% en el rango de las concentraciones evaluadas. La media de los valores de porcentaje de viabilidad celular a la concentración máxima evaluada para los péptidos Y16P89A y Y16P90, fue superior al 95%. En el caso de los péptidos M17P34 y M17P35, la media de los porcentajes de viabilidad a la concentración máxima evaluada fue de 79,4% y 55,5% respectivamente (Figura 6).

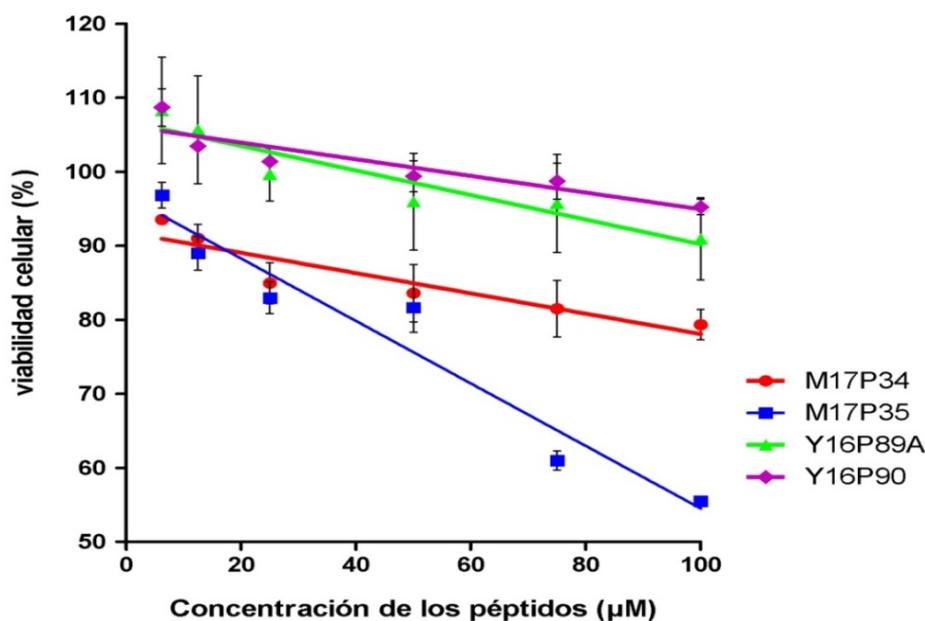


Figura 6: Porcentaje de viabilidad de células Vero expuestas a diferentes concentraciones (6,25, 12,5, 25, 50, 75, 100 µM) de los péptidos M17P34, M17P35, Y16P89A y Y16P90. Cada punto representa el valor promedio obtenido en 2 experimentos independientes por sextuplicado. Las barras representan la DS.

Los resultados demuestran que estos péptidos no son citotóxicos para las células utilizadas en el rango de las concentraciones evaluadas. Para los 4 péptidos se produjo un comportamiento lineal en la relación porcentaje de viabilidad celular-concentraciones del péptido, evidenciado mediante el empleo del programa Excel (Tabla II).

Tabla II: Valores de CC_{50} y R^2 obtenidos en la evaluación de la citotoxicidad para cada péptido en la línea celular Vero.

Péptidos	CC_{50} (µM)	R^2
M17P34	> 100	0,95
M17P35		0,93
Y16P89A		0,96
Y16P90		0,94

La citotoxicidad de los diferentes PAMs se ha evaluado en diversas líneas celulares, los resultados demuestran que dichos péptidos no son citotóxicos. De esta manera, se evaluó el efecto citotóxico de α y β -defensinas en células mononucleares de sangre periférica y en la línea celular Huh7.5. Este análisis reveló que ambas defensinas no fueron tóxicas a concentraciones tan altas como 800 μ M (Mattar et al., 2016). La evaluación de la citotoxicidad de 13 PAMs a diferentes concentraciones hasta 300 μ M en las células Vero, mostró que solamente 2 de los péptidos redujeron la viabilidad celular entre 30 y 40% en la concentración máxima (Sala et al., 2018). En otro estudio realizado utilizando las líneas celulares C6/36 y Vero, se observó que la viabilidad celular fue mayor del 80%, incluso a una concentración de los péptidos evaluados de 200 μ M (John et al., 2019). Resultados similares se encontraron en el presente trabajo, en ninguno de los péptidos investigados, se encontró actividad citotóxica para las células Vero en el rango de las concentraciones evaluadas después de 72 horas de incubación. De acuerdo a estos resultados los ensayos de actividad antiviral y virucida se realizaron utilizando los 4 péptidos a las concentraciones de 25, 50, 75 y 100 μ M.

La variabilidad entre las réplicas encontradas en nuestro estudio pudiera deberse a diferencias en los subcultivos de la línea celular Vero y en los lotes de medio de cultivo utilizados al evaluar las concentraciones de los péptidos en ensayos independientes, y a las alícuotas de los péptidos utilizados para cada ensayo, pues aunque correspondieron a una misma síntesis y purificación, se recibieron los cuatro péptidos de forma líquida y liofilizados.

V.2. Caracterización de la actividad antiviral *in vitro* de variantes peptídicas sintéticas derivadas de moldes naturales de la familia *panusin* frente a las cepas de VSRh-A y B.

Para la caracterización de la actividad antiviral *in vitro* de los péptidos truncados de moldes naturales frente al VSRh se utilizaron 2 estrategias principales (protección celular y la neutralización de la partícula viral) en las células Vero, mediante los ensayos de evaluación primaria de la actividad antiviral, inhibición del título infectivo y reducción de la actividad virucida.

V.2.1. Obtención y titulación de los bancos virales

El VSRh se replica en varias líneas celulares tales como: HEp-2, HeLa y Vero (Collins, 2007). Estas últimas poseen una morfología fibroblástica y se caracterizan por ser susceptibles y permisivas a un gran número de entidades virales. Además, resultan muy útiles para el diagnóstico de virus que producen un ECP evidente en las células infectadas. El VSRh en las células Vero provoca la degeneración progresiva de la monocapa celular, ocurriendo la destrucción total de la misma en un momento avanzado de la infección *in vitro* lo que se corresponde con el 100% del ECP. La formación de sincitios clásico del VSRh, en esta línea celular, no se hace evidente (Norrby et al., 1970).

Los estudios de la determinación *in vitro* de la actividad antiviral de un compuesto natural o sintético requieren 100 DICT₅₀/mL del virus a analizar (del Barrio G, 2000). Esto garantiza homogeneidad en las cantidades de virus empleadas en los ensayos y que la reducción en los niveles de daño celular, se produzca por el efecto de la actividad del compuesto evaluado sobre el virus y no como resultado de bajos títulos virales en el inóculo empleado.

En el presente estudio se emplearon cepas virales criopreservadas durante un largo período de tiempo, a las cuales se les realizaron 3 pases ciegos en las células Hep-2 y 3 pases en Vero para adaptarlas nuevamente a la multiplicación en cultivo e incrementar el título viral. Este procedimiento permitió obtener bancos virales para los estudios de caracterización de la actividad inhibitoria *in vitro* de los péptidos frente a las cepas virales VSRh-A y VSRh-B mantenidas en el laboratorio. En ambos casos se logró la multiplicación de las cepas virales lo cual fue evidente por la presencia de ECP del VSRh en la línea celular Vero (Figura 7).

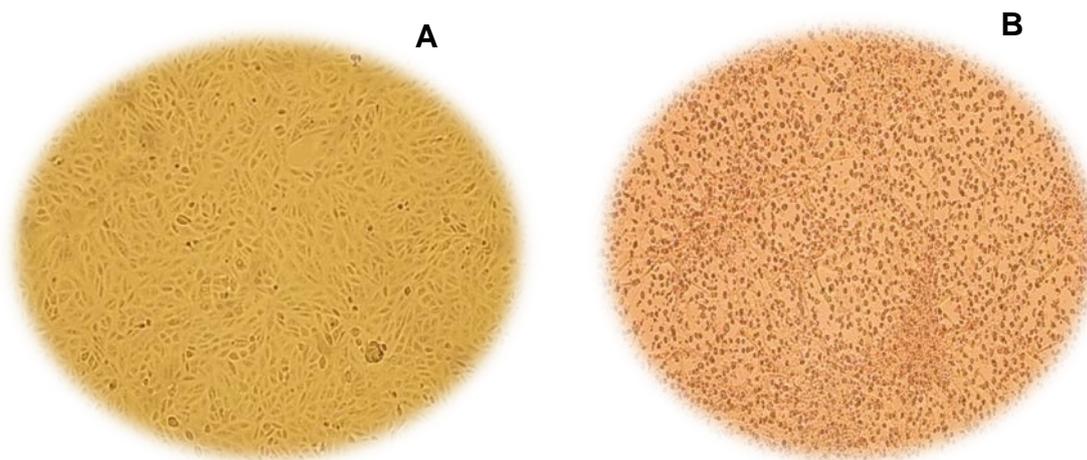


Figura 7: Efecto citopático característico producido por la multiplicación del VSRh en las células Vero. **A:** control de células y **B:** ECP (desprendimiento de la monocapa celular).

Los valores de titulación obtenidos se expresaron como la media \pm DS del título viral e $IC_{95}\% \pm 0,5 \log$, de las dos réplicas realizadas independientemente, para cada ensayo por sextuplicado. Como índice de precisión intra-ensayo se calculó el CV de estos resultados, el cual se comportó por debajo del rango establecido ($<20\%$) para ensayos biológicos en líneas celulares (Cubana, 2004; Guideline, 2005) (Tabla III).

Tabla III: Resultados del ensayo de titulación de los bancos virales empleados en el estudio.

Cepa viral	DICT ₅₀ /mL	IC ₉₅ %	DS	CV%
VSRh-A	$10^{4,82}$	$\pm 0,41$ (4,41 - 5,23)	0,09	1,91
VSRh-B	$10^{4,38}$	$\pm 0,50$ (3,88 - 4,88)	0,18	4,04

V.2.2. Ensayo de Inmunofluorescencia indirecta

Para comprobar la multiplicación viral se realizó un ensayo de IFI, utilizando diluciones decimales seriadas para el VSRh. Como se observa en la Figura 8, en las células infectadas con el virus puro, se evidenció una inmunofluorescencia total con respecto al control celular. En los pozos correspondientes a las diluciones del virus (10^{-1} - 10^{-4}), se observaron células fluorescentes. A partir de la dilución 10^{-5} no se observaron células fluorescentes.

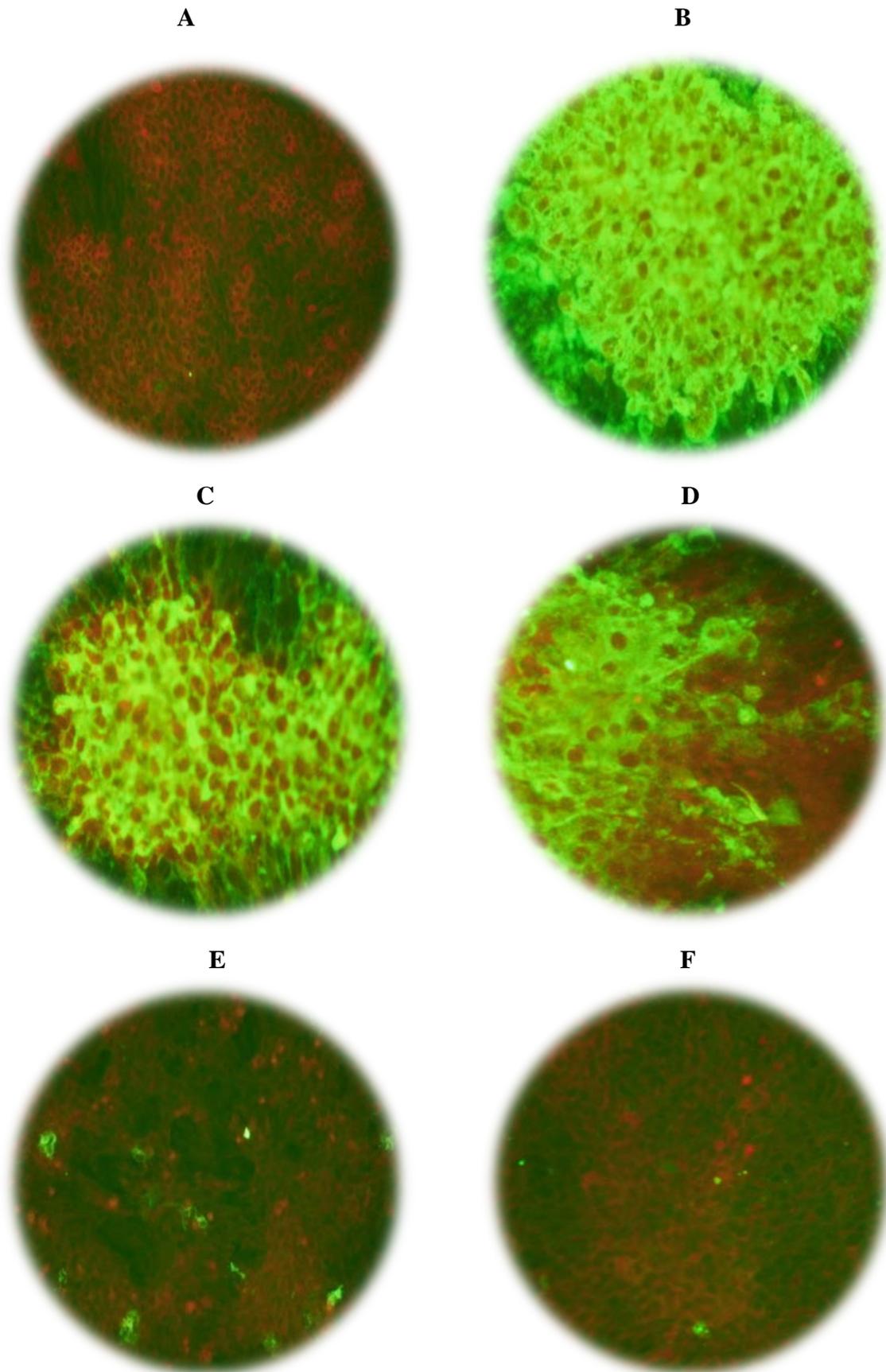


Figura 8: Titulación del VSRh en las células Vero por IFI. **A:** Control celular; **B:** virus puro, **C:** dilución 10^{-1} , **D:** 10^{-2} , **E:** 10^{-3} , **F:** 10^{-4} .

