



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**BÚSQUEDA DE MARCADORES GENÉTICOS DEL VIRUS  
SINCICIAL RESPIRATORIO RELACIONADOS CON LA  
INFECCIÓN PERSISTENTE EN PACIENTES CON  
ENFERMEDAD RESPIRATORIA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**EBER DONALDO MARTÍNEZ ALVARADO**



**CDMX**

**2023**

**TRABAJO PARA SER REVISADO  
POR EL H. JURADO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: ALICIA BEATRIZ CERVANTES PEREDO

**VOCAL:** Profesor: ROCIO GABRIELA TIRADO MENDOZA

**SECRETARIO:** Profesor: EVELYN RIVERA TOLEDO

**1er. SUPLENTE:** Profesor: MANUEL GUTIERREZ AGUILAR

**2° SUPLENTE:** Profesor: AURORA LARA NUÑEZ

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO DE INMUNOMODULACIÓN Y AGENTES PATÓGENOS, DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**ASESOR DEL TEMA:**

  
\_\_\_\_\_  
DRA. EVELYN RIVERA TOLEDO

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

  
\_\_\_\_\_  
DR. JOEL ARMANDO VÁZQUEZ PÉREZ

**SUSTENTANTE:**

  
\_\_\_\_\_  
EBER DONALDO MARTÍNEZ ALVARADO

# Agradecimientos

A mi asesora la Dra. Evelyn Rivera por su asesoría y apoyo durante el desarrollo del proyecto

A mi supervisor técnico el Dr. Joel Vázquez por su asesoría, la donación de las muestras y el apoyo en la secuenciación

Al Dr. Carlos Santiago y al M. en C. Fidencio Mejía por su colaboración para la extracción de ácidos nucleicos

Al M. en C. Alberto Antony Venancio Landeros por el diseño de los oligonucleótidos para realizar la secuenciación del virus sincicial respiratorio

A la Dra. Ana Flisser y a su grupo de investigación por su aportación de infraestructura y por sus comentarios a este trabajo

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), por la beca otorgada a través del proyecto IA205521

## Contenido

Abreviaturas .....	1
Resumen .....	3
I. Introducción.....	6
1.1 Virus Sincicial Respiratorio .....	6
1.1.1 Biología.....	6
1.1.2 Epidemiología.....	8
1.1.3 Clasificación .....	9
1.1.4 Características clínicas .....	10
1.1.5 Patogenia.....	10
1.1.6 Persistencia .....	12
1.1.7 Asociación con asma .....	14
1.1.8 Terapéutica de RSV.....	16
1.1.9 Epidemiología molecular.....	17
1.2 Modelo de persistencia del RSV.....	17
1.3 Mutaciones del RSV persistente.....	17
II. Justificación .....	19
III. Hipótesis .....	21
IV. Objetivos.....	21
4.1 Objetivo general .....	21
4.2 Objetivos específicos .....	21
V. Procedimiento experimental.....	22
5.1 Cultivo de líneas celulares (Macrófagos con infección persistente de RSV) .....	23
5.2 Muestras de pacientes.....	23
5.3 Extracción de RNA.....	26
5.4 Preparación de cDNA .....	26
5.5 Detección y cuantificación del genoma viral por medio de PCR en tiempo real .....	27
5.5.1 Detección del genoma de RSV .....	27
5.5.2 Construcción de una curva estándar para la cuantificación de copias del genoma de RSV.....	28
5.6 Amplificación del genoma de RSV .....	29
5.6.1 Diseño de oligonucleótidos .....	29
5.6.2 Optimización de la reacción de PCR para la amplificación del genoma de RSV ..	30
5.6.3 Diseño de PCR multiplex para amplificación del genoma de RSV .....	32

5.7 Secuenciación de amplicones mediante el sistema MinION Nanopore (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido).....	32
5.7.1 Preparación de amplicones.....	32
5.7.2 Purificación de los productos de PCR .....	32
5.7.3 Cuantificación y dilución.....	32
5.7.4 Etiquetado de los amplicones con “barcodes” (código de barras).....	33
5.7.5 Cuantificación de las bibliotecas obtenidas con fluorómetro “Quantus” (E6150, Promega) .....	34
5.7.6 Adición de los adaptadores.....	35
5.7.7 Secuenciación MinION.....	36
5.7.8 Alineamiento y análisis de secuencias .....	36
5.8 Análisis de expresión de citocinas.....	37
VI. Resultados.....	38
6.1 Cuantificación de copias de RSV en hisopados nasales .....	38
6.1.1 Cuantificación RNA total en hisopados nasales.....	38
6.1.2 Construcción de la curva estándar y cuantificación absoluta de las copias del genoma del RSV por RT-PCR.....	39
6.2 Amplificación del genoma de RSV .....	42
6.2.1 Determinación de la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos.....	42
6.2.2 Evaluación de la especificidad de los oligonucleótidos.....	44
6.2.3 Diseño del PCR múltiplex .....	45
6.3 Secuenciación de RSV .....	47
6.3.1 Amplificación del genoma de RSV.....	47
6.3.2 Mutaciones .....	49
6.4 Identificación y cuantificación de citocinas en muestras clínicas .....	56
VII. Discusión .....	58
VIII. Conclusiones .....	64
IX. Perspectivas .....	65
X. Bibliografía.....	66
Anexo 1. Mutaciones encontradas en el genoma de RSV persistente (Ruíz-Gómez et al., 2021) .....	73
Anexo 2. Constancia informativa de uso de muestras respiratorias .....	74
Anexo 3. Datos del análisis de las muestras .....	75
Anexo 4. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del genoma de RSV.....	76
Anexo 5. Ejemplo de cálculo del número de copias de RSV por cada 100 ng de RNA total	77

# Abreviaturas

RSV	Virus sincicial respiratorio
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> , por sus siglas en inglés
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementario
dsDNA	DNA de doble cadena
RNA	Ácido ribonucleico
ssRNA	RNA de cadena sencilla
GBD	<i>Global Burden of Disease</i> , por sus siglas en inglés
nt	Nucleótido
TLR	Receptores tipo <i>toll</i>
RIG-I	Gen inducible por ácido retinoico 1
NGF	Factor de crecimiento nervioso
TrKA	Receptor de tropomiosina cinasa A
RV	Rinovirus
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ITRI	Infección de tracto respiratorio inferior
SGC	Secuenciación de genoma completo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	PCR de transcripción inversa
qPCR	PCR en tiempo real
RT- qPCR	PCR en tiempo real de transcripción inversa
MΦP	Macrófagos infectados persistentemente
MΦN	Macrófagos no infectados
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> , por sus siglas en inglés
DTT	Ditiotreitol
NTC	Control sin templado
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
FAM	Amidita de fluoresceína

Ct	<i>Cycle threshold</i> (Ciclo umbral en qPCR)
TAE	Tis- acetato- EDTA
SFB	<i>Short fragment buffer</i>
EB	<i>Elution buffer</i>
SA- PE	Estreptavidina, conjugado de R- ficoeritrina
IL6	Interleucina 6
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
IP10	Ligando 10 de quimiocina con motivo C-X-C
IL8	Interleucina 8
ILL12p70	Interleucina 12 (heterodímero activo)
IFN $\beta$	Interferón $\beta$
IL10	Interleucina 10
IL2	Interleucina 2
IL13	Interleucina 13
IL5	Interleucina 5
IL4	Interleucina 4
IFN $\gamma$	Interferón gamma
GS	<i>Gene start</i>
GE	<i>Gene end</i>



# Resumen

La persistencia viral es la capacidad de algunos virus para establecer infecciones por tiempo prolongado en su hospedero. Entre los mecanismos que permiten la persistencia de un virus se encuentran: la selección de células con tiempo de vida media prolongado, la modulación de la infectividad y de la expresión de genes virales, la inhibición de la apoptosis y la evasión del sistema inmunitario.

El virus sincicial respiratorio (RSV) es capaz de mantener infecciones de tipo persistentes (crónicas) en individuos inmunosuprimidos. Aunque la persistencia en personas inmunocompetentes no ha sido demostrada, existen indicios que sugieren la posibilidad del establecimiento de infecciones de este tipo. Por ejemplo, el RSV se ha logrado aislar a partir de muestras respiratorias de niños asintomáticos. Además, se han amplificado secuencias genómicas del RSV a partir de células del estroma de médula ósea, que se considera una región inmunológicamente privilegiada. Esto sugiere la existencia de infecciones de bajo grado en este tipo de tejido.

El asma es un conjunto de enfermedades crónicas que afectan las vías respiratorias y se caracteriza por varios signos, que incluyen la inflamación crónica del tracto respiratorio, producción excesiva de moco e hiperreactividad bronquial. Las infecciones virales en los primeros meses de vida se han asociado con el desarrollo de asma hasta en 40% de los infantes. Un síntoma relacionado con las infecciones virales y el posible desarrollo de asma es la sibilancia bronquial; aunque una gran proporción de niños pequeños la experimentan en algún momento, no siempre es indicativo de dicho padecimiento. Los virus respiratorios más comúnmente relacionados con el desarrollo de sibilancias y el posterior desarrollo de asma son el Rinovirus y el RSV.

La relación entre la infección temprana por el RSV y el desarrollo del asma es un hecho reconocido en el área clínica, aunque los mecanismos siguen en estudio. Se cree que el RSV puede establecer una infección persistente en las vías respiratorias, lo que contribuye a la inflamación crónica a través de la expresión constante de antígenos virales.

El control de variables en los modelos experimentales hace posible distinguir a las infecciones virales agudas de las infecciones persistentes. No obstante, en infecciones

adquiridas en la comunidad es complicado determinar si un virus aislado a partir de un individuo fue adquirido de manera reciente o si se trata de un virus que ha infectado de manera crónica a su hospedero. Una estrategia para abordar este problema contempla la secuenciación del genoma viral en muestras consecutivas del mismo individuo (en estudios longitudinales) y así determinar si hay identidad entre las muestras tempranas y tardías; de ser así, se sugeriría la persistencia, descartando reinfecciones.

Dado que los estudios longitudinales son difíciles de llevar a cabo por la necesidad de la toma seriada de muestras, el contar con una lista de mutaciones acumuladas en un genoma viral que ha infectado por tiempo prolongado a su hospedero sería una herramienta valiosa para su uso como marcador genético asociado a la infección persistente y de esta manera estudiar la relación de este tipo de infecciones con padecimientos respiratorios crónicos.

En nuestro grupo de investigación se ha estudiado la persistencia del RSV en una línea celular de macrófagos que se ha conservado por más de 150 pases. A través de secuenciación masiva se identificaron 74 mutaciones en el genoma del virus persistente relacionadas con alteraciones en el ensamble de los viriones y defectos en la fusión de membranas, lo que se asocia con una capacidad infecciosa del virus baja.

El objetivo de este proyecto se centró en el desarrollo de un protocolo para secuenciar el genoma del RSV que circula en la comunidad y evaluar la utilidad de las 74 mutaciones encontradas en el RSV persistente como marcadores genéticos de la persistencia del virus en humanos. Además, se cuantificaron las citocinas en las muestras para investigar si había alguna relación entre la presencia de las mutaciones y la expresión de estas moléculas.

En este estudio, se utilizaron un total de 36 hisopados nasales de pacientes con infección por RSV proporcionados por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). La cuantificación del genoma del virus se realizó mediante PCR en tiempo real y se seleccionaron aquellas muestras con un valor de Ct menor a 25 para posterior amplificación del genoma mediante PCR en punto final.

La amplificación se llevó a cabo con 15 pares de oligonucleótidos diseñados a partir de cinco secuencias de referencia entre las que se encontraba la secuencia de RSV

persistente. Posteriormente a la amplificación, se realizó la secuenciación por medio del sistema MinION Nanopore de Oxford Nanopore Technologies.

Para el análisis bioinformático, se realizó un alineamiento de la secuencia consenso obtenida con la secuencia del virus persistente y la secuencia de referencia (RSV cepa *Long ATCC VR- 26*). De manera adicional, se realizó la cuantificación de las citocinas IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12, IL13, IP10, TNF $\alpha$ , IFN $\beta$  e IFN $\gamma$ .

Se logró amplificar y secuenciar el genoma del RSV en una única muestra (E199), la cual presentaba 11 mutaciones comunes con el genoma del RSV persistente, ubicadas en los genes M, SH, F y G. Sin embargo, mediante revisión bibliográfica no se encontró que dichas mutaciones estén asociadas con la persistencia del virus, por lo menos modulando su infectividad, aunque se requieren más estudios para descartar esta posibilidad.

Además, la infección por RSV se asoció con la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias, y en el caso específico de la muestra E199, se encontró una sobreexpresión de IL8, que es característica de las infecciones agudas.

A pesar de las dificultades metodológicas que se presentaron durante el desarrollo de este proyecto, se logró establecer un protocolo para cuantificar, amplificar y secuenciar genomas de RSV subtipo A que circulan en comunidad y que persisten en líneas celulares.

# I. Introducción

## 1.1 Virus Sincicial Respiratorio

### 1.1.1 Biología

El virus sincicial respiratorio (RSV) es un virus envuelto, pleomórfico, perteneciente a la familia Pneumoviridae (Bergeron & Tripp, 2021; Ha et al., 2015). Su genoma está compuesto por una cadena sencilla de RNA negativa con un tamaño aproximado de 15.2 Kb (Ha et al., 2015) con 10 genes que corresponden a 11 secuencias codificantes para: proteínas no estructurales (NS1, NS2), Proteína Nucleocápside (N), Proteína Matriz (M), Fosfoproteína (P), Glicoproteína de Unión (G), Glicoproteína de Fusión (F), Proteína Hidrofóbica Pequeña (SH), Proteínas Reguladoras de Transcripción (M2-1, M2-2) y Polimerasa (L) (Zhu et al., 2017). La región 3' terminal del genoma del virus sincicial respiratorio (RSV) es conocida como región "Leader" y tiene una longitud de 44 nucleótidos. Por otro lado, la región 5' terminal se conoce como región "Trailer" y abarca 155 nucleótidos (Cao et al., 2021) (Figura 1).

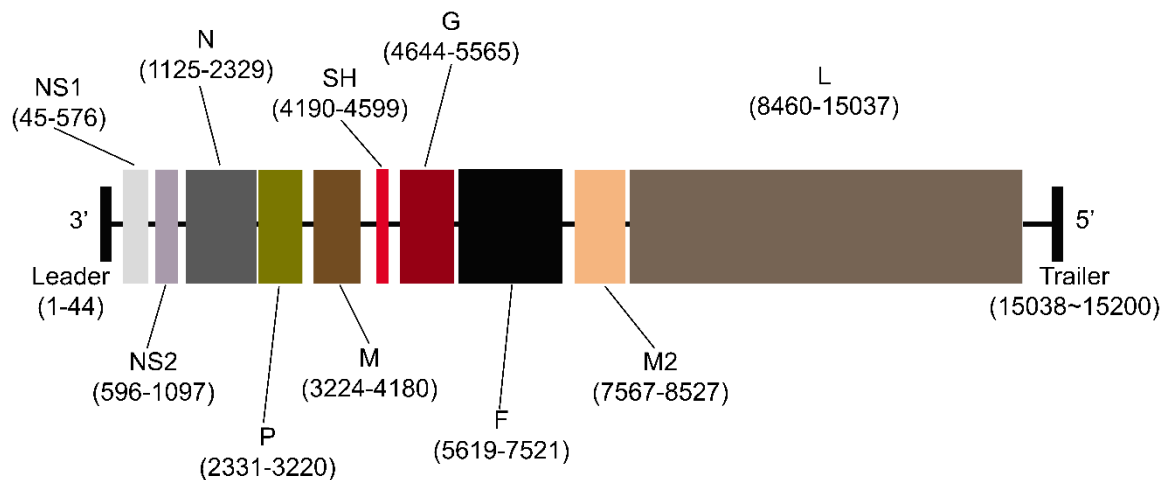


Figura 1. Estructura genómica de RSV. Se muestra la distribución de sus genes, así como las regiones "Leader" y "Trailer". Adicionalmente se indican entre paréntesis los nucleótidos que componen cada región genómica

Las proteínas NS1 y NS2, son proteínas no estructurales que no son esenciales para la replicación viral, pero aumentan la producción de viriones. Su principal función es la de antagonizar la respuesta antiviral mediada por el Interferón de tipo I (IFNI) (Schmidt & Varga, 2017).

La estructura del virión del RSV se compone de una nucleocápside rodeada por una bicapa lipídica (envoltura) derivada de la membrana celular del hospedero (Figura 2). Las proteínas F, G y SH son proteínas transmembranales mientras que M se extiende a lo largo de la cara interna de la envoltura. Por su parte, N conforma la estructura de la nucleocápside al asociarse con el genoma viral, protegiéndolo de las RNasas (Schmidt & Varga, 2017). La glicoproteína G se encuentra involucrada en el proceso de unión del virus con la célula hospedera. Existen dos formas de esta proteína: una transmembranal y una secretada. Esta última es importante en el secuestro de anticuerpos neutralizantes (Schmidt & Varga, 2017).