V.2.3. Ensayo de evaluación primaria de la actividad antiviral

El ensayo de evaluación primaria de la actividad antiviral se realizó para determinar si los péptidos M17P34, M17P35, Y16P89A y Y16P90 en las concentraciones evaluadas, producían un efecto protector sobre las células Vero. La actividad antiviral de un producto se puede evaluar a través de algunos marcadores virales, entre ellos la detección de ácido nucleico, Ag o proteína virales, ECP, etc. El método de detección mediante inhibición del ECP requiere que los virus evaluados sean capaces de producir ECP evidente en las células. La presencia de la actividad antiviral se verifica cuando, a concentraciones subtóxicas y crecientes del producto, ocurre una disminución de la aparición de dicho ECP (del Barrio G, 2000).

La actividad antiviral se expresó como la CE_{50} , que es la concentración del péptido requerida para reducir en un 50% el ECP después de 5 días de inoculación, comparado con el control viral. Como se observa en la Figura 9, los péptidos M17P34 y M17P35 no inhibieron la multiplicación viral de la cepa VSRh-A en ninguna de las concentraciones estudiadas, por lo que no se pudo determinar el valor de CE_{50} ni el valor de regresión lineal. Los péptidos Y16P89A y Y16P90 inhibieron la multiplicación viral pues se evidenció una disminución del ECP de la cepa VSRh-A, en 33,3% y 41,7%, respectivamente a 100 μ M con respecto al control viral (100 % ECP). El valor de CE_{50} no se pudo determinar en las concentraciones evaluadas y los valores de R^2 fueron de 0,60, concluyendo que no existe correlación ECP-concentración del péptido en la cepa VSRh-A.

Para analizar si la reducción del ECP fue significativa, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores con Bonferroni post-test. Los valores obtenidos fueron altamente significativos para los péptidos Y16P89A y Y16P90, a la concentración máxima ($p < 0,0001$). El péptido Y16P90, a la concentración máxima mostró actividad antiviral significativa ($p < 0,05$) con respecto al péptido Y16P89A.

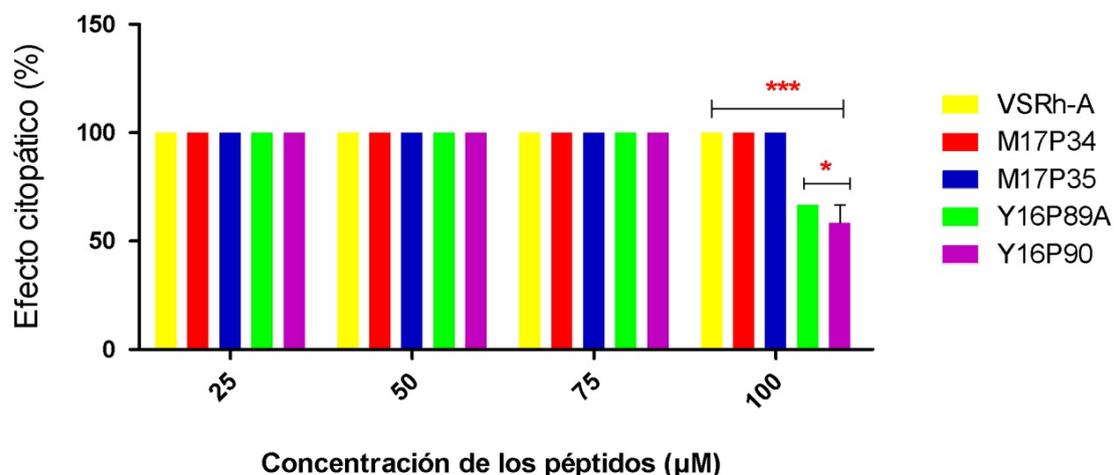


Figura 9: Comparación de la actividad viral entre los péptidos M17P34, M17P35, Y16P89A y Y16P90 y frente a la cepa VSRh-A. Y16P89A-VSRh-A: (***) $p < 0,001$); Y16P90-VSRh-A: (***) $p < 0,001$); Y16P90-Y16P89A: (* $p < 0,05$).

Para la cepa VSRh-B, los péptidos se comportaron de forma diferente (Figura 10). El péptido M17P34 no inhibió la multiplicación viral en ninguna de las concentraciones evaluadas, por lo que no se pudo determinar su valor de CE_{50} ni el valor de regresión lineal. En los péptidos M17P35 y Y16P89A se observó una inhibición de la multiplicación viral concentración-dependiente con valores de correlación de 0,99 y 0,90, respectivamente. Esta inhibición fue mayor para M17P35, obteniéndose una reducción de 91,7% del ECP a 100 μM , con un valor de CE_{50} de 68,7 μM . El péptido Y16P89A a la concentración máxima, mostró una reducción de 66,7% y valor de CE_{50} de 83,3 μM . Por último, el Y16P90 inhibió el 50% del ECP solo a la concentración máxima, por lo que su valor de CE_{50} fue de 50 μM . El valor de regresión fue de 0,60, por lo que no se obtuvo correlación ECP-concentraciones del péptido. El valor del IS como parámetro de la magnitud de la actividad antiviral de los péptidos evaluados no se determinó pues no se pudo obtener el valor de CC_{50} .

Para analizar cuál de los péptidos mostró mayor actividad antiviral frente a la infección con la cepa de VSRh-B, se aplicó un ANOVA de dos factores con Bonferroni post-test. A la concentración de 50 μM , solo el péptido M17P35 mostró diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) con respecto al control viral y al resto de los péptidos. A 75 μM , los péptidos Y16P89A y M17P35 mostraron diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) con respecto al control viral y a los péptidos M17P34 y Y16P90. Entre ellos (Y16P89A y M17P35), también se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$). A la

máxima concentración, los péptidos M17P35, Y16P89A y Y16P90 mostraron diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$), con respecto al VSRh-B y al péptido M17P34. A su vez el péptido M17P35 mostró actividad antiviral altamente significativas ($p < 0,0001$) con respecto a los péptidos Y16P89A y Y16P90. El péptido Y16P89A mostró una diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto al péptido Y16P90.

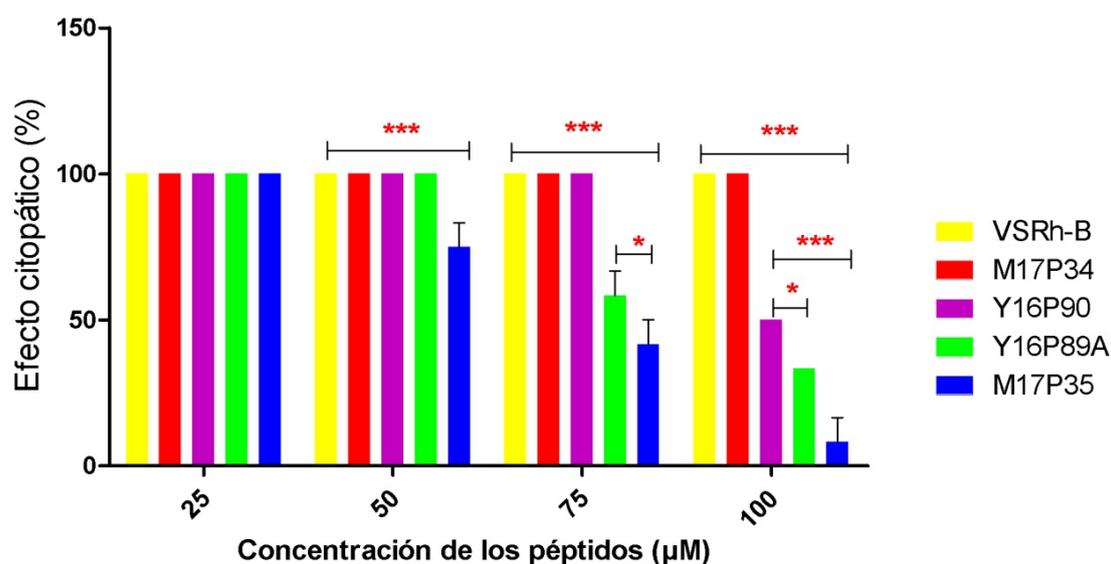


Figura 10: Comparación de la actividad antiviral entre los péptidos M17P34, M17P35, Y16P89A y Y16P90 y frente a la cepa VSRh-B. M17P35-VSRhB: 50, 75 y 100 µM (** $p < 0,0001$); Y16P89A-VSRh-B: 75 y 100 µM (** $p < 0,0001$); Y16P90-VSRh-B: 100 µM (** $p < 0,0001$); M17P35-Y16P89A: 75 µM (* $p < 0,05$) y 100 µM (** $p < 0,0001$); M17P35-Y16P90: 100 µM (** $p < 0,0001$); Y16P89A-Y16P90: 100 µM (* $p < 0,05$).

Algunos estudios han evaluado la actividad antiviral de PAMs (catelicidinas) frente al VSRh *in vitro* e *in vivo*. Currie y colaboradores en el 2013 utilizando el péptido LL-37 y 3 péptidos truncados del mismo (C-terminal, región central y N-terminal), encontraron que solamente el péptido completo y el fragmento de la región central presentaron actividad antiviral significativa en la línea celular Hep-2 (Currie et al., 2013). Posteriormente, utilizando este mismo péptido y un análogo del mismo, solo se encontró actividad antiviral significativa cuando las células Calu-3 se trataron con el péptido completo previo a la infección (Harcourt et al., 2016).

Las defensinas constituyen la primera línea de defensa contra la invasión de los microorganismos. Se expresan principalmente en las células epiteliales del tracto respiratorio, gastrointestinal y genitourinario (Yang et al., 2004). Las células del tracto

respiratorio expresan 4 tipos de hBD (1-4), de ellas la hBD-2 se expresa con mayor frecuencia desde la cavidad oral hasta los pulmones (Diamond et al., 2000). Algunos estudios sugieren que existe una estrecha relación entre la expresión de las hBD-2 y la patogénesis de las infecciones respiratorias virales, favoreciendo la protección o el incremento de la severidad de la infección (Kota et al., 2008; Olvera and Gutiérrez, 2018).

La evaluación de la actividad antiviral de las hBD frente al VSRh esta pobremente estudiada. Se ha demostrado que durante la infección, las células epiteliales no infectadas expresan las hBD-2 restringiendo la multiplicación viral. Esta expresión ocurre como resultado de la activación de NF- κ B y la producción de TNF en respuesta a la infección viral (Kota et al., 2008). En el 2015, Morales y colaboradores, evaluaron *in vitro* la actividad antiviral en la multiplicación del VSRh y Adenovirus de la hBD-2 recombinante. Estos ensayos demostraron que esta hBD a altas concentraciones, inhibió completamente la replicación del VSRh y parcialmente la del Adenovirus (Morales et al., 2015).

La actividad antiviral de las β -defensinas-2 y 3 (humana y de ratón) se ha evaluado en las células MDCK frente a diversas cepas de virus influenza. Los resultados de estos ensayos mostraron, que altas concentraciones de estas defensinas inhibían significativamente la multiplicación viral, bloqueando la unión y la entrada del virus a la célula (Doss et al., 2009; Gong et al., 2010; Jiang et al., 2012).

En otras entidades virales también se ha demostrado la actividad antiviral de las hBD. En el 2010, Scudiero y colaboradores en la línea celular Vero estudiaron las propiedades antivirales de las hBD 1 y 3, además de cinco péptidos sintéticos análogos de estas. Dos de ellos 1N y 1C correspondiente a las regiones N y C-terminal, análogos de la hBD-1 y el resto, 3N (N-terminal), 3I (dominio interno) y 3C (C-terminal) análogos de la hBD-3. Todos los péptidos inhibieron la multiplicación viral dependiendo de la concentración de los mismos. A 50 μ M el hBD-3 inhibió casi totalmente la infección viral, el análogo 3N, redujo la infección viral un 90%, el 1C un 66% y 3I un 73%. En los péptidos restantes la inhibición de la multiplicación fue por debajo del 40%. Estos autores concluyeron que ambos dominios N y C-terminal de hBD-3 son determinantes en la actividad antiviral (Scudiero et al., 2010). Con el VIH-1, se encontró que la hBD 2 y 3 inhiben la replicación viral (Quinones-Mateu et al., 2003) y protegen contra la infección

(Sun et al., 2005). Las hBD inhibieron la multiplicación del virus de la hepatitis C en las células mononucleares de sangre periférica y Huh7.5 entre 20 y 50 μM , sin embargo las β -defensinas aviarias solo inhibieron la infección viral cuando se usó una concentración de 250 μM (Mattar et al., 2016). También con el virus vaccinia se demostró que la hBD-3 tuvo un potente efecto antiviral (Howell et al., 2007). Similarmente la hBD-3 inhibió el título infectivo del coxsackievirus A16 y B5, enterovirus 71, poliovirus 1 (Chen et al., 2018) y HSV-2 (Hazrati et al., 2007).

En el presente estudio los resultados encontrados fueron similares a los descritos anteriormente para los virus respiratorios. En el subgrupo A, solo los péptidos derivados de *panusin* (C- terminal y N-terminal) mostraron protección celular parcial a la máxima concentración evaluada. En la cepa del subgrupo B, los péptidos M17P35, Y16P89A inhibieron la multiplicación viral dependiente de las concentraciones de los mismos, el péptido Y16P90 en cambio, solo a 100 μM mostró una protección parcial de la línea celular ante la infección por este subgrupo.

V.2.4. Ensayo de inhibición del título infectivo.

Para confirmar la actividad antiviral de los péptidos que inhibieron el ECP y obtener información adicional de la efectividad de los mismos, se realizó un ensayo de inhibición del título infectivo. El péptido Y16P90 aunque mostró inhibición parcial del ECP en los ensayos primarios de actividad antiviral para ambos subgrupos, no se pudo evaluar, por la no disponibilidad del mismo.

El péptido Y16P89A en todas las concentraciones evaluadas mostró reducción del título viral de 0,6 (25 y 50 μM), 1,4 (75 μM) y 2,8 (100 μM) \log_{10} DICT₅₀/mL respectivamente. Esta inhibición fue significativa ($p < 0,05$) en las concentraciones 25 y 50 μM y altamente significativas ($p < 0,001$) en las concentraciones de 75 y 100 μM (Figura 11).

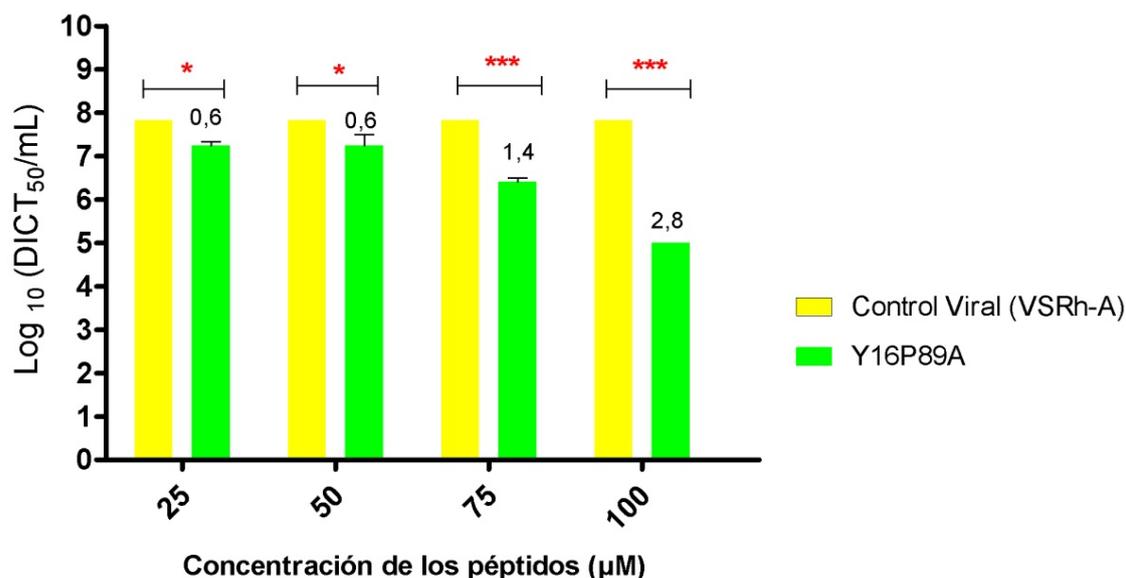


Figura 11: Reducción del título infeccioso del VSRh-A por la acción del péptido Y16P89A. 25 y 50 µM (*p<0,05); 75 y 100 µM (***p<0,001).

En la Tabla IV se muestran los valores obtenidos en la titulación del VSRh-A frente a la acción del péptido Y16P89A, expresada como la media ± DS de ambas réplicas por sextuplicado. Como parámetro de precisión se calculó el CV. Los resultados se encuentran dentro de los parámetros establecidos para la prueba.

Tabla IV: Valores obtenidos en la titulación del ensayo de inhibición del título infeccioso del VSRh-A por la acción del péptido Y16P89A.

	Concentración (µM)	DICT ₅₀ /mL	IC ₉₅ %	DS	CV%
Control Viral (VSRh-A)	-	10 ^{7,83}	± 0,41 (7,42-8,24)	0	0
Y16P89A + VSRh-A	25	10 ^{7,25}	± 0,44 (6,81-7,69)	0,11	1,56
	50	10 ^{7,25}	± 0,56 (6,69-7,81)	0,35	4,88
	75	10 ^{6,42}	± 0,50 (5,92-6,92)	0,12	1,87
	100	10 ^{5,0}	± 0,49 (4,51-5,49)	0	0

Los péptidos M17P35 y Y16P89A mostraron actividad inhibitoria del título infeccioso frente a la infección por VSRh-B. Como se muestra en la Figura 12, el péptido M17P35 fue capaz de disminuir el título viral con valores muy significativos (p<0,01) de reducción de 0,7 log₁₀ DICT₅₀/mL con respecto al control viral, en la concentración de 50 µM. La reducción en las concentraciones de 75 y 100 µM fueron altamente

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

significativas ($p < 0,001$) de 1,8 y 2,2 \log_{10} DICT₅₀/mL. El péptido Y16P89A tuvo efecto inhibitorio sobre la multiplicación viral, en todas las concentraciones evaluadas, dicho efecto fue muy significativo ($p < 0,01$) en la concentración de 25 μ M, con valores de reducción de 0,8 \log_{10} DICT₅₀/mL con respecto al control viral. En las concentraciones de 50, 75 y 100 μ M se obtuvieron valores de reducción del título viral de 1,0, 1,3 y 2,1 \log_{10} DICT₅₀/mL, respectivamente. Estos resultados fueron altamente significativos ($p < 0,001$) con respecto a la cepa viral B. Entre ellos se encontró diferencias muy significativas ($p < 0,01$) solo en la concentración mínima. El resto de los valores de reducción del título infeccioso se comportaron de manera similar para ambos péptidos en las concentraciones evaluadas.

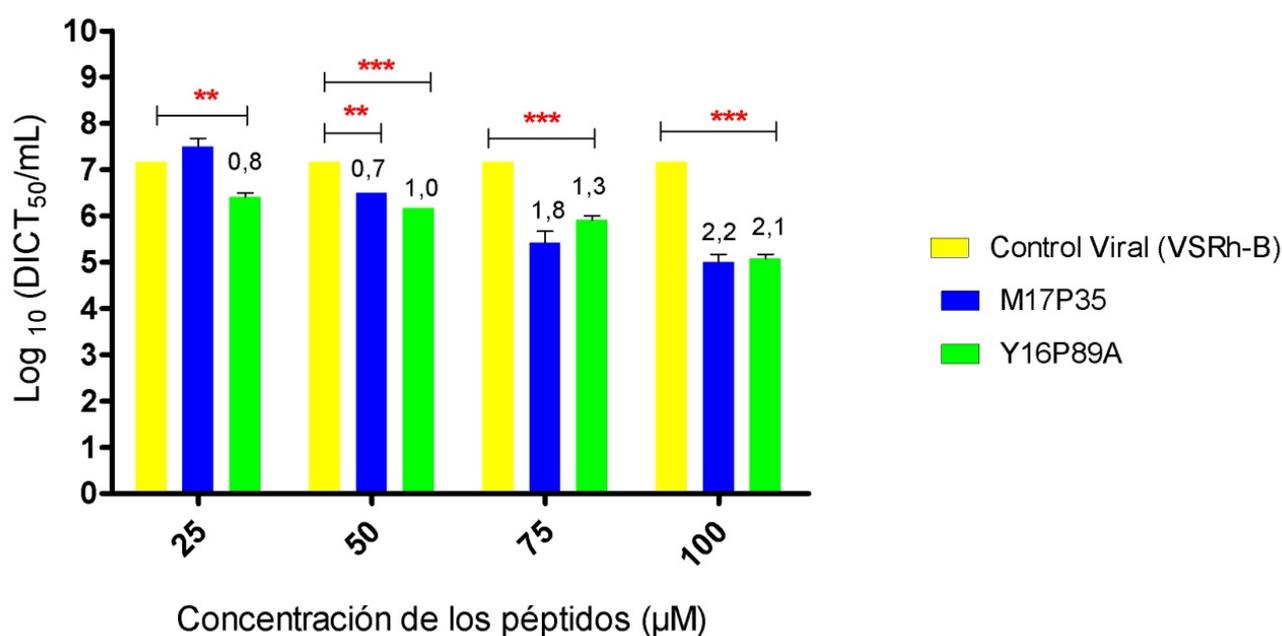


Figura 12: Reducción del título infeccioso de la cepa VSRh-B por la acción de los péptidos M17P35 y Y16P89A. M17P35-VSRh-B: 50 μ M (** $p < 0,01$), 75 y 100 μ M (***) ($p < 0,001$) Y16P89A-VSRh-B: 25 μ M (** $p < 0,01$), 50, 75 y 100 μ M (***) ($p < 0,001$), Y16P89A -M17P35: 25 μ M (** $p < 0,01$).

Los valores obtenidos en la titulación de VSRh-B por la acción de los péptidos M17P35 y Y16P89A, expresados como la media \pm DS de ambas réplicas por sextuplicado se observan en la (Tabla V). Como parámetro de precisión se calculó el CV. Estos resultados se encuentran dentro de los parámetros establecidos para la prueba.

Tabla V: Valores obtenidos en la titulación del ensayo de inhibición del título infectivo del VSRh-B por la acción de los péptidos Y16P89A y M17P35.

	Concentración (μM)	DICT₅₀/m L	IC₉₅%	DS	CV%
Control Viral (VSRh-B)	-	$10^{7,17}$	$\pm 0,55$ (6,62-7,72)	0	0
VSRh-B + M17P35	25	$10^{7,50}$	$\pm 0,53$ (6,97-8,03)	0,24	3,21
	50	$10^{6,50}$	$\pm 0,52$ (5,98-7,02)	0	0
	75	$10^{5,42}$	$\pm 0,49$ (4,93-5,91)	0,35	6,52
	100	$10^{5,00}$	$\pm 0,41$ (4,59-5,41)	0,24	4,81
VSRh-B + Y16P89A	25	$10^{6,42}$	$\pm 0,50$ (5,92-6,92)	0,12	1,87
	50	$10^{6,18}$	$\pm 0,48$ (5,69-6,65)	0	0
	75	$10^{5,92}$	$\pm 0,43$ (5,49-6,35)	0,12	2,03
	100	$10^{5,09}$	$\pm 0,50$ (4,59-5,59)	0,12	2,36

Currie y colaboradores durante la evaluación de la actividad antiviral del LL-37 en células Hep2 frente a VSRh, examinaron el efecto de este péptido en la reducción del título viral. Los resultados obtenidos en este estudio, demostraron que ocurrió una disminución muy significativa de la formación de nuevas partículas virales infecciosas y consecuentemente de la diseminación viral (Currie et al., 2013).