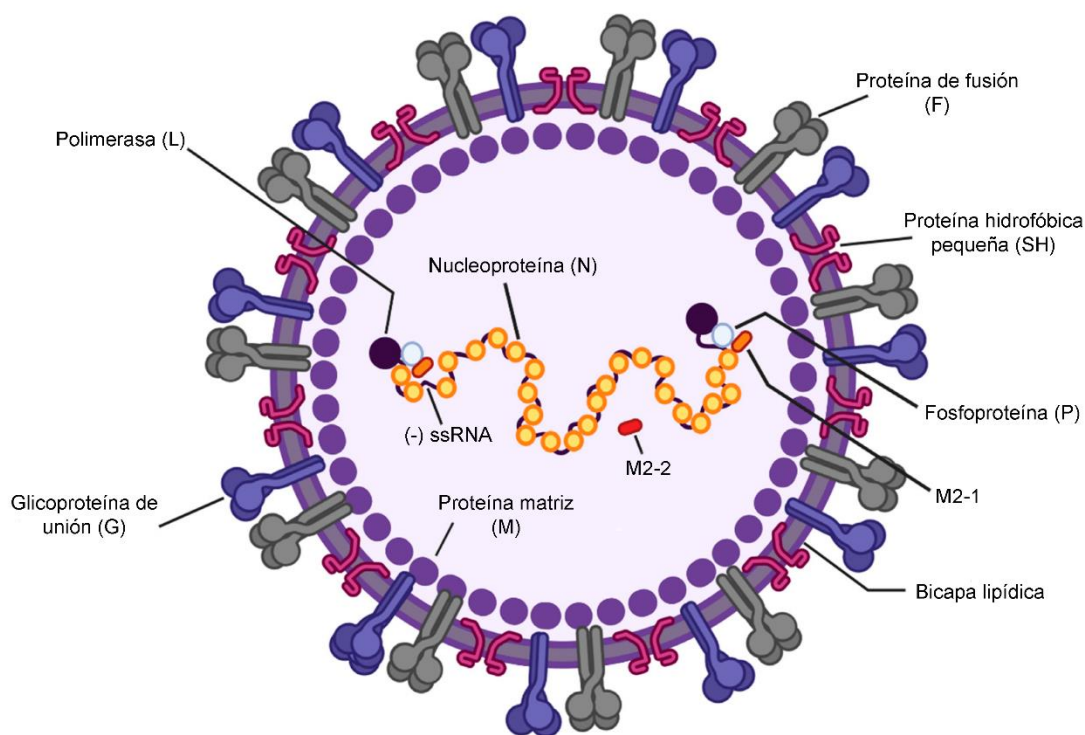


Figura 2. Estructura de RSV. La envoltura viral se compone de una bicapa lipídica en conjunto con las proteínas F, G y SH. En la cara interna se extiende la proteína M rodeando al núcleo viral. El núcleo contiene el genoma viral en conjunto con la proteína estructural N y las proteínas necesarias para la replicación (L, P y M2-1). Imagen adaptada y modificada de Jung et al., 2020

La función de la proteína F es la de fusionar la membrana celular y la membrana viral permitiendo el ingreso de la nucleocápside viral a la célula. En fases avanzadas de la infección, la proteína F es expresada en la membrana plasmática, promoviendo la formación de sincicios que es un efecto citopático que puede llevar a necrosis (Schmidt & Varga, 2017).

La proteína L tiene actividad de RNA polimerasa, realiza la replicación del genoma sin mecanismo de corrección de errores o “*proofreading*”, lo que puede llevar a mutaciones que generen un cambio en la virulencia (Griffiths et al., 2017; Schmidt & Varga, 2017). El proceso de transcripción requiere, además de la proteína L, a la proteína P que actúa como cofactor, mientras que M2-1 actúa como un factor de la transcripción que se une al RNA. Se ha encontrado que la proteína M2-2 en apariencia regula negativamente la síntesis de RNA, ya que en cepas recombinantes que carecen de M2-2 se observó una transcripción aumentada y prolongada en comparación con RSV de tipo silvestre (Schmidt & Varga, 2017).

### 1.1.2 Epidemiología

El RSV es una causa importante de morbilidad por infecciones del tracto respiratorio superior e inferior, siendo los grupos más vulnerables niños menores de 5 años, adultos mayores y pacientes inmunocomprometidos (Bergeron & Tripp, 2021). Para la edad de 1 año, entre el 60 a 70% de niños se han infectado con RSV y de éstos, entre 2-3% desembocan en hospitalización (Staadegaard et al., 2021).

El RSV es la causa líder de hospitalización en infantes por bronquiolitis, la cual puede ser letal (Bergeron & Tripp, 2021). Se han registrado hasta 200 mil muertes anuales en niños menores a 5 años y en pacientes con enfermedades crónicas, principalmente en países en “vías de desarrollo” (Bergeron & Tripp, 2021; Borchers et al., 2013).

A nivel económico, los costos de hospitalización de pacientes infectados por RSV son significativos. De acuerdo con algunos estudios realizados a finales de la década de los 90 e inicios de los años 2000, en Canadá y Estados Unidos, se reportaron pérdidas de hasta 600 millones de dólares anualmente (Griffiths et al., 2017).

La mayor incidencia de casos de RSV en regiones templadas ocurre entre mediados de diciembre e inicios de febrero, mientras que en regiones tropicales no hay una temporalidad establecida (Borchers et al., 2013). Durante la pandemia de COVID-19, los casos de infecciones respiratorias causadas por virus incluyendo al RSV disminuyeron, probablemente debido al distanciamiento social y a las medidas sanitarias. En Melbourne (Australia) se reportó entre 68 y 100 % de disminución (Bergeron & Tripp, 2021).

### 1.1.3 Clasificación

Existen dos subtipos de RSV (RSV- A y RSV- B) que a su vez se clasifican en diversos genotipos; se caracterizan por las diferencias en la secuencia de la segunda región hipervariable de la proteína G (Cui et al., 2013). En el caso de México, el RSV- A es el que se encuentra más frecuentemente en la población menor de 5 años. (Wong-Chew et al., 2017).

Los subtipos A y B de RSV se dividen en genotipos de acuerdo con la variabilidad del último tercio del gen G (Hause et al. 2017). Actualmente, se han identificado 14 genotipos para RSV- A (GA1- GA7, SAA1, NA1- NA4, CBA, ON1) mientras que para RSV- B se han identificado 24 (GB1- GB5, SAB1- SAB4, BA1- BA12, CB1, URU1- URU2) (Chen et al., 2022). Durante casi una década, el genotipo GA2 fue el predominante para RSV- A, pero en la actualidad ha sido reemplazado rápidamente por el genotipo ON1; una cepa descubierta en Ontario (Canadá) en la temporada de infección de 2010- 2011 (Pandya et al., 2019; Chen et al., 2021). Para RSV- B, el genotipo BA ha sido el predominante desde 2005. Tanto ON1 como BA, presentan una duplicación en el segmento final del gen G de una longitud de 72 y 60 nucleótidos, respectivamente (Chen et al., 2021). El análisis *in vitro* de cepas BA ha demostrado que la duplicación en el gen G impacta tanto en la unión como en la replicación viral, teniendo ventaja sobre los virus que carecen de la duplicación (Pandya et al., 2019).

La diversidad genética de RSV se ha considerado como un factor de importancia para la generación de reinfecciones y que debe de considerarse para el desarrollo de vacunas (Chen et al., 2021).

A pesar de que el gen G sea el que presenta mayor variabilidad en toda la secuencia de RSV, existen otros genes cuyas variaciones pueden contribuir en la virulencia y los patrones de circulación del virus (Muñoz-Escalante, 2019).

Se han realizado estudios que comparan la severidad de la enfermedad causada por los subtipos A y B de RSV. Algunos afirman que RSV- A causa enfermedad más severa que RSV- B mientras que otros encontraron mayor severidad en enfermedad por RSV-B que por RSV- A. Adicionalmente, algunos estudios no encontraron una diferencia significativa respecto a la severidad de la enfermedad causada por alguno de los dos subtipos (Pangesti et al., 2018).

De igual manera, se ha intentado buscar diferencias en la severidad de la enfermedad causada por distintos genotipos de RSV, sugiriendo que el genotipo más virulento es el que presenta mayor incidencia. Se han encontrado resultados variables que no llevan a una conclusión clara (Pangesti et al., 2018).

#### 1.1.4 Características clínicas

La exposición a gotas y aerosoles de secreciones respiratorias de personas infectadas, o el contacto con superficies contaminadas con el RSV son mecanismos de transmisión asociados a la infección del tracto respiratorio superior en individuos susceptibles; a partir de aquí, el virus puede diseminarse hacia el tracto respiratorio inferior infectando principalmente a las células epiteliales (Bergeron & Tripp, 2021).

Las infecciones del tracto respiratorio superior por RSV pueden ocurrir a cualquier edad, pero no son un problema para los adultos sanos, sin embargo, se encuentran asociadas con el desarrollo de enfermedades como otitis media por coinfección bacteriana en niños, y la exacerbación de asma a cualquier edad (Grieves et al., 2010).

Las infecciones del tracto respiratorio inferior por RSV ocurren entre el 15 y el 50% de infantes y niños pequeños con infección primaria. La bronquiolitis es la complicación más común por infección de RSV del tracto respiratorio inferior en infantes, aunque la neumonía también aparece con frecuencia (Borchers et al., 2013).

Las infecciones virales del tracto respiratorio inferior pueden llevar a secuelas crónicas, tales como bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis pulmonar idiopática (Griffiths et al., 2017).

El mayor factor de riesgo para el desarrollo de una infección grave por RSV es la edad del individuo ( $\leq 5$  años), pero existen otros factores de importancia que influyen en esta enfermedad. Entre estos se encuentran: el nacimiento prematuro, el inmunocompromiso inducido por tratamiento farmacológico, enfermedades pulmonares, desórdenes inmunológicos, defectos cardíacos o pulmonares e incluso neoplasias (Griffiths et al., 2017).

#### 1.1.5 Patogenia

Cuando el virus ingresa en el hospedero, su unión con la membrana de las células blanco está mediada en primer lugar por la proteína G y posteriormente por la proteína F que induce la fusión de la membrana viral con la membrana celular. Se ha reportado a la nucleolina como el receptor principal del virus, por su afinidad por la proteína F (Bergeron & Tripp, 2021; Griffiths et al., 2017; Shang et al., 2021). Después de la fusión de membranas, la nucleocápside es liberada al citoplasma en donde se desensambla para dar inicio al proceso de transcripción del material genético mediante la polimerasa L y la participación de N y P como cofactores para dar lugar a los mRNA, que son traducidos por los ribosomas del hospedero. Asimismo, el RNA genómico se replica a través de un intermediario de RNA de polaridad positiva llamado antígenoma. Una



vez que se generan las proteínas virales, éstas se ensamblan con una copia del genoma para dar lugar a nuevos viriones (Bergeron & Tripp, 2021).

Las células infectadas por el RSV expresan en su membrana a la proteína F, por lo tanto, al entrar en contacto con células no infectadas que expresan a la nucleolina, la proteína F induce la fusión de sus membranas plasmáticas. A las células fusionadas se les denomina sincicios o células multinucleadas y afectan la integridad de las vías respiratorias (Bergeron & Tripp, 2021). Adicionalmente, la proteína F puede inducir una retroalimentación positiva reclutando más neutrófilos, aunque también es capaz de generar un proceso de muerte celular controlada denominado NETosis, que consiste en la liberación de cromatina modificada enlazada a proteínas antimicrobianas (Bergeron & Tripp, 2021; Vorobjeva & Chernyak, 2020).

La inmunidad generada hacia el RSV por medio de una infección primaria puede prevenir reinfecciones en el tracto respiratorio inferior, pero se ha observado que los anticuerpos proporcionan una protección incompleta, resultando en reinfecciones múltiples a lo largo de la vida, incluso con la misma cepa del virus (Grievess et al., 2010).

En comparación con otros virus respiratorios (como el virus de la influenza), el RSV produce menor efecto citopático. De hecho, la mayor parte del daño celular es generado por el propio sistema inmune y no por la replicación viral (Griffiths et al., 2017). Las principales células afectadas por el RSV son las epiteliales respiratorias que son capaces de interactuar con el virus mediante receptores como los tipos *toll* (TLR) o el receptor similar al gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I), que dan inicio a la respuesta inmune antiviral (Bueno et al., 2011).

La evidencia en estudios en animales muestra que la infección aguda por RSV se caracteriza por la infiltración de células de la respuesta inmune en los pulmones, lo que conduce a daño pulmonar e inflamación debido a una respuesta principalmente de tipo Th2 constituida por la sobreexpresión de IL4 e IL13. El control de la enfermedad y el aclaramiento viral, se ha asociado a una respuesta de tipo Th1 con sobreexpresión de IFN $\gamma$  e IL2. En el caso de infantes de hasta 2 años de edad con bronquiolitis aguda por infección de RSV, se han observado bajos niveles de IFN $\gamma$ , una sobreexpresión de IL4 y un incremento de células T CD4+ y CD8+ (Rey-Jurado and Kalergis, 2017).

La infección por RSV incrementa los niveles de TLR4 en células epiteliales y neutrófilos promoviendo la expresión de citocinas proinflamatorias, principalmente IL8. De igual manera, RSV bloquea la secreción de Interferón- $\beta$  y otras citocinas antivirales, esto por medio de la señalización de los receptores TLR7 y TLR9 (Bergeron & Tripp, 2021; Bueno et al., 2011).

Un estudio demostró que el RSV en el epitelio bronquial induce la producción de la proteína de choque térmico HSP72, que se une al TLR4 de neutrófilos e induce la expresión de IL8 y Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Bueno et al., 2011).

Los receptores TLR2 y TLR6 expresados por las células epiteliales respiratorias se encuentran involucrados en el control de la replicación del RSV (Bueno et al., 2011). Son capaces de detectar al virus y contribuir a la producción de citocinas, tales como: TNF $\alpha$ , Interleucina 6 (IL6), el Ligando 2 de Quimiocina con motivo C-C (CCL2) y RANTES; de igual manera, contribuyen a la migración de neutrófilos y la activación de células dendríticas. Por medio de todos estos mecanismos logran disminuir la replicación viral (Bueno et al., 2011).

Un aspecto controvertido durante la infección por RSV es la asociación entre la carga viral y la severidad de la enfermedad producida. Algunos estudios demuestran que existe correlación entre la cantidad de virus encontrado en las muestras respiratorias y la severidad de los síntomas de los pacientes, (Griffiths et al., 2017; Borchers et al., 2013) pero otros estudios no reportan una asociación significativa (Borchers et al., 2013). Sin embargo, la severidad de la infección se encuentra relacionada con el grado de inflamación (Griffiths et al., 2017). Asimismo, como se mencionó previamente, el subtipo viral (A o B) se ha asociado con la severidad de la enfermedad, aunque hay estudios que no encuentran relación alguna. Es por esto que recientemente se tiene la hipótesis de que el genotipo viral es un factor más relevante en la gravedad que el subtipo viral, aunque se requieren más evidencias que la sustenten (Borchers et al., 2013).

Otro factor considerado para explicar la enfermedad grave es la coinfección con otros virus. En este sentido, se ha observado que una cantidad considerable de infantes hospitalizados o atendidos en servicio de emergencias con bronquiolitis producida por RSV, se encontraban coinfectados con dos o más virus. En este caso, la coinfección se asoció con el desarrollo de una enfermedad grave (Borchers et al., 2013).

#### 1.1.6 Persistencia

Comúnmente las infecciones virales son de tipo agudo llevando a dos desenlaces: la eliminación del virus por parte del sistema inmunitario o la muerte del hospedero, sin embargo, existen algunos virus capaces de mantener infecciones por tiempo prolongado (infecciones persistentes) mediante mecanismos celulares que permiten su subsistencia (Kane & Golovkina, 2010).

Para que un virus sea capaz de establecer una infección persistente, requiere de ciertos mecanismos, entre los más comunes se puede englobar a la:

1. Selección de poblaciones celulares ideales para la conservación del genoma viral
2. Modulación de la expresión génica viral
3. Inhibición de la apoptosis
4. Evasión de la eliminación por parte del sistema inmune (Boldogh et al., 1996; Kane & Golovkina, 2010)

La capacidad de persistencia de RSV se ha observado en adultos y niños inmunosuprimidos por tratamiento farmacológico, principalmente en pacientes con trasplante de células hematopoyéticas. En estos casos, el RNA viral se ha detectado hasta por más de 300 días en muestras respiratorias obtenidas de manera secuencial, y el análisis de la secuencia del gen G ha mostrado conservación del 100%, sugiriendo que el hallazgo del virus a lo largo del padecimiento es por infección persistente y no por reinfección (Santiago-Olivares et al, 2023).

La persistencia del RSV también se ha demostrado en modelos de ratones y cobayos, aunque no se ha determinado con claridad el tipo celular en el que se establece este tipo de infección. Asimismo, mediante estudios in vitro se ha observado que RSV puede persistir en células epiteliales, macrófagos y células dendríticas, observándose replicación prolongada con una duración de hasta 25 días después de la infección en macrófagos alveolares humanos aislados. Esto indica que los macrófagos podrían ser un reservorio importante de RSV in vivo (Rivera-Toledo & Gómez, 2012). Adicionalmente, se ha observado que en personas adultas, el RSV puede permanecer en los pulmones, ya sea en estado latente o crónico, evadiendo de esta manera la respuesta inmune. (Estripeaut et al., 2008).

La persistencia de RSV no ha sido demostrada en individuos inmunocompetentes, pero existe evidencia que indica dicha posibilidad, por ejemplo, se ha logrado aislar el virus en diversas ocasiones en muestras nasofaríngeas de niños sin síntomas respiratorios; de igual manera, se han amplificado secuencias genómicas de RSV a partir de células del estroma de médula ósea (Piedimonte & Pérez, 2014; Rivera-Toledo & Gómez, 2012). Esta última observación hace sentido bajo la hipótesis de que las células del estroma de médula ósea están comprendidas en una región inmunológicamente privilegiada donde el virus puede permanecer en una infección de bajo grado (Piedimonte & Pérez, 2014).

Para el RSV no existe un reservorio animal conocido que garantice su subsistencia entre brotes estacionales (Borchers et al., 2013). Sin embargo, es probable que el virus permanezca en

circulación a lo largo de todo el año manteniéndose en individuos susceptibles, dando lugar a nuevas variantes, aunque también ocurre la reemergencia de variantes previas (Grieves et al., 2010).

Se ha propuesto que el RSV puede circular entre personas con inmunidad adquirida como consecuencia de la infección y que los individuos infectados de manera persistente pueden actuar como reservorios del virus entre brotes (Grieves et al., 2010).

La infección de macrófagos por RSV *in vitro* altera la expresión de citocinas proinflamatorias, proteínas relacionadas a la captura de antígenos y proteínas relacionadas a la supervivencia celular, lo cual sugiere que los macrófagos potencialmente pueden funcionar como reservorios del virus (Rivera-Toledo & Gómez, 2012). De igual manera se ha observado que la infección por RSV en epitelio de vías respiratorias distales genera un patrón de expresión de neurotrofinas (sobreexpresión de NGF y su receptor de alta afinidad TrKA) tal que confiere protección contra apoptosis, lo cual podría llevar a la permanencia del virus de forma latente (Piedimonte, 2013). La infección por RSV en infantes se asocia a la sobreexpresión de las citocinas: linfopoyetina estromal tímica (TSLP), IL4, IL6, IL10 e IL13. Estas citocinas pueden fallar en eliminar completamente al RSV favoreciendo su persistencia (Rey-Jurado and Kalergis, 2017).

### 1.1.7 Asociación con asma

El asma es un espectro de enfermedades que cursan con cronicidad afectando las vías aéreas. Presenta múltiples fenotipos entre los cuales se puede incluir la inflamación crónica en el tejido respiratorio, producción excesiva de moco e hiperreactividad bronquial. Es la enfermedad respiratoria crónica más frecuente entre la población infantil y está relacionada con episodios recurrentes de sibilancias, disnea y tos (Mikhail & Grayson, 2019; Driscoll et al., 2020).