La evaluación de la reducción del título infectivo del VSRh por la acción de las hBD y/o PADs esta pobremente estudiada. Nosotros no encontramos reportes en la literatura que hablan al respecto. En nuestro estudio encontramos que los péptidos M17P35 y Y16P89A inhibieron significativamente el título viral del VSRh y su posible diseminación al resto de las células no infectadas.

V.2.5. Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta

Para determinar si existió inhibición de la multiplicación viral por la acción de los péptidos y confirmar los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antiviral, se realizó un ensayo de IFI a la concentración máxima (100 μM) del péptido Y16P89A frente a ambas cepas del VSRh y el péptido M17P35 solo frente al subgrupo B. Como se observa en la Figura 13, para el subgrupo A, fue evidente una disminución de la

multiplicación viral en presencia del péptido Y16P89A, lo que se corrobora con una disminución marcada de las células fluorescentes.

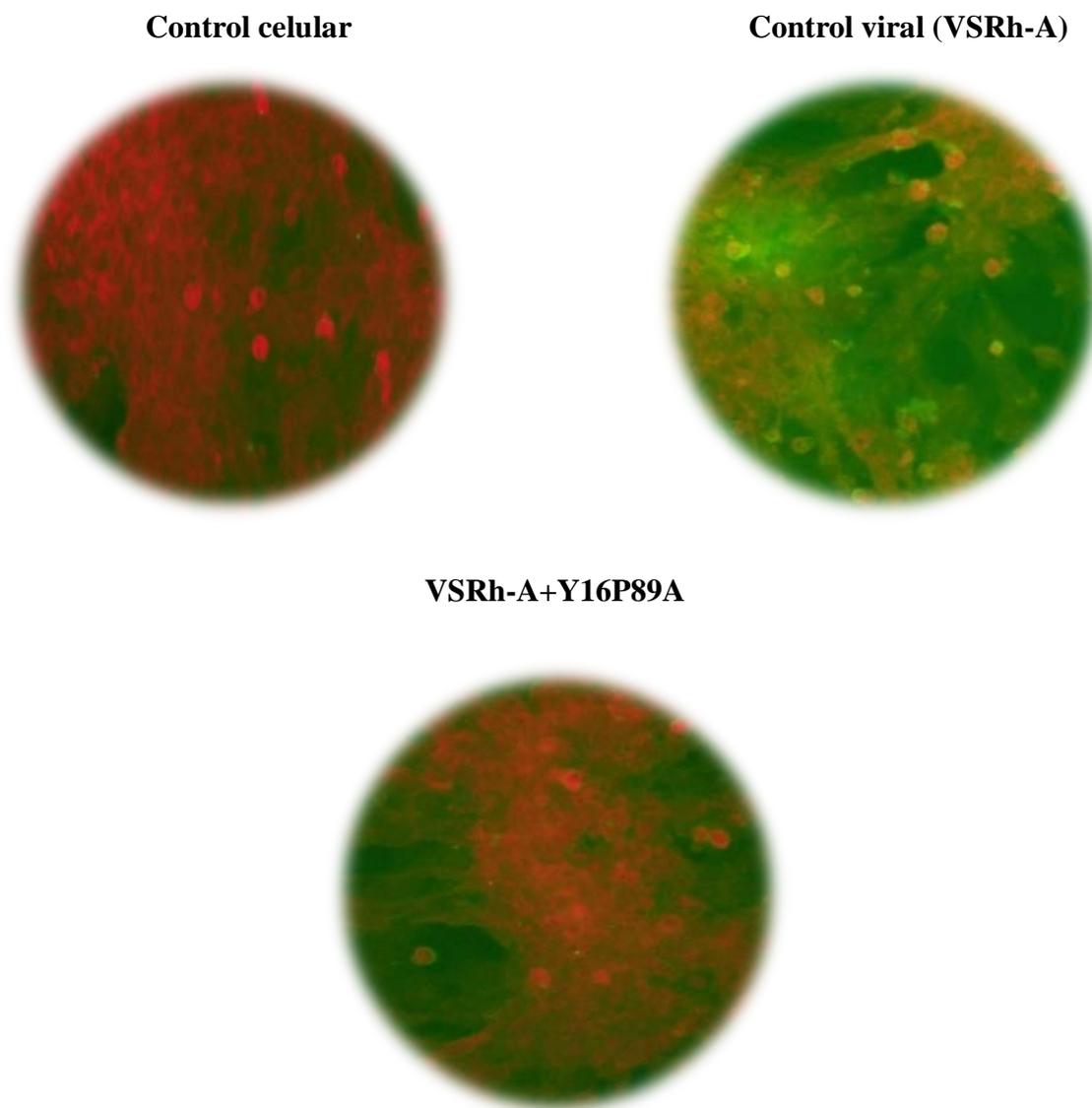


Figura 13: Resultado del ensayo de IFI en las células Vero previamente tratadas con el péptido Y16P89A e infectadas con VSRh-A.

En el subgrupo B (Figura 14), en las células tratadas con ambos péptidos e infectadas con este subgrupo, se observó una disminución de las células fluorescentes, lo que evidencia una disminución de la multiplicación viral.

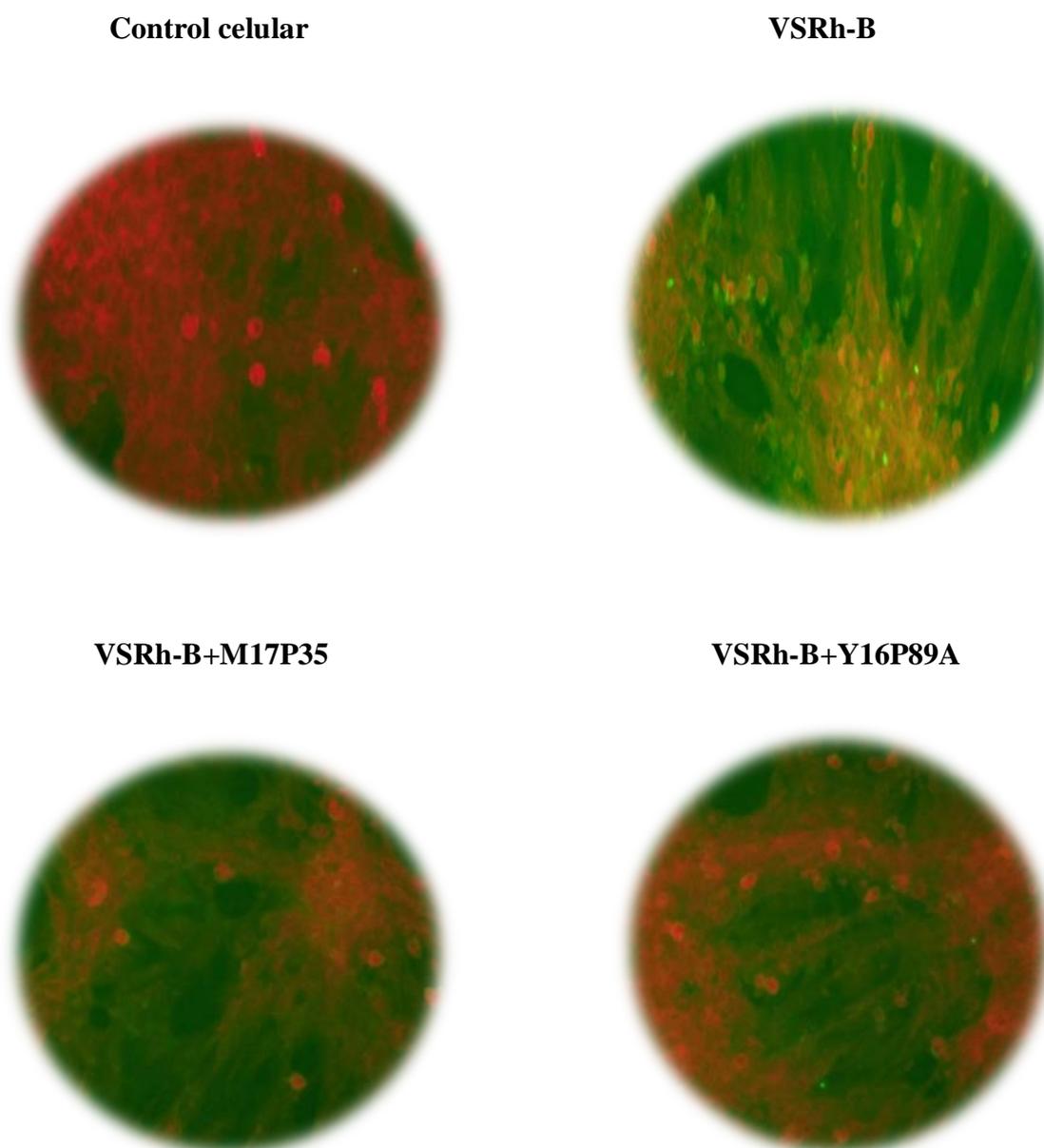


Figura 14: Resultado del ensayo de IFI en las células Vero tratadas previamente con 100 μ M de los péptido M17P35 y Y16P89A e infectadas con VSRh-B.

Para la entrada del virus a la célula existen tres etapas, que incluyen unión, fusión y penetración (Sun and Whittaker, 2003). Para definir cuál de estas etapas se inhibió por la acción de la mBD-2 recombinante en el virus influenza, se realizaron ensayos cinéticos en las células MDCK, utilizando la inmunofluorescencia. Estos resultados demostraron que la mBD-2 recombinante inhibió la infección viral al bloquear la

entrada del virus a las células (Gong et al., 2010). Resultados similares encontramos en el presente estudio, utilizando un AcM contra la proteína F del VSRh. Este ensayo se realizó solamente en las células tratadas con los péptidos a la concentración máxima e infectadas posteriormente con ambas cepas virales y se observó, una disminución de las células fluorescentes. Estos resultados sugieren que los péptidos M17P35 y Y16P89A pudieran actuar sobre los receptores celulares, impidiendo la unión del virus a la célula.

V.2.6. Ensayo de la Actividad Virucida

El ensayo de actividad virucida se realizó para determinar si los péptidos M17P34, M17P35, Y16P89A y Y16P90 en las concentraciones evaluadas producen un efecto neutralizante directo sobre la partícula viral. Para esto, la suspensión viral de cada subgrupo se incubó con cada péptido (25, 50, 75, 100 μM) durante una hora. En el caso de Y16P90, el ensayo sólo se pudo realizar a las concentraciones de 25 y 50 μM en el subgrupo B, debido a la no disponibilidad de péptido.

Los resultados obtenidos demuestran que en el subgrupo A, sólo el péptido Y16P89A, neutraliza escasamente la partícula viral a las concentraciones máximas (75 y 100 μM), al reducir el título viral en 0,7 \log_{10} DICT₅₀/mL en ambos casos. Mediante un análisis de ANOVA de dos factores con Bonferroni post test se confirmó que esta reducción fue muy significativa ($p < 0,01$) (Figura 15).

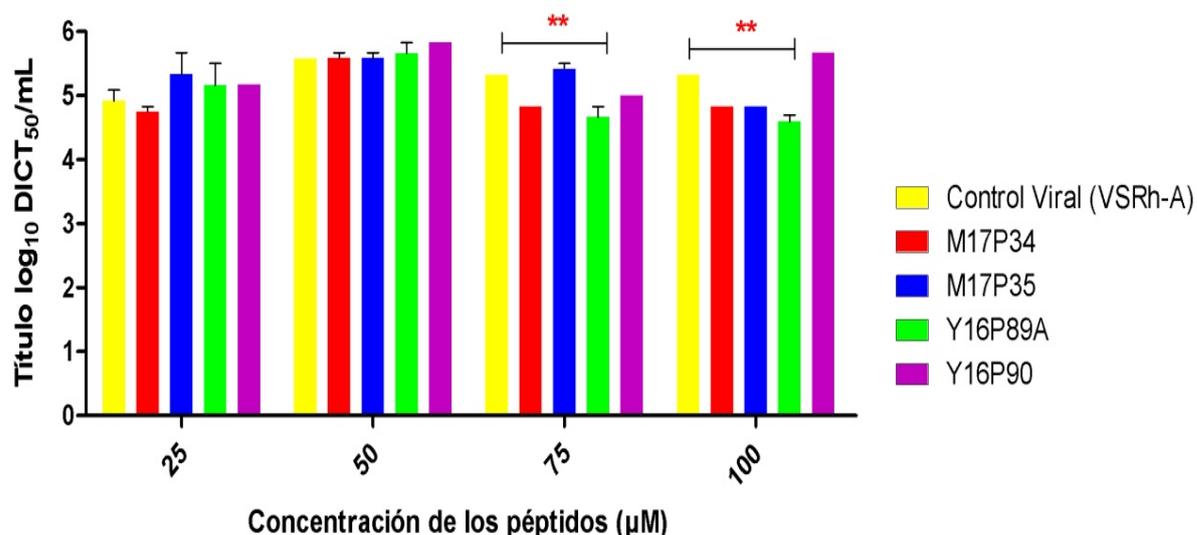


Figura 15: Actividad virucida de los péptidos en las concentraciones evaluadas frente a la cepa VSRh-A. Y16P89A-VSRh-A: 75 y 100 μM (** $p < 0,01$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La media \pm DS de los valores obtenidos de la titulación en el ensayo virucida (2 réplicas, por sextuplicado cada concentración) son expuestos en la Tabla VI. Como parámetro de precisión intra-ensayo se determinó además el CV. Los resultados obtenidos se encuentran dentro de los parámetros establecidos para el estudio.

Tabla VI: Resultados de los valores obtenidos de la titulación en el ensayo virucida de los péptidos contra VSRh-A.

	Concentración (μ M)	DICT ₅₀ /mL	IC ₉₅ %	DS	CV%
Control Viral (VSRH-A)	-	$10^{4,92}$	$\pm 0,45$ (4,47-5,37)	0,24	4,82
M17P34	25	$10^{4,75}$	$\pm 0,47$ (4,28-5,20)	0,11	2,38
M17P35		$10^{5,34}$	$\pm 0,51$ (4,83-5,85)	0,47	8,88
Y16P89A		$10^{5,17}$	$\pm 0,50$ (4,67-5,67)	0,47	9,17
Y16P90		$10^{5,17}$	$\pm 0,41$ (4,76-5,58)	0	0
Control Viral (VSRH-A)	-	$10^{5,58}$	$\pm 0,50$ (5,08-6,08)	0	0
M17P34	50	$10^{5,59}$	$\pm 0,50$ (5,09-6,09)	0,23	5
M17P35		$10^{5,58}$	$\pm 0,50$ (5,08-6,08)	0,12	2,15
Y16P89A		$10^{5,67}$	$\pm 0,44$ (5,23-6,11)	0,23	4,12
Y16P90		$10^{5,83}$	$\pm 0,41$ (5,42-6,24)	0	0
Control Viral (VSRH-A)	-	$10^{5,33}$	$\pm 0,53$ (4,80-5,86)	0	0
M17P34	75	$10^{4,83}$	$\pm 0,41$ (4,42-5,24)	0	0
M17P35		$10^{5,42}$	$\pm 0,56$ (4,86-5,98)	0,12	2,2
Y16P89A		$10^{4,67}$	$\pm 0,50$ (4,17-5,17)	0,23	5
Y16P90		$10^{5,00}$	$\pm 0,44$ (4,56-5,56)	0	0
Control Viral (VSRH-A)	-	$10^{5,33}$	$\pm 0,53$ (4,80-5,86)	0	0
M17P34	100	$10^{4,83}$	$\pm 0,41$ (4,42-5,24)	0	0
M17P35		$10^{4,83}$	$\pm 0,41$ (4,42-5,24)	0	0
Y16P89A		$10^{4,60}$	$\pm 0,40$ (4,20-5,00)	0,14	3
Y16P90		$10^{5,67}$	$\pm 0,33$ (5,34-6,00)	0	0

Como se muestra en la Figura 16, en el subgrupo B, a las concentraciones evaluadas, ninguno de los péptidos tuvo actividad neutralizante sobre la partícula viral del VSRh. Mediante un análisis de varianzas (ANOVA) de dos factores con corrección de Bonferroni pos test se confirmó que no hubo reducción significativa ($p > 0,05$) con respecto al control viral.

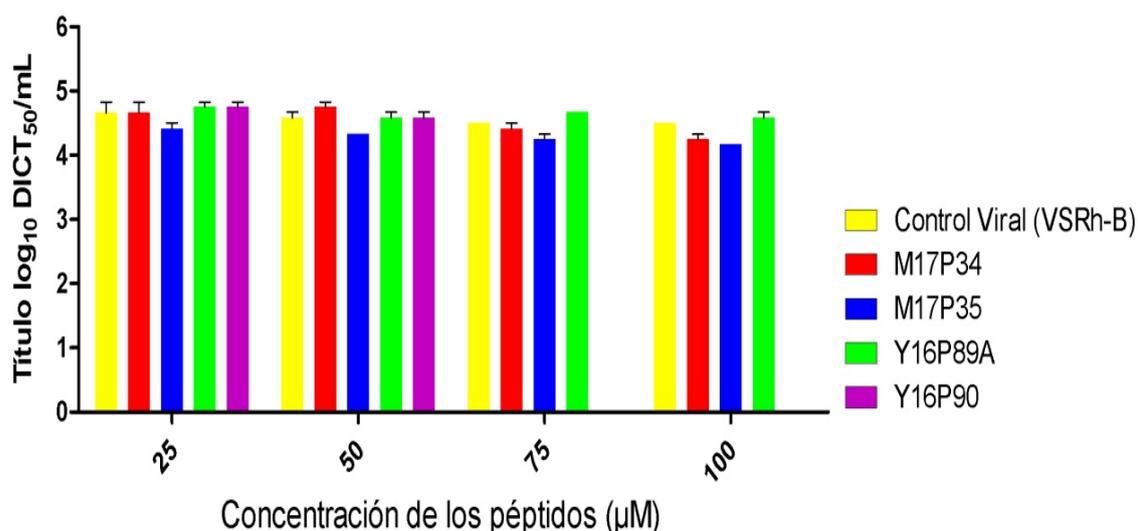


Figura 16: Actividad virucida de los péptidos en las concentraciones evaluadas contra VSRh-B.

La media \pm DS de los valores obtenidos de la titulación en el ensayo virucida (2 réplicas, por sextuplicado cada concentración) son expuestos en la Tabla VII. Como parámetro de precisión intra-ensayo se determinó además el CV. Los resultados obtenidos se encuentran dentro de los parámetros establecidos para el estudio.

Tabla VII: Resultados de los valores obtenidos de la titulación en el ensayo virucida de los péptidos contra VSRh-B

	Concentración (µM)	DICT ₅₀ /mL	IC ₉₅ %	DS	CV%
Control Viral (VSRH-B)	-	10 ^{4,67}	± 0,56 (4,11-5,23)	0,23	5
M17P34	25	10 ^{4,67}	± 0,45 (4,22-5,12)	0,23	5
M17P35		10 ^{4,42}	± 0,43 (3,99-4,85)	0,12	2,72
Y16P89A		10 ^{4,75}	± 0,39 (4,42-5,08)	0,11	2,38
Y16P90		10 ^{4,75}	± 0,55 (4,20-5,30)	0,11	2,38
Control Viral (VSRH-B)		-	10 ^{4,59}	± 0,46 (4,13-5,05)	0,12
M17P34	50	10 ^{4,75}	± 0,37(4,38-5,12)	0,11	2,38
M17P35		10 ^{4,33}	± 0,40 (3,93-4,73)	0	0
Y16P89A		10 ^{4,59}	± 0,46 (4,13-5,05)	0,12	2,62
Y16P90		10 ^{4,59}	± 0,33 (4,26-4,92)	0,12	2,62
Control Viral (VSRH-B)	-	10 ^{4,50}	± 0,58 (3,92-5,08)	0	0
M17P34	75	10 ^{4,42}	± 0,50 (3,92-4,92)	0,12	2,72
M17P35		10 ^{4,25}	± 0,43 (3,82-4,68)	0,11	2,72
Y16P89A		10 ^{4,67}	± 0,33 (4,34-5,00)	0	0

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Y16P90		-			
Control Viral (VSRH-B)	-	$10^{4,50}$	$\pm 0,58$ (3,92-5,08)	0	0
M17P34	100	$10^{4,25}$	$\pm 0,47$ (3,78-4,72)	0,11	2,66
M17P35		$10^{4,17}$	$\pm 0,44$ (3,73-4,61)	0	0
Y16P89A		$10^{4,59}$	$\pm 0,17$ (4,42-4,76)	0,12	2,62
Y16P90		-			

Diferentes estudios han evaluado la actividad virucida de los β -defensinas en algunas entidades virales. Desafortunadamente, no ha sido publicado hasta el presente ningún estudio relacionado con la actividad virucida de las β -defensinas contra el VSRh. Solamente, se ha estudiado *in vitro* la interacción entre este virus y la catelicidina (LL-37). Harcourt y colaboradores demostraron que la preincubación del virus con este péptido a 50 μ M, impidió eficientemente la unión del virus a la célula. Estos resultados son consistentes a los reportados en estudios previos donde se demostró que este péptido actúa directamente sobre la partícula viral, desestabilizando su envoltura e impidiendo su unión a las células (Currie et al., 2013; Currie et al., 2016).

Existen otros trabajos en los que se evalúa la actividad de las β -defensinas frente a otras entidades virales, por ejemplo Mattar y colaboradores demostraron la actividad extracelular de las hBD y una β - defensina aviar frente al virus de la hepatitis C. Estos resultados revelaron que todas las hBD tuvieron una actividad virucida significativa a bajas concentraciones de los péptidos. A diferencia de esto, la β - defensina aviar, solo mostró actividad virucida a la concentración máxima evaluada (250 μ M) (Mattar et al., 2016). La actividad virucida de 2 hBD (1 y 3) y 5 análogos (1N, 1C, 3N, 3C y 3I) de estas, se evaluaron frente al VHS a una concentración de 20 μ M. Las hBD-1 y 1N mostraron escasa actividad virucida, las hBD-3, 3C, 3I y 1C actividad virucida parcial, mientras que la 3N mostró actividad virucida significativa (Scudiero et al., 2010). Más recientemente se encontró que la hBD3 posee una potente actividad virucida frente al Enterovirus 71 (Chen et al., 2018).

Los resultados obtenidos en el presente estudio no coinciden con los reportados en la literatura para otras entidades virales. En las concentraciones evaluadas para cada péptido se encontró actividad neutralizante escasa sobre la partícula viral solo en las

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

concentraciones de 75 y 100 μM del péptido Y16P89A frente al subgrupo A. Los demás péptidos no mostraron actividad virucida en ninguno de las cepas virales de VSRh.

Este trabajo constituye el primer estudio realizado en Cuba y a nivel internacional, donde se evalúa la actividad antiviral de péptidos análogos de *panusin* contra el VSRh. Como es conocido, este virus constituye uno de los patógenos más importantes asociado con infección del TRI en lactantes y niños menores de 5 años, para los cuales actualmente no existe una vacuna o tratamiento específico. Los resultados obtenidos en la presente investigación son de gran utilidad pues se realiza un exhaustivo estudio de un posible compuesto antiviral que inhibió significativamente la multiplicación del VSRh, con baja citotoxicidad, además de su bajo costo. Estos resultados sientan las bases para futuras investigaciones que proporcionarán nuevas alternativas para el diseño de posibles drogas antivirales basadas en PAMs.

IV. CONCLUSIONES

Los péptidos analizados no fueron citotóxicos en las concentraciones evaluadas para las células Vero, lo que permitió su utilización en los ensayos de caracterización de la actividad antiviral.

La actividad antiviral observada contra el VSRh empleando concentraciones máximas de los péptidos derivados de la familia *panusin* permite sugerir que un aumento de la concentración inhibirá la replicación de esta entidad viral en las células Vero.

Los ensayos de inhibición del título infectivo e inmunofluorescencia sugieren la capacidad de algunos péptidos de afectar la unión del virus a la célula e inhibir la formación de nuevas partículas virales infectivas de VSRh.

La ausencia de la actividad virucida de los péptidos evaluados pudiera estar relacionada con la incapacidad de estas moléculas para neutralizar directamente la partícula viral en células Vero.

Los ensayos demostraron que es posible contar con un péptido sintético de la región C-terminal de *panusin* como posible agente antiviral contra el VSRh.

VII. RECOMENDACIONES

Continuar los estudios de caracterización *in vitro* de la actividad antiviral de las variantes peptídicas más efectivas modificando las concentraciones de los péptidos frente al VSRh..

Realizar los ensayos de tiempo de adición de las variantes peptídicas más efectivas frente al VSRh

Realizar los estudios de caracterización *in vitro* de la actividad antiviral de otros moldes naturales conocidos de la familia tipo *panusin*.

Realizar estudios mediante PCR en tiempo real para cuantificar la carga viral de los sobrenadantes obtenidos en los ensayos de evaluación de la actividad antiviral frente a VSRh en células Vero.

Estudiar los determinantes estructurales que muestran el potencial antiviral de estos péptidos sobre VSRh.

Realizar estudios en modelos experimentales *in vivo* de las variantes peptídicas más efectivas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agoti, C.N., Otieno, J.R., Gitahi, C.W., Cane, P.A., Nokes, D.J., 2014. Rapid Spread and Diversification of Respiratory Syncytial Virus Genotype ON1, Kenya. *Emerg Infect Dis* 20, 950-959.

Agoti, C.N., et al., 2015. Local evolutionary patterns of human respiratory syncytial virus derived from whole-genome sequencing. *J Virol* 89, 3444-3454.