Las infecciones virales en los primeros meses de vida se han asociado con el desarrollo de asma hasta en 40% de los infantes. Un síntoma relacionado con las infecciones virales y el posible desarrollo de asma son las sibilancias, aunque una gran proporción de niños pequeños las experimentan en algún momento, pero no siempre es indicativo de dicho padecimiento (Mikhail & Grayson, 2019; Driscoll et al., 2020).

Los virus respiratorios que se encuentran comúnmente relacionados al desarrollo de sibilancias son el Rinovirus (RV) y el RSV, siendo también los que se encuentran más relacionados con el desarrollo subsecuente de asma. Se ha observado que el RSV afecta el desarrollo del pulmón en infantes cuando la infección se adquiere durante los primeros meses de vida, lo cual puede

llevar a alteraciones fisiológicas y estructurales que se manifiestan a corto y largo plazo. Además de la infección por RSV, especialmente la que ocurre en el tracto respiratorio inferior (ITRI) y que produce sibilancias antes del primer año de vida, el tabaquismo por parte de los padres es otro factor de riesgo para el desarrollo de asma no atópica en edad escolar (Mikhail & Grayson, 2019).

Se ha reportado que los casos de infección por RSV moderados y graves pueden llevar al desarrollo de asma y sibilancias crónicas; esto es potencialmente mediado por la sensibilización inmune al virus (Bergeron & Tripp, 2021).

La relación entre la infección temprana por el RSV y el desarrollo del asma es un hecho reconocido en el área clínica, aunque los mecanismos siguen en estudio (Liu et al., 2009). En este sentido, se ha propuesto que el proceso inflamatorio exacerbado podría alterar la sensibilidad del epitelio respiratorio mediante el incremento de las neurotrofinas NGF (*nerve growth factor*) y BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) que participan en la activación de eosinófilos, en la contracción del músculo respiratorio y la remodelación del tejido (Liu et al., 2009; Prakash and Martin, 2014). Asimismo, se ha reportado que el RSV podría establecer una infección persistente en el tracto respiratorio contribuyendo con la inflamación crónica a través de la expresión constante de antígenos virales (Proenca-Modena et al., 2012).

La mayor parte de la evidencia de la relación entre las ITRI por RSV y el desarrollo de asma subsecuente, proviene de estudios observacionales (Driscoll et al., 2020). En algunos estudios se ha encontrado asociación de factores, como cantidades mayores de carga viral y la severidad de la enfermedad por RSV, con el desarrollo de sibilancias crónicas y/o asma pero otras investigaciones no reportan esta misma asociación (Driscoll et al., 2020).

En algunos estudios se ha encontrado asociación de factores, como cantidades mayores de carga viral y la severidad de la enfermedad por RSV, con el desarrollo de sibilancias crónicas y/o asma, pero otras investigaciones no reportan esta misma asociación (Driscoll et al., 2020).

La citocina TSLP, en conjunto con IL7 derivada de células epiteliales, IL25 e IL33 son características de exacerbaciones agudas en asma y una respuesta polarizada Th2 durante infecciones virales (Rey-Jurado and Kalergis, 2017). Se ha observado sobreexpresión de TSLP en niños con asma después de una infección por RSV (Rey-Jurado and Kalergis, 2017). En conjunto con esto, estudios en animales han sugerido que la infección por RSV puede ser un factor de predisposición de asma (Rey-Jurado and Kalergis, 2017).

Se desconoce si las infecciones virales contribuyen directamente al desarrollo de asma o si son simplemente un marcador de predisposición, ya que puede existir una predisposición compartida entre las infecciones graves del tracto respiratorio ocasionadas por RSV y el desarrollo de sibilancias crónicas o asma (Mikhail & Grayson, 2019; Driscoll et al., 2020).

### 1.1.8 Terapéutica de RSV

Las poblaciones en mayor riesgo de enfermedad por RSV son los adultos mayores, niños pequeños (<5 años) y pacientes inmunocomprometidos. Aproximadamente un tercio de los infantes infectados por RSV en su primer año de vida, desarrollarán ITRI (Nicholson & Muñoz, 2018; Bergeron & Tripp, 2020).

El desarrollo de alternativas terapéuticas, suele estar enfocado en evitar la entrada del virus a las células del hospedero. Debido a la conservación de su secuencia, la proteína F es el blanco más común para el desarrollo de alternativas terapéuticas ya que de esa manera es posible prevenir la fusión y la posterior entrada del virus a la célula. Otro de los blancos terapéuticos es la nucleocápside, en específico la proteína N. Tanto la proteína N como la proteína F son blancos atractivos debido a su alta conservación y su papel esencial en la viabilidad de RSV (Nicholson & Muñoz, 2018).

En la actualidad, el tratamiento para pacientes inmunocompetentes suele consistir únicamente en tratamiento de apoyo. Para el caso de pacientes inmunocomprometidos, la terapia incluye la administración de Ribavirina o inmunoglobulinas intravenosas (Nicholson & Muñoz, 2018).

Como tratamiento profiláctico existe el Palivizumab, que es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra la proteína F, y aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*, Estados Unidos) para la administración en infantes con alto riesgo en temporadas de contagio. Se ha demostrado que reduce las hospitalizaciones aproximadamente en un 50% pero su eficacia disminuye conforme aparecen mutaciones en el gen F. De igual manera, no es efectivo en la reducción del desarrollo de asma posterior a la infección por RSV (Bergeron & Tripp, 2020). La Ribavirina es otro tratamiento aprobado contra la infección por RSV. Se trata de un análogo de nucleósido que ha demostrado resultados variados en cuanto a su eficacia. Debido a que las alternativas terapéuticas son limitadas, se requiere de la búsqueda de tratamientos más efectivos (Bergeron & Tripp, 2020).

### 1.1.9 Epidemiología molecular

La diversidad genética de RSV se ha considerado como un factor determinante para las reinfecciones, siendo indispensable su consideración durante el diseño de vacunas (Chen et al., 2021). La mayor parte de los estudios moleculares de RSV, se enfocan en el análisis de la secuencia de la proteína G del virus ya que es el gen que presenta mayor variabilidad en el genoma mientras que los demás genes en general conservan su secuencia; sin embargo, el estudio exclusivo de esta secuencia limita el entendimiento de los procesos evolutivos y los mecanismos infecciosos del virus (Chen et al., 2021; Pangesti et al., 2018).

El RSV presenta una alta tasa de variación genética, siendo así que las cepas que circulan actualmente poseen muchas diferencias en comparación a la cepa prototipo empleada en la mayoría de las investigaciones de vacunas (por ejemplo la cepa A2 de RSV subtipo A) (Pangesti et al., 2018). De la misma manera, la relación entre la diversidad genética de RSV y el desenlace clínico de los pacientes permanece poco clara (Pangesti et al., 2018).

El uso de secuenciación del genoma completo (SGC) de RSV brinda la posibilidad de profundizar en la epidemiología viral, inmunidad y patogénesis, así como guiar las herramientas de diagnóstico y el desarrollo de vacunas (Pangesti et al., 2018).

## 1.2 Modelo de persistencia del RSV

Los macrófagos, son un tipo celular importante en la respuesta inmune durante las infecciones virales ya que tienen participación tanto en la respuesta inmune innata como adaptativa. Además, los macrófagos están entre los tipos celulares que son seleccionados por los virus para persistir (Sarmiento et al., 2002). Es por esto, que en el laboratorio se decidió establecer un modelo de infección persistente de RSV subtipo A (cepa Long ATCC, VR-26) en macrófagos inmortalizados. Se empleó la línea celular P388D<sub>1</sub>, debido a que muestra características de macrófagos maduros. Esta línea celular tiene su origen en linfoma inducido por metilclorantreno en ratones de la cepa DBA/2 (Sarmiento et al., 2002).

## 1.3 Mutaciones del RSV persistente

Previamente, se realizó el hallazgo de que el RSV permanece de manera persistente en el cultivo celular P388D<sub>1</sub> mediante estrategias como la alteración de la supervivencia celular, la

respuesta de interferón de tipo I (IFNI) y producción de óxido nítrico (Ruiz-Gómez et al., 2021). En este cultivo, el RSV mantiene una persistencia en estado estacionario que se caracteriza por la detección de proteínas y RNA viral en la mayor parte de las células, mientras que hay resistencia a la apoptosis (Ruiz-Gómez et al., 2021; Nakamura et al., 2011). Tal alteración en la biología de la célula hospedera, como consecuencia de la infección persistente, esto llevó a estudiar el RSV mediante secuenciación de su genoma para identificar mutaciones y su asociación con la persistencia en estado estacionario (Ruiz-Gómez et al., 2021). Como resultado se encontraron 74 mutaciones puntuales, dos inserciones y una deleción (ver Anexo 1). Con respecto a las mutaciones, 38 son de tipo no sinónimas y 24 sinónimas que podrían estar relacionadas con alteraciones en la transcripción y replicación viral, así como en la fusión de membranas, ensamblaje y liberación de viriones, reduciendo el efecto citopático contribuyendo a su vez a la sobrevivencia de la célula hospedera. (Ruiz-Gómez et al., 2021)



## II. Justificación

El virus sincicial respiratorio, es un virus que tiene gran relevancia a nivel mundial afectando principalmente a la población infantil y adultos mayores. Se ha demostrado en diversos estudios que puede generar síntomas graves en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas como asma y EPOC, e incluso existe la posibilidad de que la infección por RSV sea un factor de importancia en el desarrollo de dichas enfermedades. Actualmente, se reconoce que hay una relación entre la forma grave de la enfermedad por RSV en infantes y el desarrollo posterior de asma. Sin embargo, no se ha determinado si el virus es la causa directa o si la enfermedad grave es un marcador de riesgo para el desarrollo del asma.

Existe evidencia que apunta a la posibilidad de que el RSV genera una infección de tipo persistente en algunos individuos, a través de diversos mecanismos de evasión de la respuesta inmune. Asimismo, se ha sugerido que el RSV podría infectar de manera persistente a las personas con asma y EPOC provocando inflamación crónica e hipersensibilidad bronquial.

El control de variables en los modelos experimentales hace posible distinguir a las infecciones virales agudas de las infecciones persistentes. No obstante, en infecciones adquiridas en la comunidad es complicado determinar si un virus aislado a partir de un individuo fue adquirido de manera reciente o si se trata de un virus que ha infectado por tiempo prolongado a su hospedero. Una estrategia para abordar este problema contempla la secuenciación del genoma viral en muestras consecutivas del mismo individuo (en estudios longitudinales) y así determinar si hay identidad entre las muestras tempranas y tardías; de ser así, se sugeriría la persistencia, descartando reinfecciones.

Dado que los estudios longitudinales son difíciles de llevar a cabo por la necesidad de la toma seriada de muestras, el contar con una lista de mutaciones acumuladas en un genoma viral sería una herramienta valiosa para su uso como marcadores genéticos asociados a la infección crónica y de esta manera estudiar la relación de este tipo de infecciones con padecimientos crónicos.

En nuestro grupo de investigación se ha estudiado la persistencia del RSV en una línea celular de macrófagos que se ha conservado por más de 150 pases. A través de secuenciación masiva se identificaron 74 mutaciones en el genoma del virus persistente (38 son de tipo no sinónimas) relacionadas con alteraciones en el ensamble de los viriones y defectos en la fusión de membranas. En ellos, la replicación del genoma sigue activa, sugiriendo que los virus son defectuosos. Es importante mencionar que varios estudios han tratado de evaluar la persistencia

del RSV mediante aislamiento en cultivos celulares a partir de muestras obtenidas de personas asintomáticas. Sin embargo, la alteración del genoma viral a largo plazo podría favorecer la producción de virus defectuosos no infecciosos, indetectables mediante los métodos de aislamiento tradicionales.

Este estudio tiene como objetivo evaluar la utilidad de las 74 mutaciones encontradas en el RSV persistente en macrófagos como marcadores genéticos de la persistencia del virus en humanos. Para lograr esto, se llevará a cabo la secuenciación del genoma del RSV encontrado en hisopados nasales de pacientes con enfermedad respiratoria y se alineará con la secuencia genómica del RSV persistente. Además, se determinará la expresión de citocinas en los hisopados nasales utilizando kits comerciales para comparar con la lista de citocinas expresadas en el cultivo infectado de manera persistente. Una vez que se haya recuperado y secuenciado el genoma del RSV a partir de los hisopados, y se hayan identificado las mutaciones comunes con el virus persistente, se determinará si existe una relación entre estas mutaciones y la expresión de citocinas asociadas a la inflamación crónica.

### III. Hipótesis

El genoma del RSV presente en los hisopados nasales de pacientes con enfermedad respiratoria posee algunas de las mutaciones identificadas en el genoma del RSV persistente y estas mutaciones se asocian con la expresión de citocinas producidas durante la inflamación crónica.

### IV. Objetivos

#### 4.1 Objetivo general

- Determinar la utilidad de las 74 mutaciones identificadas en el genoma de un RSV persistente en una línea celular, como marcadores de persistencia del virus en el tracto respiratorio de pacientes con enfermedad respiratoria viral y evaluar la expresión de citocinas asociadas a inflamación crónica.

#### 4.2 Objetivos específicos

- Cuantificar la cantidad de copias del genoma de RSV en hisopados nasales de pacientes con enfermedad respiratoria por medio de qPCR
- Estandarizar un método para la amplificación del genoma completo de RSV presente en los hisopados nasales
- Secuenciar el genoma del RSV presente en 36 hisopados nasales
- Comparar las secuencias del genoma del RSV de las muestras de los pacientes con secuencias de referencia y con la secuencia del RSV persistente
- Cuantificar IL6, TNF $\alpha$ , IP10, IL8, IL12p70, IFN $\beta$ , IL10, IL2, IL13, IL5, IL4 e IFN $\gamma$  en muestras de pacientes y controles

## V. Procedimiento experimental

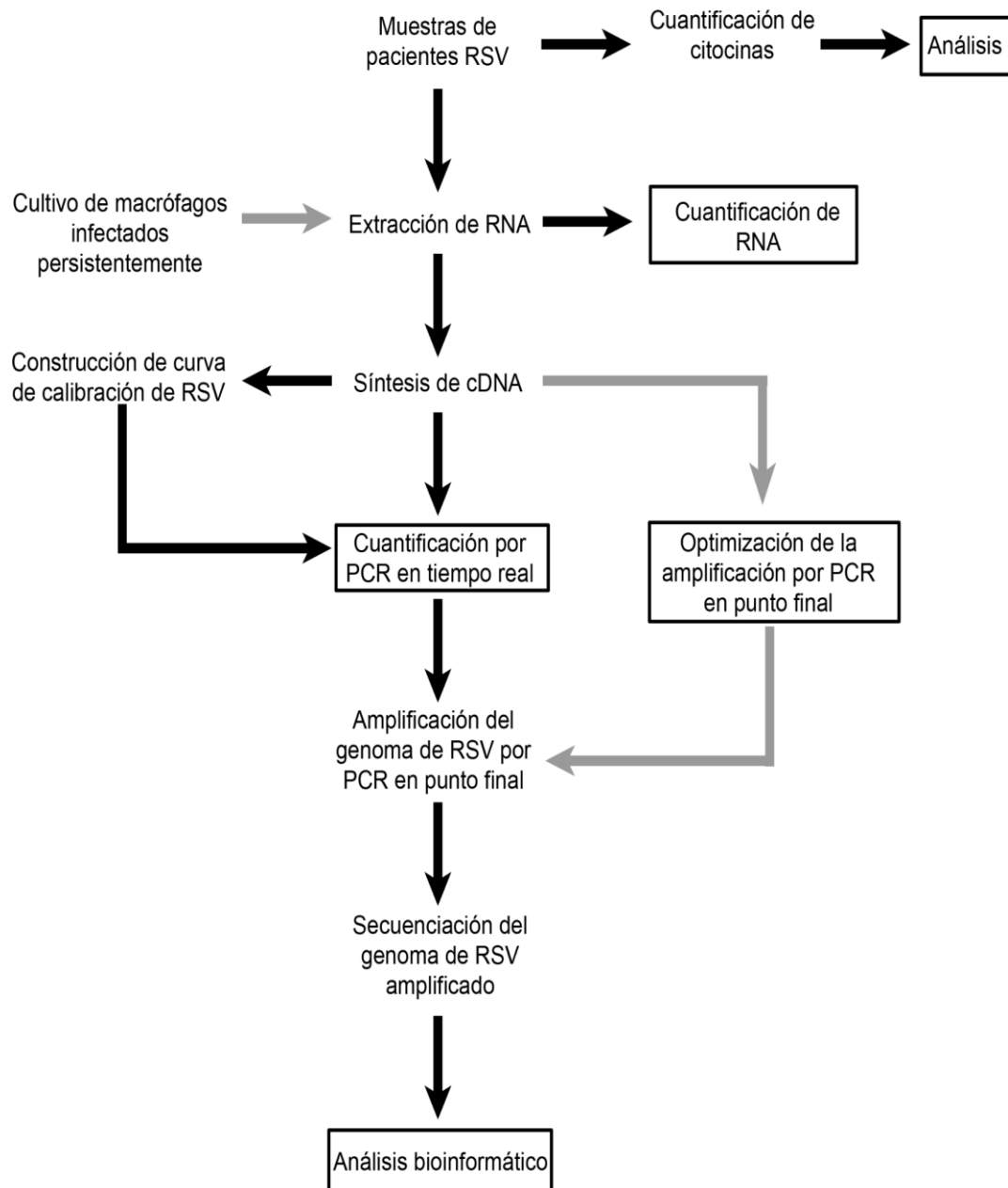


Figura 3. Diagrama general del procedimiento experimental

## 5.1 Cultivo de líneas celulares (Macrófagos con infección persistente de RSV)

Los macrófagos de la línea P388D<sub>1</sub> fueron infectados con RSV de la cepa Long subtipo A (ATCC, VR-26) con una multiplicidad de infección (moi) de 1. Las células sobrevivientes a la infección aguda se han mantenido mediante múltiples subcultivos por lo menos hasta el pase 154. La presencia del RSV a través de los pases se ha monitoreado constantemente mediante transcripción inversa y PCR en tiempo real (RT- qPCR) para evaluar la expresión del gen de la proteína de nucleocápside (N). Asimismo, se realizan frecuentemente ensayos de inmunofluorescencia para comprobar la expresión de las proteínas N y F. (Sarmiento et al., 2002) (Gaona et al., 2014)

Los macrófagos infectados de manera persistente por el RSV (MΦP) se cultivaron en placas de Petri con medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO/BRL, Massachusetts, Estados Unidos) suplementado con 5% de suero bovino fetal (Biowest, Nuaille, Francia.), 1 μM de β-mercaptoetanol y 1% de penicilina- estreptomycin, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Los macrófagos P388D<sub>1</sub> de la línea original, no infectada, se mantuvieron en cultivo a lo largo de 28 pases bajo las mismas condiciones que los MΦP, y fueron utilizados como un control negativo de la infección viral (MΦN).