Alejo, V.M., 2017. Identificación de una familia de péptidos de tipo B-defensina con actividad antimicrobiana en la langosta *Panulirus argus* (Latreille, 1804). Editorial Universitaria.

Alvarez, A.L., et al., 2009. In vitro anti-herpetic activity of an aqueous extract from the plant *Phyllanthus orbicularis*. *Phytomedicine* 16, 960-966.

Anderson, L.J., et al., 2013. Strategic priorities for respiratory syncytial virus (RSV) vaccine development. *Vaccine* 31 Suppl 2, B209-215.

Anderson, L.J., et al., 1985. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 151, 626-633.

Andersson, D.I., Hughes, D., Kubicek-Sutherland, J.Z., 2016. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resist Updat* 26, 43-57.

Antonelli, G., Turriziani, O., 2012. Antiviral therapy: old and current issues. *Int J Antimicrob Agents*.

Ashrafuzzaman, M., Naim, Z., Billah, M., Rana, S., 2017. EC MICROBIOLOGY Review Article Replication and Transcriptional Regulation Review of Respiratory Syncytial Virus (RSV).

Avadhanula, V., et al., 2014. Infection with Novel Respiratory Syncytial Virus Genotype Ontario (ON1) in Adult Hematopoietic Cell Transplant Recipients, Texas, 2011-2013. *J Infect Dis*.

Battles, M.B., et al., 2016. Molecular mechanism of respiratory syncytial virus fusion inhibitors. *Nat Chem Biol* 12, 87-93.

Bauer, F., et al., 2001. Structure determination of human and murine beta-defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity. *Protein Sci* 10, 2470-2479.

Behera, A.K., et al., 2001. Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 188-195.

Beisswenger, C., Bals, R., 2005. Antimicrobial peptides in lung inflammation. *Chemical immunology and allergy* 86, 55-71.

Blanken, M.O., Koffijberg, H., Nibbelke, E.E., Rovers, M.M., Bont, L., 2013. Prospective validation of a prognostic model for respiratory syncytial virus bronchiolitis in late preterm infants: a multicenter birth cohort study. *PLoS ONE* 8, e59161.

Boman, H.G., 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual review of immunology* 13, 61-92.

Boyoglu-Barnum, S., et al., 2014. Prophylaxis with a respiratory syncytial virus (RSV) anti-G protein monoclonal antibody shifts the adaptive immune response to RSV rA2-line19F infection from Th2 to Th1 in BALB/c mice. *J Virol* 88, 10569-10583.

Bulet, P., Stocklin, R., 2005. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein and peptide letters* 12, 3-11.

Bulet, P., Stocklin, R., Menin, L., 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 198, 169-184.

Burke, E., Dupuy, L., Wall, C., Barik, S., 1998. Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus. *Virology* 252, 137-148.

Burke, E., Mahoney, N.M., Almo, S.C., Barik, S., 2000. Profilin is required for optimal actin-dependent transcription of respiratory syncytial virus genome RNA. *J Virol* 74, 669-675.

Cane, P.A., 2001. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* 11, 103-116.

Cannon, M.J., Stott, E.J., Taylor, G., Askonas, B.A., 1987. Clearance of persistent respiratory syncytial virus infections in immunodeficient mice following transfer of primed T cells. *Immunology* 62, 133-138.

Carbonell-Estrany, X., et al., 2010. Motavizumab for prophylaxis of respiratory syncytial virus in high-risk children: a noninferiority trial. *Pediatrics* 125, e35-51.

Castro, M.S., Fontes, W., 2005. Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein and peptide letters* 12, 13-18.

Chanock, R., Finberg, L., 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg* 66, 291-300.

Chen, W., Liu, Z., Zhang, Q., Yan, Q., Jing, S., 2018. Induction and antiviral activity of human β -defensin 3 in intestinal cells with picornavirus infection. *Acta virologica* 62, 287-293.

Chi, X.-J., Wang, X.-J., Wang, C.-Y., Cui, X.-J., Wang, X.-J., 2014. In vitro and in vivo broad antiviral activity of peptides homologous to fusion glycoproteins of Newcastle disease virus and Marek's disease virus. *Journal of virological methods* 199, 11-16.

Chiang, C.L., Chiang, W., Chang, M.Y., Ng, T.L., Lin, C.C., 2002. Antiviral activity of Plant ago major extracts and related compounds in vitro. *Antiviral Res.* 55, 53-62.

Collins, P.L., Graham, B.S., 2007. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Virol*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Collins, P.L., James, E., Crowe, J.E., 2007. Respiratory Syncytial Virus, in: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*. , Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia pp. 1601-1646.

Collins, P.L., Melero, J.A., 2011. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Res* 162, 80-99.

Conibear, A.C., Craik, D.J., 2014. The chemistry and biology of theta defensins. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 53, 10612-10623.

Cosa, P., Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D., Maes, L., 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept. *Journal of Ethnopharmacology* 106, 290-302.

Cowton, V.M., McGivern, D.R., Fearn, R., 2006. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *J Gen Virol* 87, 1805-1821.

Cubana, N., 2004. NC TS-368: 2004 Guía para la validación de métodos de ensayo químicos para alimentos. Oficina Nacional de Normalización. República de Cuba.

Currie, S.M., et al., 2013. The human cathelicidin LL-37 has antiviral activity against respiratory syncytial virus. *PloS one* 8, e73659.

Currie, S.M., et al., 2016. Cathelicidins Have Direct Antiviral Activity against Respiratory Syncytial Virus In Vitro and Protective Function In Vivo in Mice and Humans. *J Immunol* 196, 2699-2710.

Currier, M.G., et al., 2016. EGFR Interacts with the Fusion Protein of Respiratory Syncytial Virus Strain 2-20 and Mediates Infection and Mucin Expression. *PLoS Pathog* 12, e1005622.

Daher, K.A., Selsted, M.E., Lehrer, R.I., 1986. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol* 60, 1068-1074.

Dathe, M., Wieprecht, T., 1999. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta* 1462, 71-87.

Dawson-Caswell, M., Muncie, H.L., Jr., 2011. Respiratory syncytial virus infection in children. *Am Fam Physician* 83, 141-146.

del Barrio G, P.F., 2000. Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. *J Ethnopharmacol* 72, 317.

Demirkhanyan, L.H., et al., 2012. Multifaceted mechanisms of HIV-1 entry inhibition by human alpha-defensin. *J Biol Chem* 287, 28821-28838.

Depla, E., 2014. Ablynx: Development of ALX-0171, an inhaled Nanobody® for the treatment of respiratory syncytial virus infection in infants.

Depla, E., 2015. Ablynx: ALX-0171: safety, efficacy and therapeutic potential of an inhaled anti-RSV Nanobody. .

Detalle, L., et al., 2016. Generation and characterization of ALX-0171, a potent novel therapeutic nanobody for the treatment of respiratory syncytial virus infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 60, 6-13.

Deval, J., et al., 2015. Molecular Basis for the Selective Inhibition of Respiratory Syncytial Virus RNA Polymerase by 2'-Fluoro-4'-Chloromethyl-Cytidine Triphosphate. *PLoS Pathog* 11, e1004995.

DeVincenzo, J., et al., 2008. Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). *Antiviral Res* 77, 225-231.

DeVincenzo, J., et al., 2010. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 8800-8805.

DeVincenzo, J.P., et al., 2015. Activity of Oral ALS-008176 in a Respiratory Syncytial Virus Challenge Study. *N Engl J Med* 373, 2048-2058.

Diamond, G., Kaiser, V., Rhodes, J., Russell, J.P., Bevins, C.L., 2000. Transcriptional regulation of beta-defensin gene expression in tracheal epithelial cells. *Infect Immun* 68, 113-119.

Díaz, A., Patricia, V., Avendaño, C., Fidel, L., 2017. El virus respiratorio sincicial: patógeno de niños... y de grandes. *Revista chilena de enfermedades respiratorias* 33, 293-302.

Dickens, L.E., Collins, P.L., Wertz, G.W., 1984. Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus. *J Virol* 52, 364-369.

Diseases, C.o.I., 2014. Updated guidance for palivizumab prophylaxis among infants and young children at increased risk of hospitalization for respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics* 134, e620-e638.

Doss, M., et al., 2012. Hapivirins and diprovirins: novel theta-defensin analogs with potent activity against influenza A virus. *J Immunol* 188, 2759-2768.

Doss, M., et al., 2009. Interactions of alpha-, beta-, and theta-defensins with influenza A virus and surfactant protein D. *J Immunol* 182, 7878-7887.

Douglas, J.L., et al., 2003. Inhibition of Respiratory Syncytial Virus Fusion by the Small Molecule VP-14637 via Specific Interactions with F Protein. *J Virol* 77, 5054-5064.

Drysdale, S.B., Green, C.A., Sande, C.J., 2016. Best practice in the prevention and management of paediatric respiratory syncytial virus infection. *Therapeutic advances in infectious disease* 3, 63-71.

ElSawy, K.M., Twarock, R., Verma, C.S., Caves, L.S., 2012. Peptide inhibitors of viral assembly: a novel route to broad-spectrum antivirals. *Journal of chemical information and modeling* 52, 770-776.

Englund, J.A., Chu, H.Y., 2017. Vaccines Against Respiratory Syncytial Virus: The Time Has Come. *J Infect Dis* 215, 4-7.

Evans, C., Yanney, M., 2015. Diagnosis and management of bronchiolitis. *British Journal of Family Medicine* 3, 6.

Falsey, A.R., Hennessey, P.A., Formica, M.A., Cox, C., Walsh, E.E., 2005. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med* 352, 1749-1759.

Falsey, A.R., Koval, C., DeVincenzo, J.P., Walsh, E.E., 2017. Compassionate use experience with high-titer respiratory syncytial virus (RSV) immunoglobulin in RSV-infected immunocompromised persons. *Transpl Infect Dis*.

Farrag, M.A., Almajhdi, F.N., 2016. Human respiratory syncytial virus: role of innate immunity in clearance and disease progression. *Viral immunology* 29, 11-26.

Fearn, R., Collins, P.L., 1999. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol* 73, 5852-5864.

Feltes, T.F., et al., 2003. Palivizumab prophylaxis reduces hospitalization due to respiratory syncytial virus in young children with hemodynamically significant congenital heart disease. *J Pediatr* 143, 532-540.

Fernández, G.d.B.A.Á.L.Á.R.S.M.V.G.F.P., 2008. Metodología de pesquisa preclínica de actividad anti-herpesvirus a partir de productos naturales *Revista Cubana de Farmacia* 42.

French, C.E., et al., 2016. Risk of nosocomial respiratory syncytial virus infection and effectiveness of control measures to prevent transmission events: a systematic review. *Influenza and other respiratory viruses* 10, 268-290.

Fujisawa, T., et al., 2011. NF- κ B mediates IL-1 β -and IL-17A-induced MUC5B expression in airway epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 45, 246-252.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Gadomski, A.M., Scribani, M.B., 2014. Bronchodilators for bronchiolitis. *Cochrane Database Syst Rev*, Cd001266.

Gallo, S.A., et al., 2006. Theta-defensins prevent HIV-1 Env-mediated fusion by binding gp41 and blocking 6-helix bundle formation. *J Biol Chem* 281, 18787-18792.

Ganz, T., 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 3, 710-720.

Ganz, T., et al., 1985. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 76, 1427-1435.

Goldman, M.J., et al., 1997. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 88, 553-560.

Gong, T., et al., 2010. Recombinant mouse beta-defensin 2 inhibits infection by influenza A virus by blocking its entry. *Arch Virol* 155, 491-498.

González-Reyes, L., et al., 2001. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 9859-9864.

Gonzalez, P.A., Bueno, S.M., Carreno, L.J., Riedel, C.A., Kalergis, A.M., 2012. Respiratory syncytial virus infection and immunity. *Rev Med Virol*.

Graham, B.S., 2016. Vaccines against respiratory syncytial virus: The time has finally come. *Vaccine*.

Graham, B.S., Bunton, L.A., Wright, P.F., Karzon, D.T., 1991. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *J Clin Invest* 88, 1026-1033.

Green, C.A., et al., 2015. Safety and immunogenicity of novel respiratory syncytial virus (RSV) vaccines based on the RSV viral proteins F, N and M2-1 encoded by simian adenovirus (PanAd3-RSV) and MVA (MVA-RSV); protocol for an open-label,

dose-escalation, single-centre, phase 1 clinical trial in healthy adults. *BMJ open* 5, e008748.

Griffin, M.P., et al., 2017. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of MEDI8897, the Respiratory Syncytial Virus Prefusion F-Targeting Monoclonal Antibody with an Extended Half-Life, in Healthy Adults. *Antimicrob Agents Chemother* 61.

Groot, F., et al., 2006. Histatin 5-derived peptide with improved fungicidal properties enhances human immunodeficiency virus type 1 replication by promoting viral entry. *J Virol* 80, 9236-9243.