## 5.2 Muestras de pacientes

El Dr. Joel Vázquez Pérez del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) donó 36 hisopados nasales de pacientes con enfermedad respiratoria viral que fueron positivos para el RSV. Además, se recibieron 13 hisopados nasales de personas que dieron negativo para virus y bacterias, los cuales fueron utilizados como controles negativos para RSV. Todas las muestras se han mantenido congeladas a una temperatura de -70 °C hasta su utilización. En la Tabla 1 se proporcionan detalles sobre las características de los pacientes.

Para el diagnóstico de RSV se empleó el kit *NxTAG® Respiratory Pathogen Panel* (Luminex, Austin, Texas, Estados Unidos), que es capaz de detectar 21 patógenos respiratorios:

- Influenza A, A H1, A H3 y B; RSV A y B
- Adenovirus
- Coronavirus HKU1, NL63, 229E y OC43

- Bocavirus humano
- Rinovirus
- Enterovirus
- Parainfluenza 1, 2, 3 y 4
- Metapneumovirus humano
- *Chlamydomphila pneumoniae*
- *Mycoplasma pneumoniae*

Las muestras biológicas utilizadas en este estudio fueron obtenidas de un banco de biológicos, donde se recolectan con el propósito de llevar a cabo estudios de epidemiología molecular. El INER, de acuerdo a sus atribuciones y de la mano del Sistema de Gestión de la Calidad y de Riesgo biológico que está implementado, declara que el material biológico bajo su custodia puede ser puesto a disposición para investigación científica, considerando que no representa riesgo para el donador, de acuerdo a la Ley general de Salud en Materia de Investigación para la Salud, en su artículo 17 (ver Anexo 2)

Tabla 1. Características de los individuos de los cuales se obtuvieron los hisopados nasales

Clave	Edad	Diagnóstico RSV	Asma	Días con síntomas respiratorios
1707 (1701)	2 meses	+	-	-
2169	10 meses	+	-	6
E199	12 meses	+	-	1
830	1 año	+	-	7
847	1 año	+	-	-
1948	1 año	+	-	3
1958	1 año	+	-	2
1721	2 años	+	-	-
1723	2 años	+	-	-
1782	2 años	+	-	15
1823	2 años	+	+	15
1875	2 años	+	-	4
1920	2 años	+	-	-
841	3 años	+	-	-
2156	5 años	+	-	15
1837	8 años	+	+	1
1685	10 años	+	+	1
1946	14 años	+	-	13
1822	31 años	+	-	90
1781	35 años	+	-	-
2166	40 años	+	-	-
1861	41 años	+	-	2
SC2_3403	52 años	+	-	-

Clave	Edad	Diagnóstico RSV	Asma	Días con síntomas respiratorios
842	57 años	+	-	1
837	60 años	+	-	-
PCE-10	0 meses	-	-	-
829	5 meses	-	-	-
2149	3 años	-	-	-
LOJA7	25 años	-	-	-
RCT-9	25 años	-	-	-
GGJ-2	28 años	-	-	-
1876	33 años	-	+	-
AMSG-5	35 años	-	-	-
SRG-4	39 años	-	-	-
BML-8	41 años	-	-	-
DTCJR-3	53 años	-	-	-
SFC-1	55 años	-	-	-
VMF-6	57 años	-	-	-

### 5.3 Extracción de RNA

La extracción de RNA a partir de hisopados nasales se realizó con el kit QIAmp Viral RNA (QIAGEN, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del proveedor. Algunas muestras fueron obtenidas a partir de un proceso doble de extracción (ver Anexo 3). Por otro lado, para contar con los controles positivo y negativo de la infección por RSV se extrajo RNA a partir de MΦP y de MΦN utilizando el kit Hybrid-R (305-101, GeneAll, Seúl, Corea del Sur), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Posteriormente, se cuantificó la cantidad de RNA obtenido con el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

### 5.4 Preparación de cDNA

A partir de las muestras de RNA se preparó cDNA con una transcriptasa inversa SuperScript III, de acuerdo con las instrucciones del proveedor del kit *SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (18080051, Life Technologies, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Para todas las muestras y controles se emplearon hexámeros aleatorios y 8 µL de RNA, independientemente de su concentración (aunque en la mayoría de los casos el cDNA se preparó con aproximadamente 500 ng de RNA). El proceso de eliminación de estructuras secundarias del RNA para permitir el alineamiento de los oligonucleótidos se realizó en presencia de 50 ng de hexámeros aleatorios y 10 ng de mezcla equimolar de los dNTP, incubando a 65°C por 5 minutos. La síntesis de cDNA se llevó a cabo a 50°C añadiendo la mezcla de reacción que consiste en 2 µL de amortiguador RT 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 4 µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 2 µL de ditioneitol (DTT), 1 µL del inhibidor de ribonucleasa RNase OUT (Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) (40 U/µL) y 1 µL de la transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) (200 U/µL). La reacción se terminó a 85°C para inactivar la enzima y se removió el RNA remanente con 1 µL de RNasa H de E. coli (2 U/µL) (Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). El cDNA resultante se almacenó a -20°C.



## 5.5 Detección y cuantificación del genoma viral por medio de PCR en tiempo real

### 5.5.1 Detección del genoma de RSV

Para confirmar la presencia de RSV en las muestras respiratorias, se llevó a cabo la detección utilizando la técnica de qRT-PCR con una sonda TaqMan. Para ello, se utilizó el kit Luna® Universal Probe qPCR Master Mix (M3004, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Estados Unidos). La composición de la mezcla de reacción empleada para estas pruebas se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de la mezcla de reacción para la detección de RSV por qRT- PCR

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Luna Universal Probe qPCR Master Mix	10
Oligonucleótido <i>Forward</i> (sentido) (10 $\mu\text{M}$ )	0.8
Oligonucleótido <i>Reverse</i> (antisentido) (10 $\mu\text{M}$ )	0.8
Sonda (10 $\mu\text{M}$ )	0.4
cDNA muestra	5
H <sub>2</sub> O tratada con DEPC	3

Se empleó como control positivo cDNA de MΦP y como control para descartar contaminación de las muestras con DNA de otras fuentes se agregaron 5  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC en lugar del cDNA de interés (control negativo o NTC). Tanto para las muestras como para el control positivo se corrieron reacciones por triplicado. Para el control negativo se prepararon reacciones por duplicado.

Los oligonucleótidos empleados para la detección de RSV fueron los siguientes: Forward 5'-AATTCCTCA CTTTCCAGT GTAG -3', Reverse 5'- TGATTCCTCG GTGTACCTCT G -3'. La sonda TaqMan empleada para la detección estaba asociada al fluoróforo 6-Carboxifluoresceína (FAM) y su secuencia es: 5'- GGCAATGCTG CTGGCCTAGG CATAATG -3'.

Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pozos utilizando el equipo StepOne™ Real-Time PCR System (4376357, Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Las condiciones específicas de las reacciones se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones para la reacción de qRT- PCR

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	120	1
Desnaturalización	95	15	40
Extensión	60	30	

### 5.5.2 Construcción de una curva estándar para la cuantificación de copias del genoma de RSV

Se elaboró una curva estándar empleando el DNA sintético T4 Brick (T4 Oligo, Irapuato, Guanajuato, México) diseñado con un fragmento de la secuencia del gen N de RSV: 5'-AATTCCTCA CTTTCCAGT GTAGTATTAG GCAATGCTGC TGGCCTAGGC ATAATGGGAG AGTACAGAGG TACACCGAGG AATCA -3'. La concentración del *stock* es de  $1 \times 10^9$  copias/ 5  $\mu$ L y a partir de éste se realizaron diluciones seriadas decimales hasta alcanzar una concentración de  $1 \times 10^2$  copias/ 5  $\mu$ L.

La curva estándar se construyó con diluciones seriadas decimales en rango de  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^2$  copias/ 5  $\mu$ L. Las reacciones de PCR en tiempo real se corrieron bajo las condiciones mencionadas anteriormente en el equipo StepOne™ Real-Time PCR System (4376357, Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

La curva estándar se construyó graficando el ciclo umbral (Ct) vs el número de copias. Posteriormente, se realizó una interpolación de los valores de Ct de cada hisopado nasal para calcular el número de copias de genoma de RSV.

## 5.6 Amplificación del genoma de RSV

### 5.6.1 Diseño de oligonucleótidos

Con el apoyo de la empresa T4 Oligo (Irapuato, Guanajuato, México) se diseñaron y sintetizaron 15 pares de oligonucleótidos para la amplificación del genoma completo del RSV que tiene una longitud aproximada de 15,200 nucleótidos. Para el diseño se consideraron cinco secuencias de referencia del RSV subtipo A, que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencias de referencia para el diseño de los oligonucleótidos para la amplificación de RSV- A.

Nombre	Acceso GenBank	Autores
<i>Human orthopneumovirus strain hRSV/F-, complete genome</i>	MT492012.1	Ruíz-Gómez et al., 2021
<i>Human orthopneumovirus strain hRSV/F-, complete genome</i>	MT492011.1	Ruíz-Gómez et al., 2021
<i>Human respiratory syncytial virus strain ATCC VR-26, complete</i>	AY911262.1	Lo, M.S. et al., 2005
<i>Human respiratory syncytial virus strain RSVA/Homo sapiens/MEX/59/2007, complete genome</i>	KF530268.1	Lorenzi, H. et al. (Noyola), 2013
<i>Human respiratory syncytial virus strain RSVA/Homo sapiens/USA/LA_94/2013, complete genome</i>	KM042390.1	Das, S., et al., 2014

Con cada secuencia de referencia, se realizó un alineamiento utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) contra las secuencias disponibles en su base de datos.

BLAST es una herramienta que permite buscar similitudes entre la secuencia de consulta y las secuencias presentes en la base de datos (Wheeler & Bagwat, 2007). Se obtuvieron alrededor de 5,000 resultados por cada una, teniendo un total de 25,000. Los resultados redundantes se eliminaron y se realizó un nuevo alineamiento con todas las secuencias para diseñar oligonucleótidos a partir de regiones altamente conservadas y así lograr que fueran funcionales para el mayor porcentaje de secuencias; de esta manera se incrementa el éxito de amplificación del genoma completo del RSV presente en los hisopados nasales. Los 15 pares de oligonucleótidos amplifican el genoma del virus en fragmentos de entre 700 y 1600 pb aproximadamente (ver Anexo 4), a partir del nucleótido 43 de la región promotora (“*leader*”).

### 5.6.2 Optimización de la reacción de PCR para la amplificación del genoma de RSV

La generación de los 15 amplicones se estandarizó utilizando la técnica de PCR punto final con cDNA control de MΦP. La mezcla de reacción se preparó siguiendo la composición que se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición de la mezcla de reacción para las reacciones de PCR en punto final

Reactivo	μL/ reacción
Amortiguador PCR 10X	5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1.5
dNTP (10mM)	1
Oligonucleótido <i>Forward</i> (sentido) (10 uM)	1
Oligonucleótido <i>Reverse</i> (antisentido) (10 uM)	1
Taq Pol 5 U/mL	0.4
cDNA	2
Agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC)	38.1

En las pruebas iniciales, la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos fue ajustada aproximadamente dos grados centígrados por debajo del T<sub>m</sub> proporcionado por el proveedor (ver Anexo 4). Posteriormente, se realizaron modificaciones empíricas en la temperatura hasta encontrar la temperatura óptima de alineamiento para obtener el amplicón deseado. Las condiciones empleadas para las reacciones de PCR en punto final se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones para las reacciones de PCR en punto final

Temperatura (°C)	Tiempo (min: seg)	Ciclos
95	3:00	1
95	0:30	35
T alineamiento	0:30	
72	0:40	
72	10:00	1
4	-	1

Los productos de amplificación se evaluaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %, con amortiguador TAE 1X con corrida a 100 V por una hora. Cada uno de los carriles se cargó con 2 µL de amortiguador de carga UView™ 6x Loading Dye (#1665112, Bio-Rad, Hercules, California, Estados Unidos) y 8 µL de muestra. El marcador de peso molecular *DirectLoad™ 1kb DNA Ladder* (D3937, Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) se cargó en un volumen de 5 µL y con 2 µL de buffer de carga. Los geles se observaron y fotografiaron en el fotodocumentador SmartView Pro UVCI- 1000 (Major Science, Taoyuan, Taiwan).

La especificidad de los 15 pares de oligonucleótidos se confirmó utilizando cDNA control de MΦN (macrófagos no infectados con RSV), al correr reacciones de PCR bajo las condiciones optimizadas previamente. En todas las corridas se incluyó el control negativo sin cDNA (NTC).

### 5.6.3 Diseño de PCR multiplex para amplificación del genoma de RSV

Con la finalidad de disminuir el número de reacciones de PCR para amplificar el genoma completo de RSV, se propusieron reacciones de PCR conteniendo dos o más pares de oligonucleótidos que cumplieran con las siguientes condiciones: misma temperatura de alineamiento y no generar amplicones consecutivos, pero sí amplicones con tamaños considerablemente diferentes para poder diferenciarlos en el gel de agarosa.

Las mezclas se prepararon de tal manera que los oligonucleótidos tuvieran una concentración individual de 0.2  $\mu$ M.

## 5.7 Secuenciación de amplicones mediante el sistema MinION Nanopore (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido)

### 5.7.1 Preparación de amplicones

Se realizó la amplificación del genoma de RSV en las muestras de pacientes con el protocolo previamente optimizado.

### 5.7.2 Purificación de los productos de PCR

Los amplicones se purificaron empleando el kit QIAquick PCR Purification Kit (28104, QIAGEN, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del proveedor.

### 5.7.3 Cuantificación y dilución

Se determinó la concentración de cada amplicón (cDNA) empleando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) y se diluyeron con H<sub>2</sub>O DEPC para obtener una concentración aproximada de 20 ng/ $\mu$ L para cada uno de ellos. Posteriormente, se mezclaron en proporciones iguales.

#### 5.7.4 Etiquetado de los amplicones con “barcodes” (código de barras)

La reparación de los extremos de los amplicones se realizó con el kit NEBNext Ultra II End Repair/ dA-tailing module (E7546, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Estados Unidos), en la Tabla 7 se muestra la mezcla de reacción empleada para cada muestra.

Tabla 7. Mezcla de reacción para reparación de los extremos de los amplicones

Reactivo	Volumen (μL)
Dilución de amplicones	3.3
<i>Ultra II End Prep Reaction Buffer</i>	1.2
<i>Ultra II End Prep Enzyme Mix</i>	0.5
Agua libre de nucleasas	5

La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente se incubó a 65°C por 15 minutos y finalmente se dejó en hielo por 1 minuto (se recomienda preparar al menos 12 muestras por ensayo, para obtener un rendimiento adecuado).

Para “etiquetar” los amplicones, se emplearon los “barcodes” contenidos en el kit *Native Barcoding Expansion Kit 13-24* (EXP-NBD114, Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido), los cuales se enlazaron empleando *Blunt/TA Ligase Master Mix* (M0367S, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, United States). En la Tabla 8 se muestran los componentes de la mezcla de reacción.

Tabla 8. Mezcla de reacción para adición de los barcodes a las muestras

Reactivo	Volumen (μL)
Amplicones reparados	0.75
NBXX “barcode”	1.25
<i>Blunt/ TA Ligase Master Mix</i>	5
Agua libre de nucleasas	3

Para cada una de las 12 muestras se empleó un “barcode” diferente. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente se incubó a 65°C por 10 minutos y finalmente se dejó en hielo por 1 minuto. Cabe mencionar que las diferentes muestras a secuenciar pueden tener diferentes blancos, es decir, se pueden secuenciar en la misma celda de flujo amplicones de RSV, influenza, rinovirus, etc.

Se mezclaron 10 µL de cada una de las muestras etiquetadas con “barcodes” en un tubo de 1.5 mL. Se purificaron los amplicones etiquetados empleando las perlas de captura *AMPure XP beads* (A63881, Beckman Coulter, Brea, California, Estados Unidos) en una proporción de 0.4 veces el volumen total de la mezcla. Se mezcló y se dejó incubar por 5 minutos. Posteriormente se colocó el tubo en un soporte magnético hasta que se aclarara la disolución. El sobrenadante se retiró. Se lavaron las perlas añadiendo 250 µL de *Short Fragment Buffer* (SFB) (EXP-SFB001, Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido) y se mezcló. El tubo se colocó en el soporte magnético y se eliminó el sobrenadante una vez se aclaró. El lavado se repitió una vez más.

Posteriormente se añadieron 200 µL de etanol 70% al tubo con las perlas. Se mezcló y se colocó en el soporte magnético. Se eliminó el sobrenadante en cuanto se aclaró y se dejaron secar las perlas durante 1 minuto con la tapa abierta del tubo.

Para liberar el DNA de las perlas se añadieron 30 µL de Tris pH 8.0, 10 mM. Se mezcló y se dejó incubar 2 minutos a temperatura ambiente. Se colocó en el soporte magnético y se recuperó el sobrenadante (bibliotecas) en un tubo de 1.5 mL.

#### 5.7.5 Cuantificación de las bibliotecas obtenidas con fluorómetro “Quantus” (E6150, Promega)

Para la cuantificación de las bibliotecas se empleó el kit *QuantiFluor® ONE dsDNA System* (E4870, Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos).

Se etiquetaron dos tubos de 0.5 mL como blanco y estándar. A cada uno se le añadió 200 µL de solución para teñir dsDNA (DNA de doble cadena). Al tubo etiquetado como “estándar” se le añadió 1 µL del DNA estándar del bacteriófago Lambda 400 ng/µL y se mezcló por 5 segundos. Los dos tubos se dejaron incubar por 2 minutos a temperatura ambiente. Se calibró el equipo Quantus Fluorometer (E6150, Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) con la solución blanco y el estándar preparado.



Se etiquetaron tubos de 0.5 mL para cada muestra y se les añadió 199  $\mu\text{L}$  de solución para teñir DNA a cada uno. A cada tubo se le añadió 1  $\mu\text{L}$  de muestra respectiva, se mezcló en el vórtex y se dejaron incubar por 2 minutos a temperatura ambiente.

Se leyeron las muestras en el equipo y se registraron los resultados.

### 5.7.6 Adición de los adaptadores

En la Tabla 9 se muestran los reactivos empleados para preparar la mezcla de reacción para añadir los adaptadores a los amplicones etiquetados, se preparó de la siguiente manera con el kit *NEBNext Quick Ligation Module* (E6056S, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, United States):

Tabla 9. Mezcla de reacción para adición de los adaptadores

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Bibliotecas	30
<i>NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer (5X)</i>	10
<i>Adapter Mix (AMII)</i>	5
<i>Quick T4 DNA Ligase</i>	5

Se dejó incubar por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de perlas de captura *AMPure XP beads* (Beckman Coulter, Brea, California, Estados Unidos) y se mezclaron. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, después se colocó en el soporte magnético hasta que se aclarara la solución y se descartó el sobrenadante.

Se realizó dos veces un lavado de las perlas con 250  $\mu\text{L}$  de SFB, se mezclaron las perlas, se colocaron los tubos en el soporte magnético y se descartó el sobrenadante.

Se añadieron 15  $\mu\text{L}$  de "Buffer" de Elución (EB) del kit *Sequencing Auxiliary Vials* (EXP-AUX001, Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido) y se resuspendieron las perlas. Se dejó incubar por 2 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se colocó en el soporte magnético hasta que se aclarara la solución. Las bibliotecas (sobrenadante) se transfirieron a un tubo de 1.5 mL.

Se cuantificaron las bibliotecas con el equipo *Quantus Fluorometer* (E6150, Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos).

### 5.7.7 Secuenciación MinION

Se preparó la celda de flujo R9.4.1 Flowcells (FLO-MIN106, Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido) empleando el kit “*Flowcell Priming Kit*” (EXP-FLP002, Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se realizó una dilución de la mezcla de bibliotecas empleando los reactivos del kit *Sequencing Auxiliary Vials* (EXP-AUX001, Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido) (Tabla 10).

Tabla 10. Mezcla de reacción para secuenciación

Reactivo	Volumen (µL)
Amortiguador de secuenciación	37.5
Perlas de carga	25.5
Bibliotecas	12

Nota: Se deben añadir 15 ng de DNA de las bibliotecas (12 µL) aproximadamente. En caso de que se requiera menos de 12 µL de bibliotecas, se complementa con EB.

Se mezcló por pipeteo y se añadieron 75 µL a la celda. Se conectó la celda a la computadora y se inició la secuenciación empleando el software MinKNOW (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido). El tiempo de lectura fue de 24 horas.

### 5.7.8 Alineamiento y análisis de secuencias

La secuencia consenso determinada se alineó por medio de *ClustalW* con la secuencia del RSV cepa Long ATCC VR26 (acceso GenBank AY911262) y con la secuencia de nuestro RSV persistente, con el *software Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA, versión 11.0.13, Universidad del estado de Pensilvania, Estados Unidos).

## 5.8 Análisis de expresión de citocinas

Se cuantificaron las citocinas IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12, IL13, IP10, TNF $\alpha$ , IFN $\beta$  e IFN $\gamma$  en las muestras respiratorias obtenidas de pacientes RSV del INER, empleando el kit *LEGENDplex™ Human Anti-Virus Response Panel* (740349, BioLegend, San Diego, California, Estados Unidos) y el kit *LEGENDplex™ HU Th1/Th2 Panel (8-plex) w/ VbP V02* (741030, BioLegend, San Diego, California, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor. Ambos kits se basan en un inmunoensayo de tipo sándwich en el que se emplean perlas con anticuerpos adheridos a la superficie; estos anticuerpos capturan al analito soluble. Posteriormente se añade un anticuerpo biotinilado que se une al analito en las perlas. Se añade Ficoeritrina- Estreptavidina (SA-PE) que se une a los anticuerpos biotinilados generando una señal fluorescente proporcional a la cantidad de analito, misma que se detecta en un citómetro de flujo. Se realizó una curva de calibración para cada citocina empleando el estándar proporcionado por el proveedor. Finalmente, las muestras se analizaron en el citómetro de flujo Attune con láser azul (488 nm) y rojo (637 nm) (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

Los resultados obtenidos se analizaron con el *software LEGENDplex™ Data Analysis Software Suite* (BioLegend, San Diego, California, Estados Unidos).

## VI. Resultados

### 6.1 Cuantificación de copias de RSV en hisopados nasales

#### 6.1.1 Cuantificación RNA total en hisopados nasales

En la búsqueda de la secuenciación del genoma de RSV presente en muestras clínicas, el INER nos proporcionó 36 hisopados nasales de pacientes con diagnóstico RSV (+) recolectados entre 2011- 2019, para extraer RNA total.

En cuanto se obtuvo el RNA se realizó la cuantificación y los resultados obtenidos se muestran en la gráfica de la Figura 4. En general, las muestras presentaron concentraciones entre 50 y 250 ng/μL, con excepción de la muestra B823 que presentó una alta concentración de RNA con un valor de 900 ng/μL.

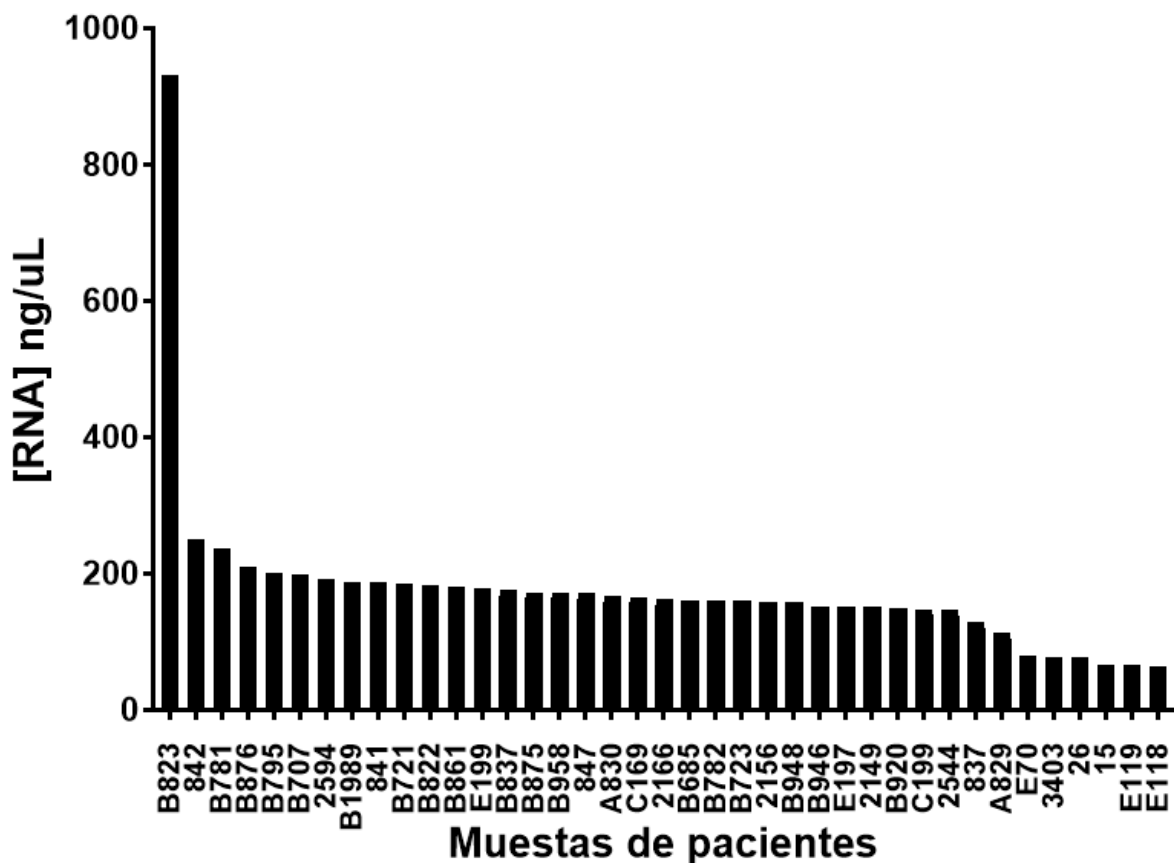


Figura 4. Concentración de RNA total. Los datos corresponden a la cuantificación por espectrofotometría del RNA extraído a partir de los hisopados nasales de pacientes RSV (+).

### 6.1.2 Construcción de la curva estándar y cuantificación absoluta de las copias del genoma del RSV por RT-PCR

Con la finalidad de cuantificar el número de copias del genoma viral presente en las muestras clínicas, se diseñó una curva estándar empleando un plásmido que contiene una secuencia conocida del gen N del RSV, en concentraciones conocidas (diluciones seriadas 1:10, de  $10^7$  a  $10^2$  copias/ 5  $\mu$ L). Mediante PCR en tiempo real y una sonda TaqMan se determinaron los valores de Ct para cada dilución del plásmido y se construyó la curva estándar que se muestra en la Figura 5.

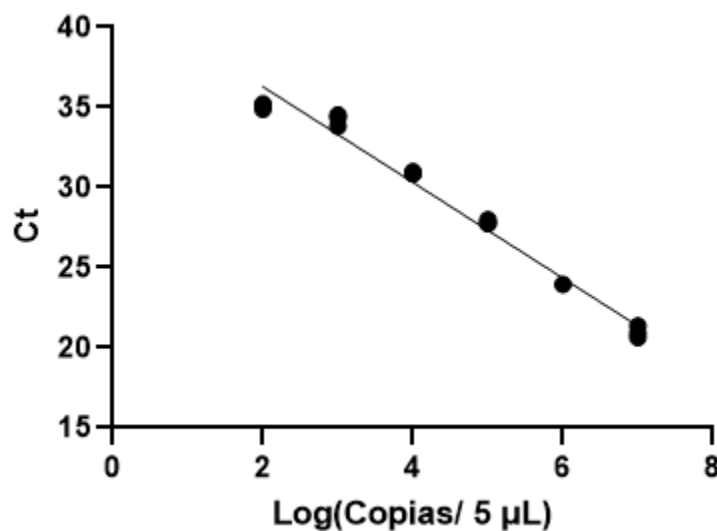


Figura 5. Curva estándar de RSV. La curva se obtuvo graficando el ciclo umbral (Ct) en función del Logaritmo base 10 del número de copias de RSV por cada 5  $\mu$ L

Como resultado de la regresión lineal, se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación 1} \quad Ct = -2.986 \text{ Log}(\text{copias} / 5 \mu\text{L}) + 42.26$$

El valor de  $R^2$  para la curva fue de 0.9782.

Para todas las muestras provenientes del INER se preparó cDNA y se procedió a realizar ensayos de PCR en tiempo real. Los Ct resultantes se interpolaron en la curva estándar para calcular el número de copias del genoma de RSV (Tabla 11). Posteriormente, se realizó una normalización para determinar el número de copias por cada 100 ng de RNA

total. Para obtener este dato se asumió que la cantidad de RNA empleada fue transformada en su totalidad a cDNA durante la transcripción inversa. Los resultados de este cálculo se muestran en la Figura 6. Se puede apreciar que la mayor cantidad de muestras presentaron números menores a 100 copias por cada 5  $\mu$ L, mientras que tres muestras superaron las 10,000 copias, de las cuales sólo una mostró una cantidad mayor a un millón de copias por cada 5  $\mu$ L.

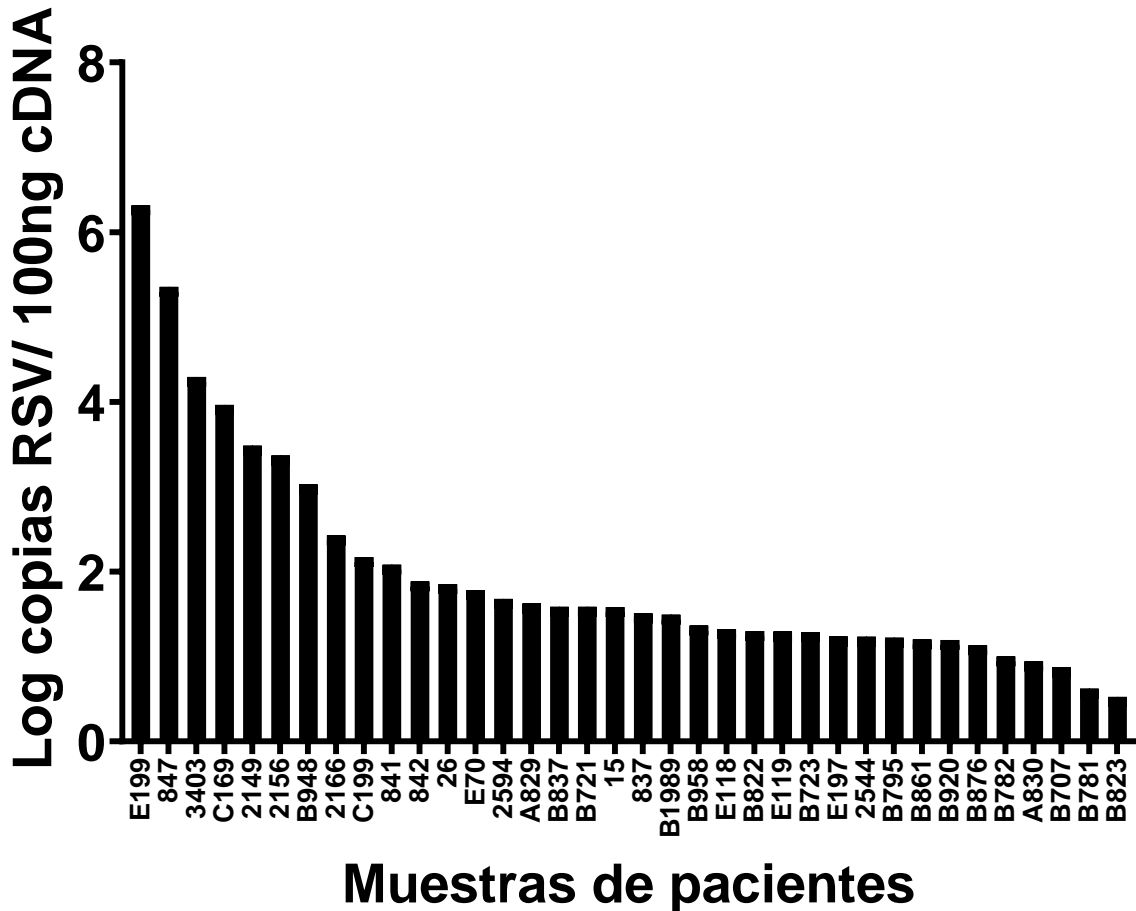


Figura 6. Normalización del número de copias del genoma de RSV por muestra. El número de copias calculado por la interpolación en la curva estándar se normalizó respecto a 100 ng de RNA total para cada muestra clínica

Tabla 11. Ct y número de copias del genoma de RSV en hisopados nasales. Valores de Ct obtenidos por RT-PCR en tiempo real y número de copias obtenido por interpolación en la curva estándar

Muestra (Clave)	Ct	Copias/ 5µL	Muestra (Clave)	Ct	Copias/ 5µL
E118	38.054	26.307	C169	28.887	30616.333
15	37.193	51.054	C199	34.403	437.660
E119	38.076	25.865	3403	28.889	30569.215
E70	36.372	96.075	A830	37.917	29.234
26	36.205	109.260	837	36.566	82.742
E199	21.768	7360200.279	841	34.364	451.004
E197	37.168	52.046	842	34.584	380.717
2544	37.222	49.926	847	24.692	774396.196
2594	35.543	181.914	B707	37.903	29.551
B685	-	-	B721	35.865	141.963
B837	35.925	135.552	B723	36.947	61.702
B861	37.044	57.261	B781	38.433	19.648
B875	-	-	B782	37.796	32.089
B920	37.309	46.691	B795	36.845	66.744
B946	-	-	B822	36.733	72.757
B948	31.765	3337.424	B823	36.94	62.036
2156	30.736	7371.545	B958	36.611	79.924
2166	33.526	859.900	B1989	36.119	116.741

## 6.2 Amplificación del genoma de RSV

### 6.2.1 Determinación de la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos

Para secuenciar el genoma de RSV presente en los hisopados nasales se diseñaron 15 pares de oligonucleótidos para generar amplicones correspondientes a segmentos genómicos que abarcan todo el genoma del virus. Los oligonucleótidos fueron probados para determinar su temperatura de alineamiento óptima para producir los amplicones en abundancia suficiente para ser observados en geles de agarosa. Este criterio es ideal para lograr una buena cobertura de secuenciación. Las pruebas se realizaron con el cDNA control obtenido de nuestro cultivo de macrófagos infectados de manera persistente con el RSV (MΦP154). Inicialmente, se probaron temperaturas de alineamiento 2 °C por debajo del T<sub>m</sub> proporcionado por el proveedor (ver Anexo 1). Posteriormente, se realizaron ajustes en las temperaturas de alineamiento de manera empírica cuando el producto de amplificación por PCR no presentaba una abundancia adecuada. Este proceso se repitió hasta optimizar la temperatura de alineamiento.

En la Figura 7 se muestra una representación gráfica de la cobertura de amplificación del genoma de RSV. La secuencia del RSV subtipo A de la cepa Long se consideró como una referencia y dicho genoma tiene una longitud de 15200 nt. En teoría, los oligonucleótidos diseñados para este estudio cubren desde el nucleótido 43 hasta el 15022 por lo que la cobertura de la amplificación es del 99.32%.



Figura 7. Cobertura de la amplificación del genoma de RSV con los oligonucleótidos diseñados. En color azul se indica la región amplificable con los oligonucleótidos que va desde el nucleótido 43 hasta el 15022, mientras que en color rojo se muestra la región no amplificable.



En la Tabla 12 se reportan las temperaturas ideales para generar 15 amplicones que abarcan prácticamente el genoma completo de RSV. En el Anexo 4 se detalla la posición del genoma de RSV en la que se une cada oligonucleótido. Se puede observar que los oligonucleótidos se diseñaron para generar amplicones consecutivos que se traslapan en una pequeña región, con el fin de lograr una buena cobertura y facilitar el ensamble de la secuencia.

Tabla 12. Temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos para la amplificación del genoma completo del RSV

Par de oligonucleótidos	Temperatura de alineamiento óptima (°C)
1/2	57
3/4	59
5/6	60
7/8	59
9/10	51
11/12	59
13/14	61
15/16	60
17/18	61
19/20	61
21/22	60
23/24	54
25/26	59
27/28	56
29/30	53

## 6.2.2 Evaluación de la especificidad de los oligonucleótidos.

La especificidad de los oligonucleótidos para amplificar el genoma viral, se evaluó mediante reacciones de PCR empleando cDNA de macrófagos no infectados por el virus de interés (macrófagos P388D<sub>1</sub> pase 28 no infectados con RSV, MΦN 28). Asimismo, se corrieron a la par reacciones con el cDNA de MΦP 154. El gel de agarosa de la Figura 8 muestra tanto los productos de amplificación obtenidos con el cDNA de MΦP 154 como los resultantes para el cDNA de MΦN 28. Se observa que no se generaron amplicones al utilizar como templado el cDNA de macrófagos no infectados, indicando que los oligonucleótidos son específicos para el genoma del RSV.