Group, I.-R.S., 1998. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Pediatrics* 102, 531-537.

Guan, X.R., et al., 2010. Respiratory syncytial virus infection and risk of acute myocardial infarction. *Am J Med Sci* 340, 356-359.

Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S.O., Terán, L.M., 2010. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical immunology* 135, 1-11.

Guideline, I.H.T., 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), International conference on harmonization, Geneva, Switzerland, pp. 11-12.

Gwyer Findlay, E., Currie, S.M., Davidson, D.J., 2013. Cationic Host Defence Peptides: Potential as Antiviral Therapeutics. *BioDrugs*.

Halasa, N., et al., 2015. Natural history and epidemiology of respiratory syncytial virus infection in the Middle East: Hospital surveillance for children under age two in Jordan. *Vaccine*.

Halfhide, C., Smyth, R.L., 2008. Innate immune response and bronchiolitis and preschool recurrent wheeze. *Paediatr Respir Rev* 9, 251-262.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Hall, C.B., 2001. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 344, 1917-1928.

Hall, C.B., Douglas, R.G., Jr., 1981. Modes of transmission of respiratory syncytial virus. *J Pediatr* 99, 100-103.

Hall, C.B., Long, C.E., Schnabel, K.C., 2001. Respiratory syncytial virus infections in previously healthy working adults. *Clin Infect Dis* 33, 792-796.

Hall, C.B., et al., 1990. Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *J Infect Dis* 162, 1283-1290.

Hall, C.B., et al., 2009. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med* 360, 588-598.

Harcourt, J.L., et al., 2016. Human cathelicidin, LL-37, inhibits respiratory syncytial virus infection in polarized airway epithelial cells. *BMC Res Notes* 9, 11.

Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schroder, J.M., 1997. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387, 861.

Hardy, R.W., Harmon, S.B., Wertz, G.W., 1999. Diverse gene junctions of respiratory syncytial virus modulate the efficiency of transcription termination and respond differently to M2-mediated antitermination. *J Virol* 73, 170-176.

Hazrati, E., et al., 2007. Human α - and β -Defensins Block Multiple Steps in Herpes Simplex Virus Infection.

Hazrati, E., et al., 2006. Human α - and β -defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection. *J Immunol* 177, 8658-8666.

Heminway, B.R., et al., 1994. Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion. *Virology* 200, 801-805.

Hendrickson, M., et al., 1998. Congenital thymic cysts in children--mostly misdiagnosed. *J Pediatr Surg* 33, 821-825.

Hirano, E., et al., 2014. Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (G) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1. *Infect Genet Evol* 28C, 183-191.

Holgate, S.T., et al., 2015. Asthma. *Nature reviews. Disease primers* 1, 15025.

Holguera, J., Villar, E., Munoz-Barroso, I., 2014. Identification of cellular proteins that interact with Newcastle Disease Virus and human Respiratory Syncytial Virus by a two-dimensional virus overlay protein binding assay (VOPBA). *Virus Res* 191, 138-142.

Hoover, D.M., Chertov, O., Lubkowski, J., 2001. The structure of human beta-defensin-1: new insights into structural properties of beta-defensins. *J Biol Chem* 276, 39021-39026.

Hoover, D.M., Wu, Z., Tucker, K., Lu, W., Lubkowski, J., 2003. Antimicrobial characterization of human beta-defensin 3 derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2804-2809.

Howell, M.D., Streib, J.E., Leung, D.Y., 2007. Antiviral activity of human beta-defensin 3 against vaccinia virus. *J Allergy Clin Immunol* 119, 1022-1025.

Hu, J., Hsiung, G.D., 1989. Evaluation of new antiviral agents: in vitro perspectives. *Antiviral Res* 11, 217-232.

Irwin, K.K., Renzette, N., Kowalik, T.F., Jensen, J.D., 2016. Antiviral drug resistance as an adaptive process. *Virus evolution* 2.

Iwane, M.K., Farnon, E.C., Gerber, S.I., 2013. Importance of global surveillance for respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 208 Suppl 3, S165-166.

Jiang, Y., et al., 2012. Antiviral activity of recombinant mouse beta-defensin 3 against influenza A virus in vitro and in vivo. *Antivir Chem Chemother* 22, 255-262.

Jin, H., et al., 2003. Evaluation of recombinant respiratory syncytial virus gene deletion mutants in African green monkeys for their potential as live attenuated vaccine candidates. *Vaccine* 21, 3647-3652.

Jin, H., et al., 2000. Recombinant respiratory syncytial viruses with deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 genes are attenuated in vitro and in vivo. *Virology* 273, 210-218.

John, A.M., et al., 2019. In vitro analysis of synthetic peptides in blocking the entry of dengue virus. *Virus research* 260, 142-150.

Johnson, S.M., et al., 2015. Respiratory Syncytial Virus Uses CX3CR1 as a Receptor on Primary Human Airway Epithelial Cultures. *PLoS Pathog* 11, e1005318.

Johnstone, J., Majumdar, S.R., Fox, J.D., Marrie, T.J., 2008. Viral infection in adults hospitalized with community-acquired pneumonia: prevalence, pathogens, and presentation. *Chest* 134, 1141-1148.

Kapikian, A.Z., Mitchell, R.H., Chanock, R.M., Shvedoff, R.A., Stewart, C.E., 1969. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am J Epidemiol* 89, 405-421.

Klotman, M.E., Chang, T.L., 2006. Defensins in innate antiviral immunity. *Nature reviews. Immunology* 6, 447-456.

Kota, S., et al., 2008. Role of human beta-defensin-2 during tumor necrosis factor-alpha/NF-kappaB-mediated innate antiviral response against human respiratory syncytial virus. *J Biol Chem* 283, 22417-22429.

Krusat, T., Streckert, H.J., 1997. Heparin-dependent attachment of respiratory syncytial virus (RSV) to host cells. *Arch Virol* 142, 1247-1254.

Kuo, L., Fearn, R., Collins, P.L., 1996. The structurally diverse intergenic regions of respiratory syncytial virus do not modulate sequential transcription by a dicistronic minigenome. *J Virol* 70, 6143-6150.

Kuo, L., Fearn, R., Collins, P.L., 1997. Analysis of the gene start and gene end signals of human respiratory syncytial virus: quasi-templated initiation at position 1 of the encoded mRNA. *J Virol* 71, 4944-4953.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Kurt-Jones, E.A., et al., 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1, 398-401.

Kwakkenbos, M.J., et al., 2010. Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. *Nat Med* 16, 123-128.

Lagos, R., et al., 2009. Safety and antiviral activity of motavizumab, a respiratory syncytial virus (RSV)-specific humanized monoclonal antibody, when administered to RSV-infected children. *Pediatr Infect Dis J* 28, 835-837.

Lee, N., et al., 2013. High Morbidity and Mortality in Adults Hospitalized for Respiratory Syncytial Virus Infections. *Clin Infect Dis*.

Lehrer, R.I., 2007. Multispecific myeloid defensins. *Current opinion in hematology* 14, 16-21.

Lehrer, R.I., Lu, W., 2012. alpha-Defensins in human innate immunity. *Immunol Rev* 245, 84-112.

Lessler, J., et al., 2009. Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 9, 291-300.

Lo, M.S., Brazas, R.M., Holtzman, M.J., 2005. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness. *Journal of virology* 79, 9315-9319.

Lopez, J.A., Villanueva, N., Melero, J.A., Portela, A., 1988. Nucleotide sequence of the fusion and phosphoprotein genes of human respiratory syncytial (RS) virus Long strain: evidence of subtype genetic heterogeneity. *Virus Res* 10, 249-261.

Lozano, R., et al., 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380, 2095-2128.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Lukacs, N.W., et al., 2006. Differential immune responses and pulmonary pathophysiology are induced by two different strains of respiratory syncytial virus. *Am J Pathol* 169, 977-986.

Malhotra, R., et al., 2003. Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells. *Microbes Infect* 5, 123-133.

Marchant, D., et al., 2010. Toll-like receptor 4-mediated activation of p38 mitogen-activated protein kinase is a determinant of respiratory virus entry and tropism. *J Virol* 84, 11359-11373.

Masante, C., et al., 2014. The human metapneumovirus small hydrophobic protein has properties consistent with those of a viroporin and can modulate viral fusogenic activity. *Journal of virology* 88, 6423-6433.

Mattar, E.H., Almehdar, H.A., Uversky, V.N., Redwan, E.M., 2016. Virucidal activity of human alpha- and beta-defensins against hepatitis C virus genotype 4. *Mol Biosyst* 12, 2785-2797.

Mazumder, B., Barik, S., 1994. Requirement of casein kinase II-mediated phosphorylation for the transcriptional activity of human respiratory syncytial viral phosphoprotein P: transdominant negative phenotype of phosphorylation-defective P mutants. *Virology* 205, 104-111.

Mazur, N.I., et al., 2015. Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus: current management and new therapeutics. *The lancet. Respiratory medicine*.

Mettenleiter, T.C., 2002. Brief overview on cellular virus receptors. *Virus Res* 82, 3-8.

Midulla, F., et al., 2010. Respiratory syncytial virus, human bocavirus and rhinovirus bronchiolitis in infants. *Arch Dis Child* 95, 35-41.

Mikloska, Z., Cunningham, A.L., 2001. Alpha and gamma interferons inhibit herpes simplex virus type 1 infection and spread in epidermal cells after axonal transmission. *Journal of virology* 75, 11821-11826.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Milner, M.E., de la Monte, S.M., Hutchins, G.M., 1985. Fatal respiratory syncytial virus infection in severe combined immunodeficiency syndrome. *Am J Dis Child* 139, 1111-1114.

Mink, M.A., Stec, D.S., Collins, P.L., 1991. Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* 185, 615-624.

MINSAP, 2013. PROGRAMA INTEGRAL DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS. Ministerio de Salud Pública, Cuba.

MINSAP, 2018. Anuario estadístico de Salud en Cuba.

Montero-Alejo, V., et al., 2012. Defensin like peptide from *Panulirus argus* relates structurally with beta defensin from vertebrates. *Fish & shellfish immunology* 33, 872-879.

Montero-Alejo, V., et al., 2017. Panusin represents a new family of beta-defensin-like peptides in invertebrates. *Dev Comp Immunol* 67, 310-321.

Moore, A.E., Sabachewsky, L., Toolan, H.W., 1955. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer research* 15, 598-602.

Morales, M.Á.G., Gutiérrez, A.E., Olvera, D.P.R., Gutiérrez, C.C., 2015. Effect of Human Beta Defensin-2 in Epithelial Cell Lines Infected with Respiratory Viruses. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine* 7, 136.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.

Mukherjee, S., et al., 2011. IL-17-induced pulmonary pathogenesis during respiratory viral infection and exacerbation of allergic disease. *Am J Pathol* 179, 248-258.

Mullard, A., 2015. 2014 FDA drug approvals. Nature Publishing Group.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Munk, C., et al., 2003. The theta-defensin, retrocyclin, inhibits HIV-1 entry. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19, 875-881.

Nair, H., et al., 2010. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 375, 1545-1555.

Neuzil, K.M., 2016. Progress toward a respiratory syncytial virus vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 23, 186-188.

Newman SL, G.L., Gabay JE, and SeIsted ME, 2000. Identification of Constituents of Human Neutrophil Azurophil Granules that Mediate Fungistasis against *Histoplasma capsulatum*. *Infection and immunity* 68, 5668-5672.

Norrby, E., Marusyk, H., Örvell, C., 1970b. Morphogenesis of respiratory syncytial virus in a green monkey kidney cell line (Vero). *Journal of virology* 6, 237-242.

O'Brien, K.L., et al., 2015. Efficacy of motavizumab for the prevention of respiratory syncytial virus disease in healthy Native American infants: a phase 3 randomised double-blind placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis.*

O'Donnell, D.R., McGarvey, M.J., Tully, J.M., Balfour-Lynn, I.M., Openshaw, P.J., 1998. Respiratory syncytial virus RNA in cells from the peripheral blood during acute infection. *J Pediatr* 133, 272-274.

O'Shea, T.M., Sevick, M.A., Givner, L.B., 1998. Costs and benefits of respiratory syncytial virus immunoglobulin to prevent hospitalization for lower respiratory tract illness in very low birth weight infants. *Pediatr Infect Dis J* 17, 587-593.

Oertel, M.D., 1996. RespiGam: an RSV immune globulin. *Pediatr Nurs* 22, 525-528.

Okiro, E.A., et al., 2008. Factors associated with increased risk of progression to respiratory syncytial virus-associated pneumonia in young Kenyan children. *Trop Med Int Health* 13, 914-926.

Olvera, D.P.R., Gutiérrez, C.C., 2018. Multifunctional Activity of the β -Defensin-2 during Respiratory Infections, Immune Response Activation. IntechOpen.

Organization, W.H., 2019. Typhoid vaccines: WHO position paper, March 2018–Recommendations. *Vaccine* 37, 214-216.

Otero-González, A.J., et al., 2010. Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. *The FASEB journal* 24, 1320-1334.

Otieno, J.R., et al., 2016. Molecular Evolutionary Dynamics of Respiratory Syncytial Virus Group A in Recurrent Epidemics in Coastal Kenya. *J Virol* 90, 4990-5002.

Palivizumab, a.H.R.S.V.M.A., Reduces Hospitalization From Respiratory Syncytial Virus Infection in High-risk Infants, 1998. *Pediatrics* 102, 531-537.

Parikh, R.C., et al., 2017. Chronologic age at hospitalization for respiratory syncytial virus among preterm and term infants in the United States. *Infectious diseases and therapy* 6, 477-486.

Pisuttharachai, D., et al., 2009a. Characterization of crustin antimicrobial proteins from Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Dev Comp Immunol* 33, 1049-1054.

Pisuttharachai, D., et al., 2009b. Expressed sequence tag analysis of phyllosomas and hemocytes of Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Fisheries Science* 75, 195.

Pisuttharachai, D., et al., 2009c. Characterization of two isoforms of Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* defensin cDNA. *Dev Comp Immunol* 33, 434-438.

Q5A, I., 1999. Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin.

Quinones-Mateu, M.E., et al., 2003. Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. *Aids* 17, F39-48.

Ralston, S.L., et al., 2014a. Clinical practice guideline: the diagnosis, management, and prevention of bronchiolitis. *Pediatrics* 134, e1474-e1502.

Ricci, V., Nunes, V.D., Murphy, M.S., Cunningham, S., 2015. Bronchiolitis in children: summary of NICE guidance. *BMJ: British Medical Journal* 350, h2305.

Rima, B., et al., 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae. *J Gen Virol* 98, 2912-2913.

Robbie, G.J., et al., 2013. A novel investigational Fc-modified humanized monoclonal antibody, motavizumab-YTE, has an extended half-life in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 6147-6153.

Roberts, S.R., Lichtenstein, D., Ball, L.A., Wertz, G.W., 1994. The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *J Virol* 68, 4538-4546.

Rodriguez de la Vega, R.C., Possani, L.D., 2005. On the evolution of invertebrate defensins. *Trends in genetics : TIG* 21, 330-332.

Roymans, D., Alnajjar, S.S., Battles, M.B., 2017. Therapeutic efficacy of a respiratory syncytial virus fusion inhibitor. 8, 167.

Ryan, L.K., et al., 2011. Modulation of human beta-defensin-1 (hBD-1) in plasmacytoid dendritic cells (PDC), monocytes, and epithelial cells by influenza virus, Herpes simplex virus, and Sendai virus and its possible role in innate immunity. *J Leukoc Biol* 90, 343-356.

Sala, A., et al., 2018. Antiviral Activity of Synthetic Peptides Derived from Physiological Proteins. *Intervirology* 61, 166-173.

Samuel, D., et al., 2015. GS-5806 Inhibits Pre- to Postfusion Conformational Changes of the Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 7109-7112.

Sánchez, M.L., 2016. Mecanismos de acción de péptidos antimicrobianos y mecanismos de resistencia de los patógenos.

Savón, C., et al., 2000. Detection of Respiratory Syncytial Virus in Nasopharyngeal Secretions by 24-Well Plate Precentrifugation Assay Using a Monoclonal Antibody Against F Protein. *Archives of Medical Research* 31, 93-96.

Scheltema, N.M., et al., 2017. Global respiratory syncytial virus-associated mortality in young children (RSV GOLD): a retrospective case series. *The Lancet. Global health* 5, e984-e991.

Scudiero, O., et al., 2010. Novel synthetic, salt-resistant analogs of human beta-defensins 1 and 3 endowed with enhanced antimicrobial activity. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 2312-2322.

Selsted, M.E., Ouellette, A.J., 2005. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* 6, 551-557.

Semple, F., et al., 2011. Human β -defensin 3 affects the activity of pro-inflammatory pathways associated with MyD88 and TRIF. *European journal of immunology* 41, 3291-3300.

Shafee, T.M., Lay, F.T., 2017. Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. *74*, 663-682.

Shafee, T.M., Lay, F.T., Hulett, M.D., Anderson, M.A., 2016. The Defensins Consist of Two Independent, Convergent Protein Superfamilies. *Molecular biology and evolution* 33, 2345-2356.

Shahriari, S., Gordon, J., Ghildyal, R., 2016. Host cytoskeleton in respiratory syncytial virus assembly and budding. *Virology journal* 13, 161.

Shartouny, J.R., Jacob, J., 2019. Mining the tree of life: Host defense peptides as antiviral therapeutics, *Seminars in cell & developmental biology*. Elsevier, pp. 147-155.

Shay, D.K., Holman, R.C., Roosevelt, G.E., Clarke, M.J., Anderson, L.J., 2001. Bronchiolitis-associated mortality and estimates of respiratory syncytial virus-associated deaths among US children, 1979-1997. *J Infect Dis* 183, 16-22.

Shi, T., et al., 2017. Respiratory Syncytial virus infection compromises asthma tolerance by recruiting interleukin-17A-producing cells via CCR6-CCL20 signaling. *Mol Immunol* 88, 45-57.

Sidwell, R.W., et al., 1972. Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* 177, 705-706.

Sierra, J.M., Fuste, E., Rabanal, F., Vinuesa, T., Vinas, M., 2017. An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development. *Expert Opin Biol Ther* 17, 663-676.

Sitaram, N., Nagaraj, R., 1999. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochim Biophys Acta* 1462, 29-54.

Sivapalasingam, S., et al., 2015. Phase 1 study evaluating safety, tolerability, pharmacokinetics and immunogenicity of REGN2222 in healthy adults: a new human monoclonal RSV-F antibody for RSV prevention, Open forum infectious diseases. *Infectious Diseases Society of America*, p. 912.

Spann, K.M., Tran, K.C., Collins, P.L., 2005. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF- κ B, and proinflammatory cytokines. *Journal of virology* 79, 5353-5362.

Spearman, C., Kaerber, G., Bibrack, B., Whittmann, G., 1974. *Virologische Arbeitsmethoden*. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart, Germany.

Spillmann, D., 2001. Heparan sulfate: anchor for viral intruders? *Biochimie* 83, 811-817.

Sullender, W.M., Mufson, M.A., Anderson, L.J., Wertz, G.W., 1991. Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. *J Virol* 65, 5425-5434.

Sun, L., et al., 2005a. Human beta-defensins suppress human immunodeficiency virus infection: potential role in mucosal protection. *J Virol* 79, 14318-14329.

Sun, X., Whittaker, G.R., 2003. Role for influenza virus envelope cholesterol in virus entry and infection. *Journal of virology* 77, 12543-12551.

Tamamura, H., et al., 1996. Analysis of the interaction of an anti-HIV peptide, T22 ([Tyr5, 12, Lys7]-polyphemusin II), with gp120 and CD4 by surface plasmon resonance. *Biochim Biophys Acta* 1298, 37-44.

Tang, J.W., Loh, T.P., 2014. Correlations between climate factors and incidence--a contributor to RSV seasonality. *Rev Med Virol* 24, 15-34.

Taylor, K., Barran, P.E., Dorin, J.R., 2008. Structure-activity relationships in beta-defensin peptides. *Biopolymers* 90, 1-7.

Tayyari, F., et al., 2011. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nat Med*.

Teclé, T., White, M.R., Gantz, D., Crouch, E.C., Hartshorn, K.L., 2007. Human neutrophil defensins increase neutrophil uptake of influenza A virus and bacteria and modify virus-induced respiratory burst responses. *J Immunol* 178, 8046-8052.

Teng, M.N., et al., 2000. Recombinant respiratory syncytial virus that does not express the NS1 or M2-2 protein is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees. *J Virol* 74, 9317-9321.

Thompson, W.W., et al., 2004. Influenza-associated hospitalizations in the United States. *Jama* 292, 1333-1340.

Thompson, W.W., et al., 2003. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *Jama* 289, 179-186.

Tripp, R.A., et al., 2001. CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat Immunol* 2, 732-738.

Valdes, O., et al., 2005. Caracterización genética molecular del virus Sincitial respiratorio humano en Cuba. *Biotecnología Aplicada*. 22.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Valore, E.V., et al., 1998. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 101, 1633-1642.
- Varga, S.M., Braciale, T.J., 2013. The adaptive immune response to respiratory syncytial virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 372, 155-171.
- Villanueva, N., Navarro, J., Mendez, E., Garcia-Albert, I., 1994. Identification of a protein kinase involved in the phosphorylation of the C-terminal region of human respiratory syncytial virus P protein. *J Gen Virol* 75 (Pt 3), 555-565.
- Volling, C., et al., 2014. Respiratory syncytial virus infection-associated hospitalization in adults: a retrospective cohort study. *BMC Infect Dis* 14, 665.
- Walsh, E., Hruska, J., 1983. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. *Journal of Virology* 47, 171-177.
- Walsh, E.E., 2017. Respiratory Syncytial Virus Infection: An Illness for All Ages. *Clin Chest Med* 38, 29-36.
- Wang, G., 2010. Structural studies of antimicrobial peptides provide insight into their mechanisms of action. *Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies*, 141-168.
- Wang, G., 2015. Improved Methods for Classification, Prediction, and Design of Antimicrobial Peptides, in: Zhou, P., Huang, J. (Eds.), *Computational Peptidology*. Springer New York, New York, NY, pp. 43-66.
- Wang, G., et al., 2015. Discovery of 4'-Chloromethyl-2'-deoxy-3',5'-di-O-isobutyryl-2'-fluorocytidine (ALS-8176), A First-in-Class RSV Polymerase Inhibitor for Treatment of Human Respiratory Syncytial Virus Infection. *J Med Chem* 58, 1862-1878.
- Wang, Z., Mu, L., Tao, Y., Yuan, L., 2001. [A study on the relationship between respiratory tract viruses antigen in peripheral blood mononuclear cells and their antibody from children with steroid-sensitive and simple nephrotic syndrome]. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 32, 559-561.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Weber, M.W., Mulholland, E.K., Greenwood, B.M., 1998. Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. *Trop Med Int Health* 3, 268-280.

Wilson, S.S., Wiens, M.E., Smith, J.G., 2013. Antiviral mechanisms of human defensins. *J Mol Biol*.

Wohlford-Lenane, C.L., et al., 2009. Rhesus theta-defensin prevents death in a mouse model of severe acute respiratory syndrome coronavirus pulmonary disease. *J Virol* 83, 11385-11390.

Wu, A., et al., 2015. Incidence and Risk Factors for Respiratory Syncytial Virus and Human Metapneumovirus Infections among Children in the Remote Highlands of Peru. *PLoS One* 10, e0130233.

Wu, H., et al., 2007. Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. *J Mol Biol* 368, 652-665.

Xing, Y., Proesmans, M., 2019a. New therapies for acute RSV infections: where are we? *European journal of pediatrics* 178, 131-138.

Yang, D., Biragyn, A., Hoover, D.M., Lubkowski, J., Oppenheim, J.J., 2004. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annual review of immunology* 22, 181-215.

Yasin, B., et al., 2004. Theta defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry. *J Virol* 78, 5147-5156.

Yasumura, Y., 1962. The Vero cell line was initiated from the kidney of a normal adult African green monkey on March 27, 1962 by Y. Yasumura and Y. Kawakita at the Chiba University in Chiba, Japan.

Yount, N.Y., Yeaman, M.R., 2004. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7363-7368.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Yu, X.Q., et al., 2017. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of MEDI4893, an Investigational, Extended-Half-Life, Anti-Staphylococcus aureus Alpha-Toxin Human Monoclonal Antibody, in Healthy Adults. *Antimicrob Agents Chemother* 61.

Yui, I., Hoshi, A., Shigeta, Y., Takami, T., Nakayama, T., 2003. Detection of human respiratory syncytial virus sequences in peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* 70, 481-489.

Zeng, R., Cui, Y., Hai, Y., Liu, Y., 2012. Pattern recognition receptors for respiratory syncytial virus infection and design of vaccines. *Virus Res* 167, 138-145.

Zeng, R., Li, C., Li, N., Wei, L., Cui, Y., 2011. The role of cytokines and chemokines in severe respiratory syncytial virus infection and subsequent asthma. *Cytokine* 53, 1-7.

Zhang, G., Zhou, K.F., Lu, Z.H., 2016. Interleukin-17 enhances the removal of respiratory syncytial virus in mice by promoting neutrophil migration and reducing interferon-gamma expression. *Genet Mol Res* 15.

Zhou, H., et al., 2012. Hospitalizations associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States, 1993-2008. *Clin Infect Dis* 54, 1427-1436.

Zhu, S., Gao, B., 2013. Evolutionary origin of beta-defensins. *Dev Comp Immunol* 39, 79-84.