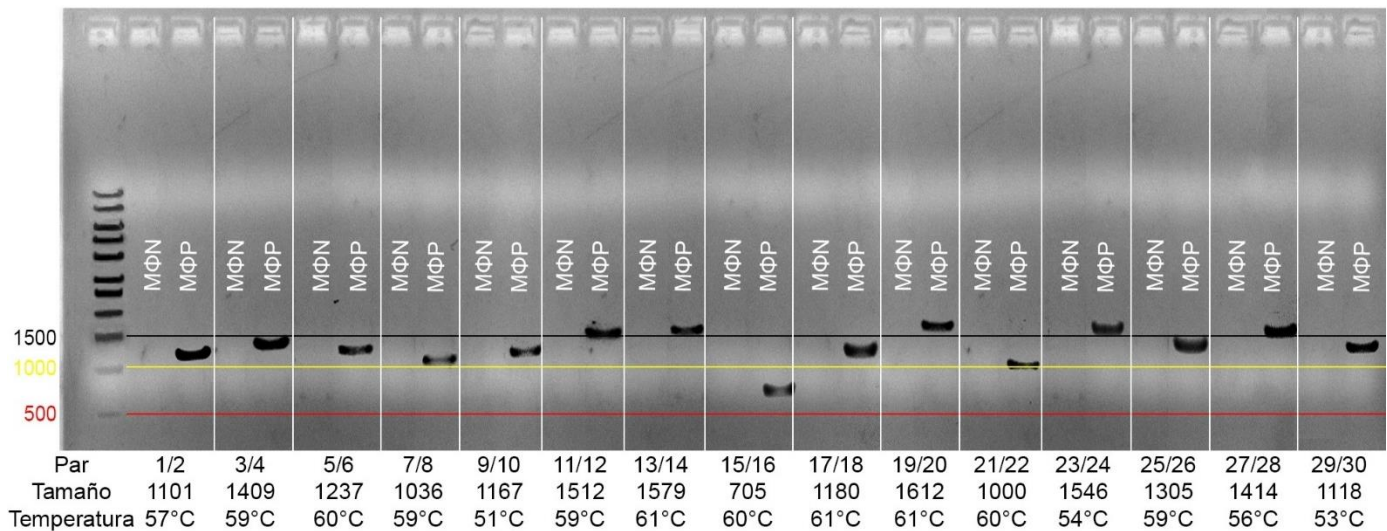


Figura 8. Amplificación del genoma de RSV contenido en el cultivo de MΦP 154. Para cada par de oligonucleótidos se muestra en los carriles con la letra “A” el producto de la reacción con cDNA de MΦN 28 mientras que en los carriles con la letra “B” se encuentra el producto de la reacción con MΦP 154. Además se indica cada par de oligonucleótidos, el tamaño de los amplicones generados y la temperatura de alineamiento determinada

### 6.2.3 Diseño del PCR múltiplex

Los 15 pares de oligonucleótidos generan los amplicones necesarios para secuenciar más del 99% del genoma de RSV. Sin embargo, se buscó reducir el número de reacciones de PCR por cada muestra, mediante el diseño de reacciones multiplex. En la Tabla 13 se muestra la propuesta inicial de mezclas (Mix) de pares de oligonucleótidos con base en dos criterios: 1) tener una temperatura de alineamiento en común y 2) dar lugar a amplicones de diferentes tamaños para poder diferenciarlos en el gel de agarosa. En la Figura 9 se observan los resultados de un ensayo en el que se obtuvieron sólo dos amplicones como producto de los Mix 1, 3, 5 y 6, aunque se esperaban tres productos con las dos primeras mezclas de oligonucleótidos. Con los Mix 2 y 4 se esperaban dos amplicones, pero la reacción generó un solo producto, por lo cual se descartaron estas mezclas como opción (Tabla 13).

Tabla 13. Prueba inicial de mezclas (*Mix*) de oligonucleótidos para el ensayo de PCR multiplex.

	Pares de oligonucleótidos	Temperatura de alineamiento (°C)
<i>Mix 1 (M1)</i>	7/8, 11/12, 25/26	59
<i>Mix 2 (M2)</i>	3/4, 21/22	59
<i>Mix 3 (M3)</i>	5/6, 15/16, 19/20	60
<i>Mix 4 (M4)</i>	23/24, 29/30	54
<i>Mix 5 (M5)</i>	1/2, 27/28	57
<i>Mix 6 (M6)</i>	13/14, 17/18	61

En el caso de las mezclas con tres pares de oligonucleótidos se eliminó el par que no generó amplicón (*Mix 1*: oligonucleótidos 11/12, *Mix 3* oligonucleótidos: 19/20) y se probaron como reacciones dúplex, en conjunto con el *Mix 6* (Figura 9B). De esta manera se confirmó la generación de dos amplicones por cada reacción, con una abundancia similar a la obtenida con las reacciones independientes.

En cuanto al Mix 5, el primer ensayo produjo los dos amplicones esperados pero con abundancia desigual. Por lo tanto, se realizaron pruebas cambiando las concentraciones de los oligonucleótidos y la temperatura de alineamiento, (Figura 9A) aunque el resultado no mejoró y se descartó esta mezcla. De esta manera, sólo se consideraron tres mezclas para los ensayos dúplex como se indica en la Tabla 14.

Tabla 14. Propuesta final de mezclas de oligonucleótidos para PCR dúplex

	Pares de oligonucleótidos	Temperatura de alineamiento (°C)
<i>Mix 1 (M1)</i>	7/8, 25/26	59
<i>Mix 3 (M3)</i>	5/6, 15/16	60
<i>Mix 6 (M6)</i>	13/14, 17/18	61

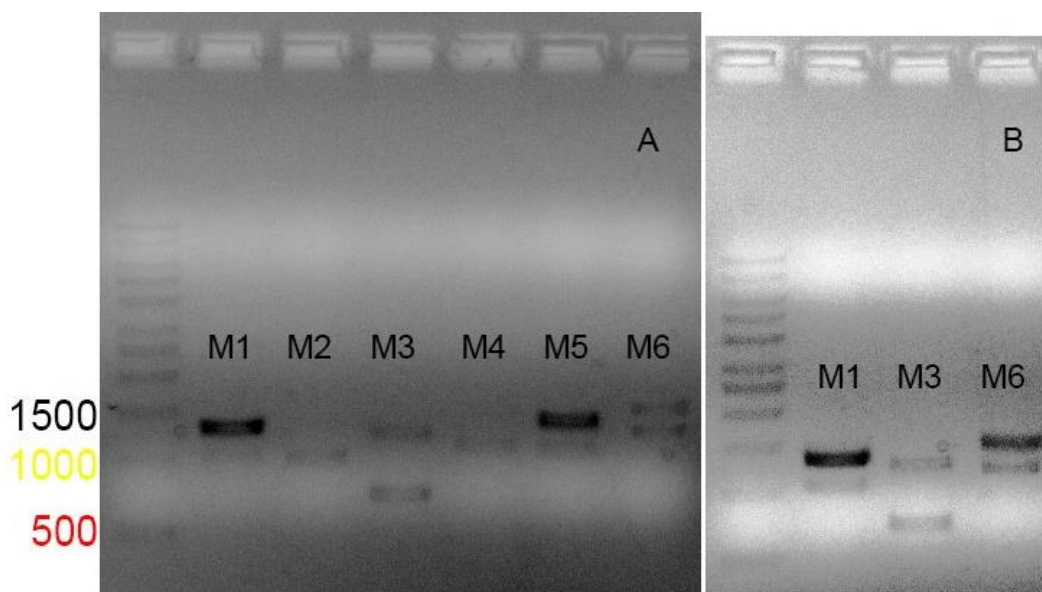


Figura 9. Amplicones resultantes del ensayo de PCR multiplex. (A) Primera propuesta de mezclas de oligonucleótidos; (B) Propuesta final de mezclas de oligonucleótidos. En la primera imagen es posible observar que con las mezclas M1, M3, M5 y M6 se obtuvieron dos amplicones y con las mezclas M2 y M4 solo uno. (B) Se muestran los productos de amplificación de las mezclas modificadas M1, M3 y M6 después de reajustar los componentes de las mezclas M1 y M3. Las mezclas M2 y M4 se descartaron debido a que solo se obtuvo uno de los dos amplicones esperados, mientras que la mezcla M5 se descartó por la gran diferencia en la abundancia de los productos obtenidos

## 6.3 Secuenciación de RSV

### 6.3.1 Amplificación del genoma de RSV

Una vez que se establecieron las condiciones adecuadas para obtener los amplicones, se procedió al procesamiento de las muestras de RNA recolectadas de los hisopados nasales. Se dio prioridad al análisis de las muestras que mostraron un valor de Ct temprano (Tabla 11), con el objetivo de obtener amplicones que fueran secuenciables utilizando el sistema MiniON Nanopore.

De todas las muestras analizadas, solamente fue posible obtener los 15 amplicones del genoma del RSV a partir de la muestra con el código E199 del INER, la cual fue obtenida de un paciente pediátrico de 12 meses sin asma y con síntomas respiratorios de un día de duración hasta la toma de la muestra (Figura 10).

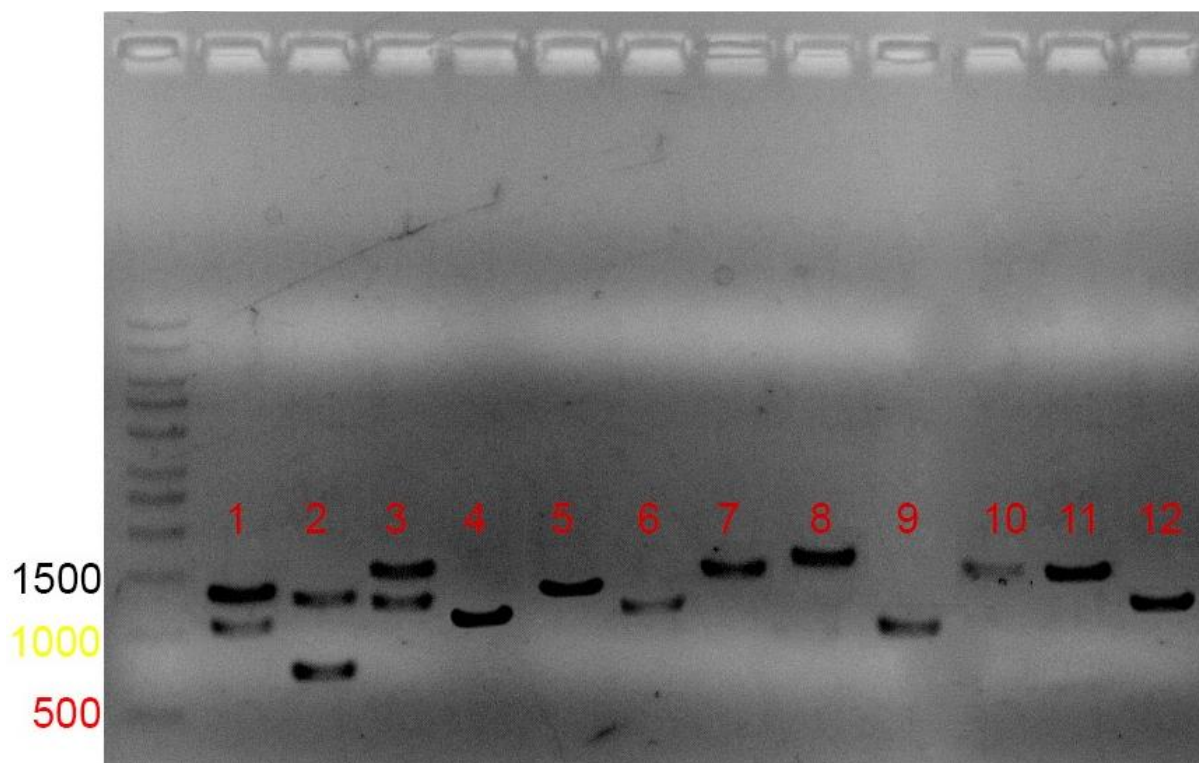


Figura 10. Amplificación del genoma de RSV contenido en la muestra E199 por medio del método previamente optimizado. En los carriles se observan los amplicones de la siguiente manera: 1: Mix 1, 2: Mix 3, 3: Mix 6, 4: 1/2, 5: 3/4, 6: 9/10, 7: 11/12, 8:19/20, 9: 21/22, 10: 23/24, 11: 27/28, 12: 29/30.

Como resultado se obtuvieron los 15 amplicones esperados de las reacciones dúplex e individuales, aunque el producto del par de oligonucleótidos 27/28 (carril 11), fue un amplicón ligeramente más grande de lo esperado, ya que en lugar de tener 1414 nt (nucleótidos) se observó con un tamaño >1500 nt.

Aun así, los amplicones de la muestra E199 se secuenciaron con una cobertura del 98.41% y profundidad 20X (Figura 11). Cuatro regiones no fueron secuenciables y están indicadas en la Figura 11 con las letras A, B, C y D. La región A corresponde a un fragmento intergénico, la B es parte del gen F mientras que la C corresponde a una fracción del gen L; la región D comprende una parte al final de la secuencia del gen L y la región no codificante final del genoma. Considerando el diseño de los pares de oligonucleótidos se esperaba que las regiones A y D no se secuenciaran, ya que el primer par de oligonucleótidos amplifica a partir del nt 43 y el último par amplifica hasta el nt 15022.

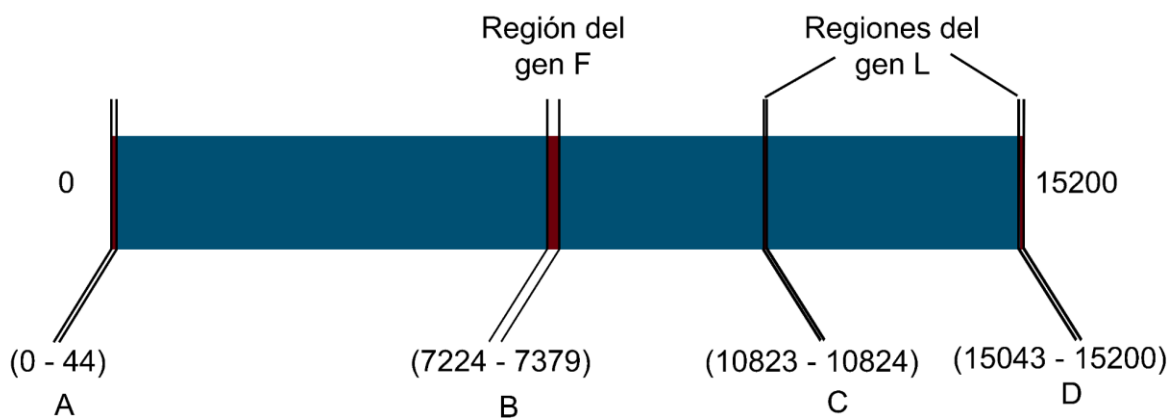


Figura 11. Cobertura de la secuenciación de la muestra E199. En color azul se indica la cobertura de la secuenciación mientras que en color rojo se indican las regiones de las cuales no se obtuvo secuencia. Cada una de estas cuatro regiones se nombró con una letra de la A-D.

### 6.3.2 Mutaciones

Se llevó a cabo un análisis de mutaciones en la secuencia del RSV aislado de la muestra E199 utilizando dos secuencias de referencia: 1) la secuencia del RSV subtipo A cepa Long (VR-26, acceso GenBank AY911262) y 2) el genoma del RSV persistente en una línea celular de macrófagos (GenBank MT492012.1). Como resultado, se identificaron un total de 777 sustituciones, de las cuales 639 ocurrieron en regiones codificantes y 138 en regiones no codificantes. El 79% de las mutaciones en las regiones codificantes fueron clasificadas como sinónimas, lo que indica que potencialmente no tienen efecto en la secuencia proteica (Figura 12).

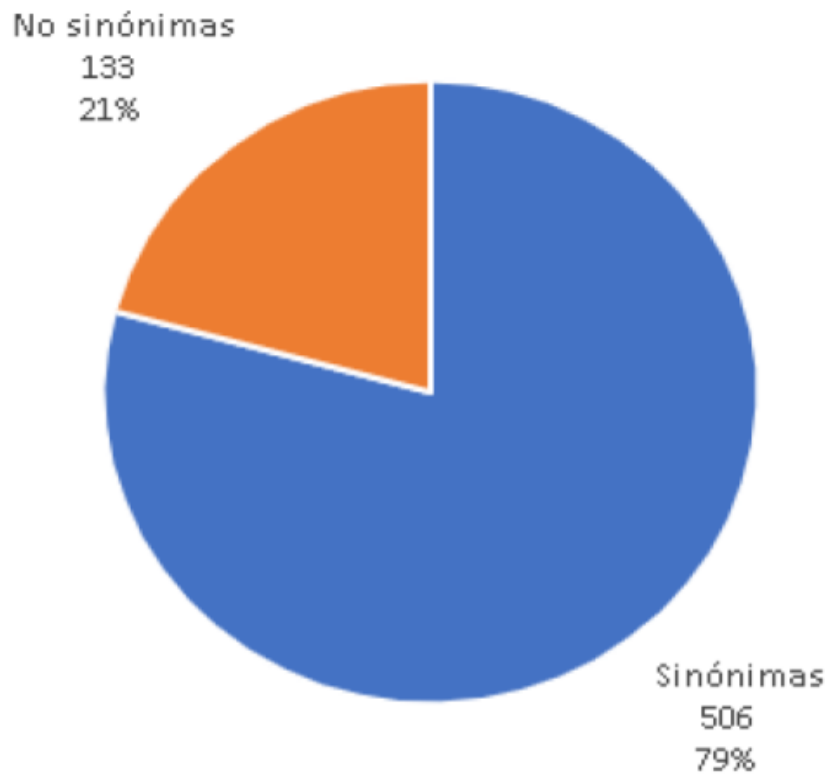


Figura 12. Cantidad de mutaciones sinónimas y no sinónimas en las secuencias codificantes de RSV aislado de la muestra E199. Se indica la cantidad total de mutaciones de cada tipo y su porcentaje.

Posteriormente, las mutaciones no sinónimas se subdividieron en mutaciones conservativas y no conservativas de acuerdo con la clasificación de los aminoácidos en seis grupos, propuesta por Zhang (2000) (Tabla 15), en la que se consideran las propiedades de polaridad y volumen, esto con el fin de estimar a grandes rasgos el impacto de la mutación en estructura proteica. Una mutación conservativa se consideró como tal si tanto el aminoácido original como el producto de la mutación pertenecían al mismo grupo. En caso contrario se le clasificó como no conservativa.

Tabla 15. Clasificación de los aminoácidos considerando polaridad y volumen propuesta por Zhang (2000)

Clasificación (grupo)	Aminoácido
Especial	C
Neutro y pequeño	A, G, P, S, T
Polar y relativamente pequeño	N, D, Q, E
Polar y relativamente grande	R, H, K
No polar y relativamente pequeño	I, L, M, V
No polar y relativamente grande	F, W, Y

De las 133 mutaciones no sinónimas, el 62% fueron de tipo no conservativas, es decir, hubo cambio en la polaridad y el volumen del nuevo aminoácido, lo que podría afectar la estructura proteica (Figura 13).



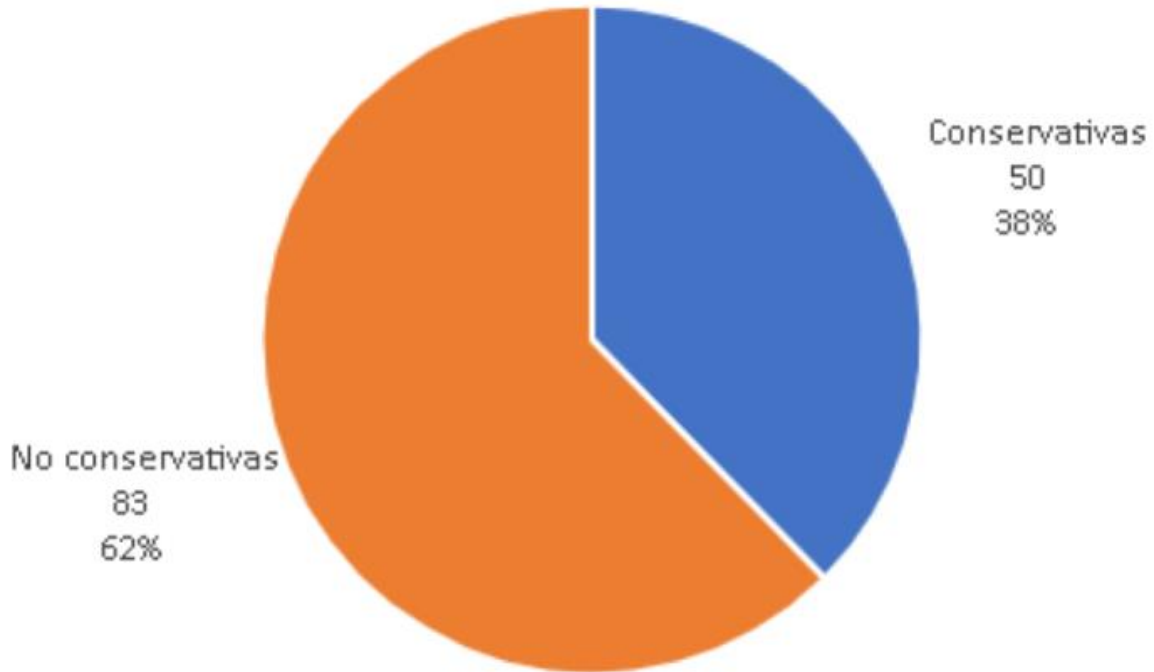


Figura 13. Cantidad de mutaciones conservativas y no conservativas en secuencias codificantes del genoma de RSV aislado de la muestra E199. Se indica la cantidad total de mutaciones de cada tipo junto y su porcentaje

La Figura 14 muestra la distribución de las 639 mutaciones en los diferentes genes del RSV; se observa que el gen L presentó el mayor número de sustituciones, seguido de los genes G y F.

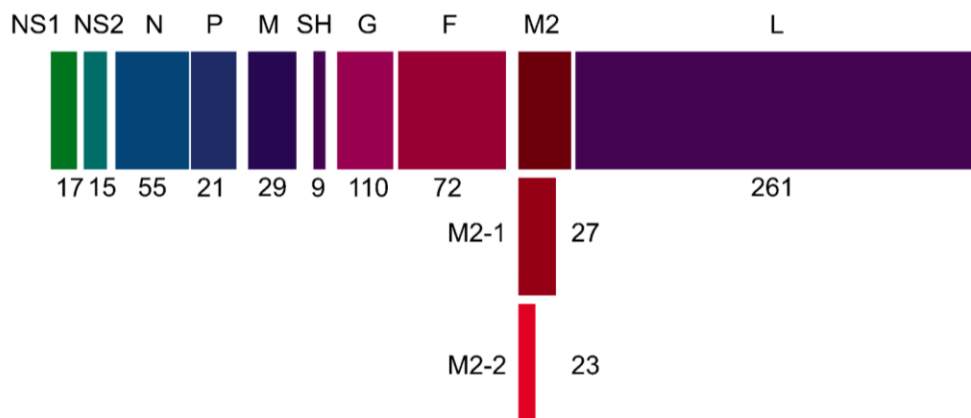


Figura 14. Distribución del total de mutaciones por gen.

En cuanto a las mutaciones sinónimas y no sinónimas, la distribución por gen se muestra en la Figura 15. El gen L a pesar de ser el que presentó más mutaciones, la mayoría resultaron ser sinónimas, por lo que se podría decir que la secuencia proteica está muy conservada considerando el tamaño del gen.

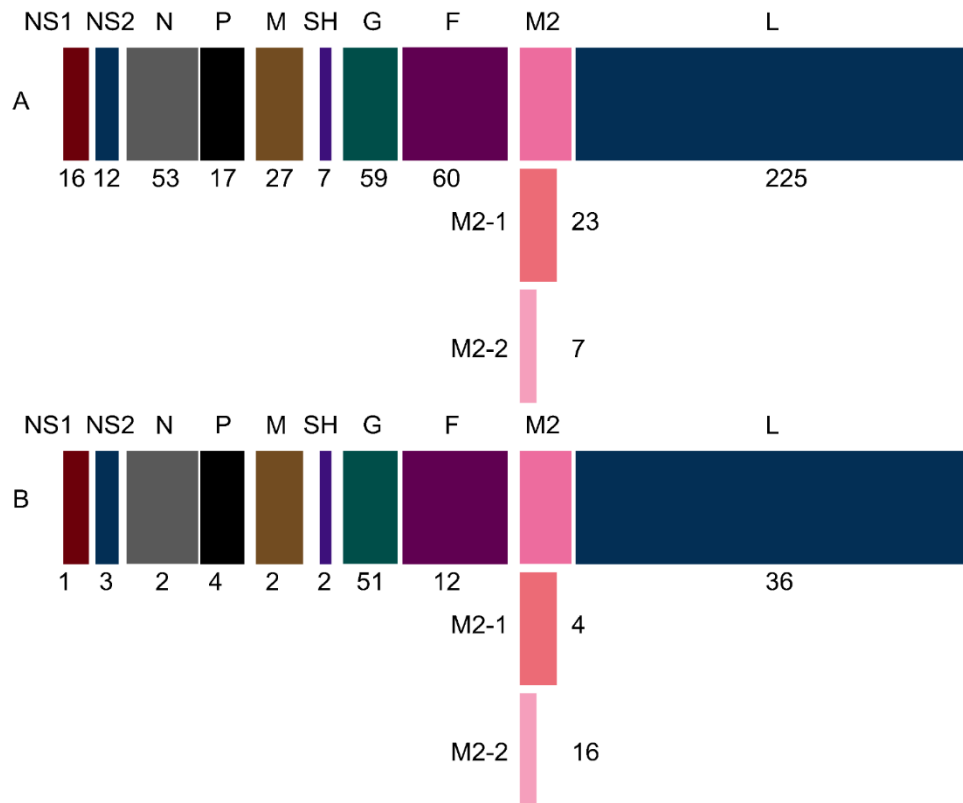


Figura 15. Distribución de mutaciones sinónimas (A) y no sinónimas (B) por gen.

En general, casi todos los genes presentaron considerablemente mayor frecuencia de mutaciones sinónimas, exceptuando el caso del gen G que tiene aproximadamente la misma proporción de ambos tipos de mutaciones y M2-2 que presentó más del doble de mutaciones no sinónimas. Se puede afirmar que estos dos genes son las secuencias menos conservadas en el genoma de RSV aislado a partir del hisopado, respecto a la secuencia de la cepa VR- 26. La gran cantidad de cambios en la secuencia del gen G era de esperarse, ya que se conoce que es una región muy variable del genoma de RSV (Muñoz-Escalante, 2019).

El gen F, pese a presentar 5 veces más mutaciones sinónimas que mutaciones no sinónimas, es el cuarto gen con más mutaciones no sinónimas en la secuencia aislada de E199, mismas que podrían alterar el fenotipo del virus.

Respecto a las mutaciones no sinónimas de tipo conservativas y no conservativas (Figura 16), se puede observar una tendencia a presentar mayor cantidad de mutaciones no conservativas en los diferentes genes, con algunas excepciones. El gen G es el que tiene una mayor cantidad de cambios no conservativos, lo que está de acuerdo con la alta variabilidad que lo caracteriza. Los genes L y M2-2 fueron los que presentaron más cambios no conservativos después del gen G.

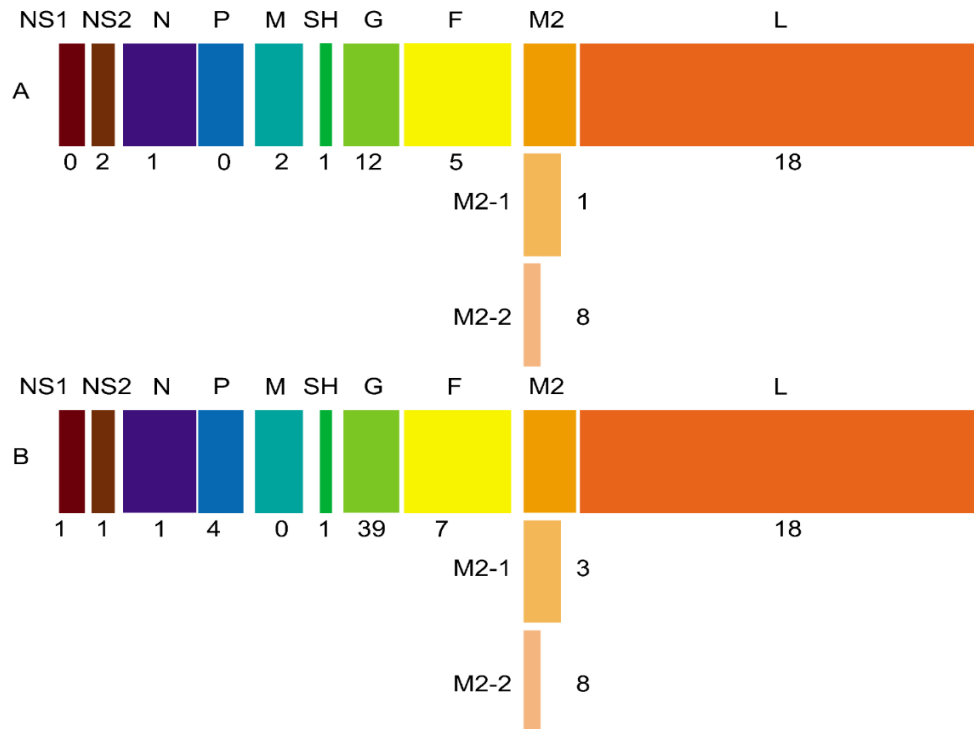


Figura 16. Distribución de mutaciones conservativas (A) y no conservativas (B) por gen. Por otro lado, para determinar si el aislado primario de la muestra E199 tiene mutaciones comunes al RSV persistente, se buscaron sustituciones en las regiones codificantes que coincidieran en la posición de ambas secuencias. (Tabla 16). Se encontraron 11 sitios equivalentes con mutaciones en ambas secuencias, aunque el cambio de nucleótido no fue idéntico en todos los casos. De las 11 mutaciones mencionadas, 5 son sinónimas y 6 no sinónimas de tipo no conservativo. Adicionalmente, en el gen G se encontró una inserción de 72 nucleótidos (24 aminoácidos) respecto a las secuencias de referencia VR- 26 y RSV persistente. En el gen M2-2 se observó una alteración en el codón de inicio cambiando a la metionina por treonina. El siguiente codón de inicio se encuentra en la posición 3 de la secuencia original de la proteína.

Tabla 16. Comparación de las mutaciones entre las secuencias de RSV persistente (P) y de la muestra E199 (E) en regiones codificantes.

Gen	Secuencia (Origen)	Sustitución en la proteína	Tipo de sustitución	Tipo de cambio
M	P	M43I	NS	C
	E			
SH	P	T38A	NS	NC
	E	T38I		
G	P	G29C	NS	NC
	E			
	P	T133I	NS	NC
	E			
	P	T441C	S	-
	E			
F	P	N80K	NS	NC
	E			
	P	T101P	NS	NC
	E			
	P	C550S	NS	NC
	E			
	P	T1179C	S	-
	E			
L	P	T951A	S	-
	E			
	P	A6396G	S	-
	E			

En la tabla se muestran las mutaciones encontradas en los mismos sitios tanto en la secuencia P como en la E respecto a la secuencia VR- 26. De igual manera se indica si la mutación fue sinónima (S) o no sinónima (NS), así como el cambio de aminoácido si fue conservativo (C) o no conservativo (NC). Para el caso de las mutaciones sinónimas, la sustitución que se indica corresponde a la secuencia genómica.

Con respecto al análisis de las regiones no codificantes, se presenta en la tabla 17 la cantidad de mutaciones encontradas en la secuencia E199 en comparación con la secuencia de referencia VR-26. En términos generales, se observa que las regiones no codificantes más extensas son aquellas que presentan un mayor número de mutaciones, específicamente las regiones M-SH, P-M y SH-G. Al considerar el número de mutaciones en relación al tamaño de las regiones no codificantes (% de mutaciones, Tabla 17), se destaca que las regiones G-F, M2-L y P-M son las que presentan mayor cantidad de mutaciones.

Tabla 17. Cantidad de mutaciones por región no codificante de la secuencia E199 en comparación con la secuencia VR- 26.

Región no codificante	Número de mutaciones	% de mutaciones
-NS1 (44- 100)	1	1.75
NS1- NS2 (519- 629)	7	6.31
NS2- N (1003- 1141)	12	8.63
N- P (2316- 2349)	3	8.82
P- M (3074- 3264)	24	12.56
M- SH (4034- 4305)	31	11.40
SH- G (4499- 4690)	22	11.46
G- F (5655-5735)	11	13.58
F- M2 (7459- 7662)	18	11.33
M2- L (8505- 8572)	9	13.24
Total	138	

Se muestran la cantidad de mutaciones por cada región no codificante del genoma de RSV en la muestra E199. Entre paréntesis se indica la ubicación de cada región.

## 6.4 Identificación y cuantificación de citocinas en muestras clínicas

La cuantificación de citocinas relevantes en procesos de infección viral y respuesta inflamatoria se llevó a cabo utilizando dos kits basados en perlas: el kit LEGENDplex™ Human Anti-Virus Response Panel (740349, BioLegend, San Diego California, Estados Unidos) y el kit LEGENDplex™ HU Th1/Th2 Panel (8-plex) w/ VbP V02 (741030, BioLegend, San Diego California, Estados Unidos), los cuales permiten detectar simultáneamente múltiples analitos de interés. Se analizaron un total de 25 de las 36 muestras clínicas disponibles utilizando este método (Tabla 1), ya que las 10 muestras restantes se agotaron durante la preparación de los amplicones.

En la Figura 17 se presentan los resultados del análisis de la expresión de citocinas comparando entre los pacientes y los controles. De las 12 citocinas evaluadas, se observa que IL6, TNF $\alpha$ , IP10, IL8 e IFN $\gamma$  mostraron una sobreexpresión significativa en el grupo de pacientes en comparación con el grupo control. Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de las demás citocinas (IL12, IFN $\beta$ , IL10, IL2, IL13, IL5 e IL4), aunque se observa una tendencia a la sobreexpresión de IFN $\beta$  e IL10, pero la diferencia entre los grupos no alcanzó significancia estadística.

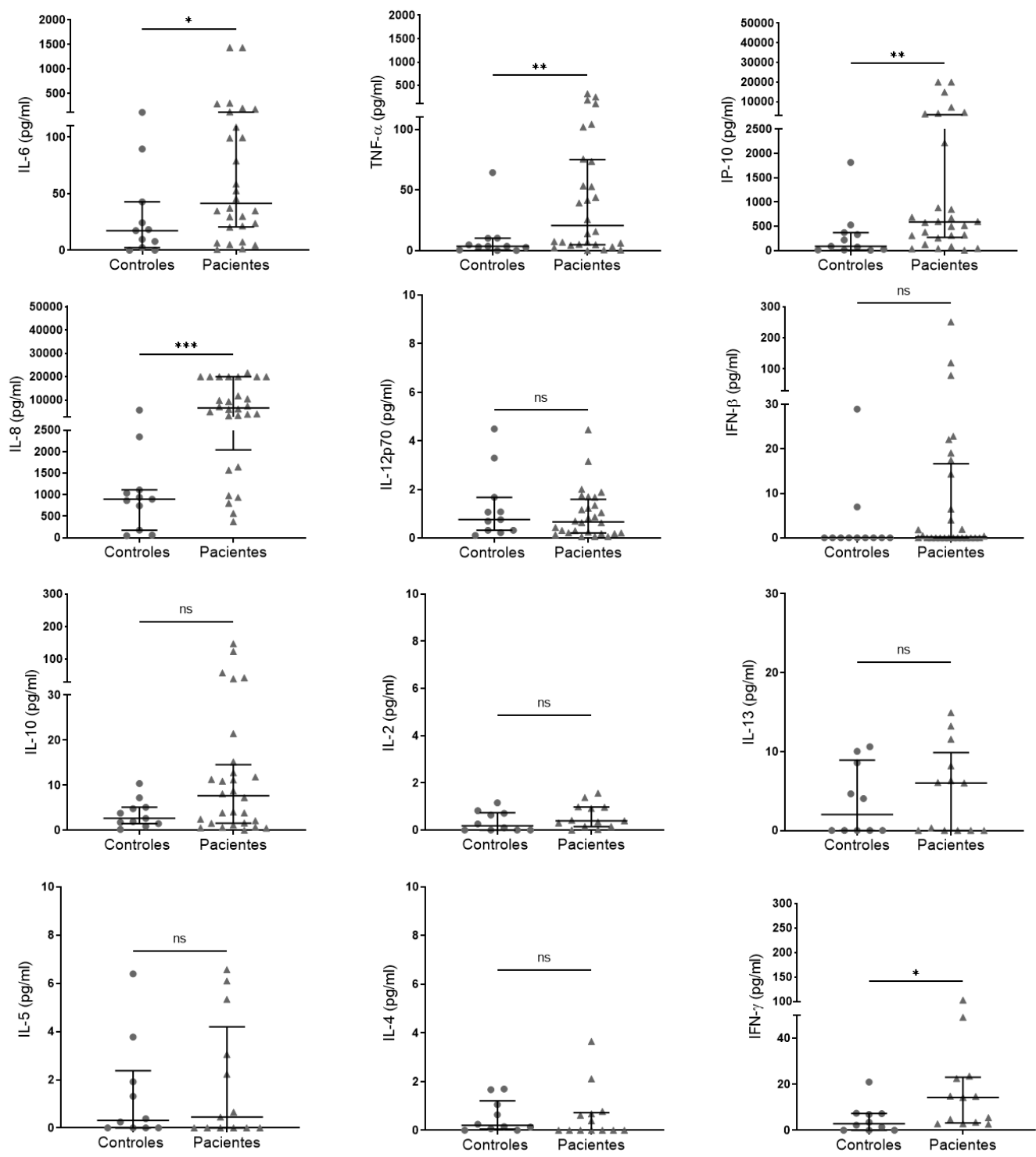


Figura 17. Comparación de concentración de las citocinas IL6, TNF $\alpha$ , IP10, IL8, IL12p70, IFN $\beta$ , IL10, IL2, IL13, IL5, IL4 e IFN $\gamma$  en muestras de controles contra pacientes. Las gráficas indican la mediana y el rango intercuartil. Las medianas se compararon mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. \*, P<0.05, \*\*, P<0.01, \*\*\*, P<0.001; ns, no significativo.

## VII. Discusión

En este trabajo se reporta un protocolo para la amplificación y secuenciación del genoma de RSV encontrado en hisopados nasales de pacientes con enfermedad respiratoria. Se propuso la amplificación del genoma por PCR con 15 pares de oligonucleótidos que cubren desde el nucleótido 43 hasta el 15022 (Figura 7), lo que corresponde al 99.32 % del genoma viral completo.

El protocolo se estandarizó utilizando material genético de RSV persistente en cultivo celular, demostrando su efectividad en la obtención de todos los amplicones esperados. Además, se comprobó su especificidad para la secuencia de RSV (Figura 8).

Una vez que se estableció el protocolo, se validó su utilidad para amplificar el genoma del RSV presente en hisopados nasales de pacientes del INER. De las 36 muestras, se amplificó únicamente el genoma del virus contenido en la muestra con el código de identificación E199; esto se pudo deber a la baja cantidad de copias del genoma viral en las muestras, siendo que solo tres de éstas superaron las diez mil copias por cada 100 ng de cDNA total (Figura 6). Cabe mencionar que la cantidad del genoma del virus se estimó evaluando un segmento del gen N, pero no determinamos la integridad del genoma completo. De esta manera, encontramos que para obtener los amplicones del genoma de RSV en muestras de pacientes con las condiciones aquí descritas, se requieren más de 1 millón de copias virales por cada 100 ng de cDNA total (Figura 6), aunque no podemos descartar que la integridad de los ácidos nucleicos se haya reducido después del tiempo de almacenamiento.

Existen otros motivos que pudieron limitar la producción o la detección de los amplicones, entre los que se encuentran el número de ciclos de amplificación en la PCR o la sensibilidad del colorante empleado para revelar los ácidos nucleicos en geles de agarosa, respectivamente. Estos factores podrían evaluarse para corregir pasos específicos del protocolo con la finalidad de optimizar la amplificación.

En un estudio previo realizado en el laboratorio para identificar las mutaciones acumuladas en el genoma del RSV que ha persistido en una línea de macrófagos por más de 150 pases (Ruiz-Gómez et al., 2021), se listaron todas las mutaciones que potencialmente se podrían asociar al fenotipo persistente del virus. Como hipótesis se propuso que el hallazgo de tales mutaciones en RSV de muestras de pacientes con



enfermedad respiratoria adquirida en la comunidad, sería un primer acercamiento a la identificación de virus que han mantenido infección crónica en humanos.

Para tener un análisis detallado, la secuencia E199 también se comparó con la secuencia de referencia que corresponde al RSV de la cepa Long subtipo A, que es el virus prototipo con el cual se estableció la infección persistente. De esta manera, se identificó una inserción característica del genotipo ON1 de RSV en la secuencia de la proteína G del virus E199, misma que fue encontrada por primera vez en Ontario, Canadá en la temporada invernal de 2010- 2011 por Eshaghi et al. El genotipo ON1 presenta una duplicación de 72 nucleótidos en el tercio C terminal del gen G resultando en un polipéptido con 24 aminoácidos adicionales. Adicionalmente, Eshaghi et al. describe que para este genotipo se encontraron cuatro sustituciones únicas en la secuencia proteica de G: E232G, T253K, N273Y y P314L. Las cuatro sustituciones se encontraron en el genoma de RSV de la muestra E199 y de manera particular, T253K y N273Y se asocian a la pérdida de sitios de N- glucosilación, lo que potencialmente altera la antigenicidad y facilita la unión de anticuerpos circulantes (Eshaghi et al., 2012).

Una de las características más importantes del cultivo de macrófagos infectados persistentemente por el RSV es la ausencia de sincicios; a partir del pase 48 dejó de ocurrir la fusión entre células (Rivera-Toledo & Gómez, 2012; Ruiz-Gómez et al., 2021). Por este motivo, resulta de gran importancia identificar las mutaciones que alteren la actividad fusogénica de la proteína F.

Al comparar el genoma de RSV de la muestra E199 con el genoma de RSV persistente que tiene 74 mutaciones con respecto al virus de la cepa *Long* subtipo A, se encontraron 11 mutaciones que coinciden en la posición de ambos genomas; 4 son cambios sinónimos y 7 cambios son no sinónimos. De los cambios sinónimos, dos se encontraron en el gen L (T951A, A6396G/T) y los otros dos en G (T441C) y F (T1179C), respectivamente. Los cambios no sinónimos se encontraron ubicados de la siguiente manera: uno en la proteína M (M43I), uno en la proteína SH (T38A/I), dos en la proteína G (G29C, T133I) y tres en la proteína F (N80K, T101P, C550S/L) (Tabla 15). De estas siete mutaciones, dos de la proteína F se han estudiado previamente: T101P y C550S (Lawlor et al., 2013; Branigan et al., 2006).

El residuo C550 es un sitio de palmitoilación que se encuentra en el dominio citoplasmático de F. La palmitoilación es una modificación postraduccional resultante de

la unión de una cadena de ácido palmítico a residuos de cisteína en una proteína, por medio de un enlace tioéster (Li et al., 2022). La palmitoilación de proteínas virales de fusión afecta su tráfico hacia balsas lipídicas, lo que puede estar relacionado con la regulación del contenido proteico de la envoltura viral (Branigan et al., 2006). En el supuesto de que el ensamblado de la envoltura se alterara por la mutación p.C550S y se generaran virus con bajo contenido de la proteína F, se podría inferir una disminución en la capacidad infecciosa del RSV, ya que es una proteína necesaria para la fusión de las membranas viral y celular (Sarmiento et al., 2009). Algo similar se ha observado en el virus de inmunodeficiencia humana (HIV-1), ya que el resultado de la remoción de los dos sitios de palmitoilación de la región citoplasmática de la proteína de envoltura gp160 fue la producción de virus con bajos niveles de esta proteína (Rousso et al., 2000). Este tipo de alteración podría ser un mecanismo asociado a la persistencia del RSV, al reducir no solo la infectividad, sino también la formación de sincicios y con ello aumentar la sobrevivencia de la célula hospedera. Sin embargo, Branigan et al. (2006) determinaron que el cambio de cisteína a serina de la posición 550 no tiene efecto en la fusión mediada por la proteína F e incluso aumentó su actividad respecto al control sin la mutación.

La mutación p.T101P en la proteína F fue estudiada previamente como parte de varias sustituciones en la subunidad F2, con el fin de determinar su efecto sobre la replicación viral (Lawlor et al., 2013). Se llevó a cabo un estudio de viabilidad utilizando dos vacunas vivas atenuadas de RSV en células Vero, en el cual se observaron diferencias en la cinética de crecimiento y el efecto citopático. Se identificaron cuatro diferencias en la secuencia proteica de ambos virus, y una de ellas fue la sustitución en la posición 101 de la proteína F (p.T101P) (Lawlor et al., 2013). Aunque en este caso no se observó que dicha mutación alterara significativamente la replicación viral ni el efecto citopático, el mismo estudio reveló que la mutación río arriba, en el residuo 66 (p.K66E), fue determinante en la alteración de la fusogenicidad y la multiplicación viral (Lawlor et al., 2013). Por otro lado, la mutación p.N80K, también ubicada en la proteína F, no ha sido descrita en la literatura y su participación en la actividad fusogénica de esta proteína no puede descartarse.

En un estudio realizado por Zhu et al. (2011) para evaluar el efecto de mutaciones en la proteína F sobre la susceptibilidad al Palivizumab, se reportaron diversas mutaciones asociadas a la susceptibilidad o resistencia al tratamiento con este anticuerpo

monoclonal. De las mutaciones listadas en este estudio, dos se encontraron en nuestra secuencia E199: p.N105S y p.N276S. Ambas mutaciones estuvieron relacionadas con mayor susceptibilidad al tratamiento con Palivizumab. Ninguna de las mutaciones del gen F del RSV persistente se encontraron en el estudio de Zhu et al. (2011). Es importante destacar que esta clase de información puede ser relevante en el entorno clínico, por lo que es de gran importancia el análisis desde distintas perspectivas de la información genómica obtenida con el fin de profundizar en el entendimiento de la patogenia de RSV. En cuanto a las mutaciones de la proteína G que son comunes para el RSV persistente y el virus de la muestra E199, se encontró la variante p.G29C en el dominio citoplasmático. Se ha documentado que esta región interacciona con la proteína M, siendo los primeros 6 aminoácidos de la región N-terminal críticos para esta unión (Ghildyal et al., 2005). A pesar de que la mutación se encuentra río abajo, podría tener repercusiones en la interacción de M con G.

La segunda mutación encontrada en la proteína G (p.T133I), se encuentra ubicada en una región tipo mucina I altamente glucosilada y variable (McLellan et al., 2013). Las implicaciones de esta mutación en la persistencia, podrían relacionarse con el cambio de afinidad de la proteína a anticuerpos neutralizantes ya sea disminuyéndola, o bien, incrementándola. En este último caso permitiría la persistencia debido a la forma secretada de G, la cual constituye un mecanismo de evasión de la respuesta inmune (Bukreyev et al., 2008).

Se ha observado que la proteína estructural M se puede encontrar en cuerpos de inclusión durante la infección tardía por RSV. Los cuerpos de inclusión son sitios de transcripción viral compuestos por las proteínas L, N, P y M2-1, en conjunción del genoma viral. Se ha demostrado que M interacciona con las otras moléculas a través de M2-1 posiblemente inhibiendo la transcripción como preámbulo a la liberación viral (Li et al., 2008). La mutación encontrada en la proteína M tanto del virus persistente como del virus E199 (p.M43I) se encuentra dentro del dominio de unión a M2-1. Aparentemente esta mutación podría no tener efecto alguno sobre la función de esta proteína, ya que se trata de un cambio de un aminoácido hidrofóbico a otro con propiedades similares (metionina por isoleucina), pero se requiere de un estudio para determinar su impacto y si tiene relación con la persistencia viral.

La mutación identificada en la proteína SH de ambas secuencias (p.T38A/I) se encuentra en el dominio transmembranal alfa helicoidal de la estructura proteica. SH es una viroporina homopentamérica con baja selectividad iónica que entre sus funciones se ha observado que es capaz de retrasar la apoptosis permitiendo la replicación del virus (Fuentes et al., 2007). En este sentido, SH podría favorecer la persistencia al permitir la sobrevivencia de las células infectadas, por lo que existe la posibilidad de que la variante T38A/I tenga alguna relación con esta función.

En cuanto a la variación de las secuencias no codificantes del RSV, varios estudios han demostrado que pueden tener un efecto en la transcripción y regulación génica (Pangesti et al., 2018). Por lo general, las secuencias que regulan el inicio de la transcripción de cada gen, conocidas como "*gene start*" en inglés (GS), se conservan (Pangesti et al., 2018). Al comparar estas secuencias entre el RSV persistente y el virus recuperado de la muestra E199, se observa conservación de las secuencias, excepto en el GS de NS1 del virus persistente, donde se produjo un cambio de citosina (C) a adenina (A) en el quinto nucleótido. Este cambio podría alterar la transcripción de este gen. Además, se observó la inserción de un nucleótido (A para RSV persistente y G para RSV de E199) dos posiciones antes del inicio de la secuencia GS de P. Aunque este cambio fue común en ambos genomas, es posible que no tenga un impacto en la expresión del gen P, ya que esta proteína actúa como cofactor para el correcto funcionamiento de la polimerasa L, la cual es indispensable para el establecimiento de la infección.

A diferencia de las regiones GS, las secuencias de término de la transcripción de cada gen, conocidas como "*gene end*" en inglés (GE), son regiones que presentan mayor variabilidad y se cree que desempeñan un papel relevante en la regulación de la expresión génica (Pangesti et al., 2018). Tanto el virus persistente como el de la muestra E199 presentaron mutaciones en la secuencia GE de SH, aunque en posiciones diferentes (A a T en el nt 13 para el virus persistente y A a T en el nt 6 para el virus de la muestra E199). Estudios previos con otros virus han demostrado que las alteraciones en las secuencias GE pueden modificar la transcripción. Por ejemplo, se ha observado que una inserción de 8 nt en la secuencia GE del gen M del virus de parainfluenza disminuyó la eficiencia de la terminación transcripcional (Kuo et al., 1996). Además, se ha documentado que una mutación puntual en la secuencia GE del gen F del virus de la

parotiditis puede generar un solo transcrito junto con el gen siguiente corriente abajo (Kuo et al., 1996).

En resumen, las mutaciones que se encontraron en ambas secuencias del RSV pueden ser relevantes en el contexto de la persistencia viral. Sin embargo, se requiere una investigación más profunda para determinar su importancia. En el caso específico de las mutaciones T101P y C550 S/L en la proteína F, los efectos observados en la actividad de la proteína no parecen estar relacionados con la inhibición de la fusión de membranas. Por lo tanto, es posible que su presencia en el RSV persistente no esté asociada con el establecimiento o mantenimiento de la persistencia del virus en el cultivo celular. Esta observación se refuerza con la información clínica, ya que se trata de un paciente de 1 año de edad que posiblemente esté experimentando su primera infección por RSV y que además se encontraba en el primer día de inicio de los síntomas (Tabla 1).

La respuesta inmune contra el RSV en el cultivo de macrófagos infectados de manera persistente se caracterizó por la sobreexpresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias como IL6, IFN $\beta$ , CCL3, IP10, RANTES e IL8 y ausencia de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  (Rivera-Toledo & Gómez, 2012). De igual manera, los hisopados nasales mostraron incremento significativo de IL6, IP10 e IL8, así como TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  (Figura 17). La presencia de estas dos últimas citocinas en los hisopados nasales sugieren que tienen un papel importante en el control de la replicación del virus durante la infección aguda, por lo que su ausencia podría ser indicadora de una infección de tipo persistente tal como lo observamos en M $\Phi$ P. En este sentido, las muestras con bajas o nulas cantidades de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  podrían ser útiles para la búsqueda de mutaciones asociados a la persistencia del RSV.

## VIII. Conclusiones

- Como resultado de este trabajo se estableció un protocolo para la cuantificación, amplificación y secuenciación del genoma del RSV a partir de hisopados nasales de pacientes con enfermedad respiratoria. Este protocolo es específico para el subtipo A del RSV y tiene el potencial de amplificar diferentes genotipos.
- Once mutaciones de la muestra E199 coincidieron con las mutaciones del virus persistente, pero se requiere de su caracterización para asociarlas con el establecimiento y mantenimiento de la persistencia
- La secuenciación de un mayor número de genomas de RSV permitirá realizar un análisis estadístico para determinar la utilidad de las mutaciones como marcadores de la infección persistente
- La baja carga viral es una limitante para amplificar y secuenciar el genoma completo
- La enfermedad respiratoria por RSV se asocia con una sobreexpresión significativa de citocinas proinflamatorias, incluyendo IL6, TNF $\alpha$ , IP10, IL8 e IFN $\gamma$ ; además de una tendencia a la sobreexpresión de IFN $\beta$  e IL10
- Durante la infección persistente por RSV no se encontraron las citocinas TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  a diferencia de lo observado en los hisopados nasales; por lo tanto, ambas citocinas podrían usarse para distinguir entre infección aguda y persistente

## IX. Perspectivas

- Posterior a la realización del trabajo experimental descrito aquí, se ha dado continuidad a la amplificación del genoma de RSV a partir de hisopados nasales de pacientes infectados durante el brote 2022–2023. Se han realizado algunas modificaciones en el protocolo que consisten en el aumento del número de ciclos de amplificación en la PCR (de 35 a 40) y en el cambio del colorante para ácidos nucleicos “DNA UView 6x Loading Dye” (#1665112, Bio-Rad, Hercules, California, Estados Unidos) por el “GelRed” (41001 - 41003-T, Biotium, Fremont, California, Estados Unidos), ya que este último presenta mayor sensibilidad para la detección de los amplicones. Con estos cambios se ha logrado obtener amplicones de hisopados que presentan  $Ct \leq 30$  en PCR cuantitativo.
- Con el fin de determinar el impacto de las mutaciones descritas sobre la capacidad del RSV para establecer persistencia, se sugiere emplear modelos computacionales para analizar posibles cambios estructurales de las proteínas mutantes en comparación con las proteínas no mutadas. También se podrían realizar ensayos de genética reversa para evaluar el efecto de las mutaciones de interés en el ciclo de infección del virus.
- Se propone optimizar el método de amplificación del genoma del RSV mediante el diseño de PCR múltiplex, con el objetivo de reducir el número de reacciones necesarias para generar los 15 amplicones. Esto permitirá disminuir el consumo de reactivos y el tiempo necesario para el procesamiento de las muestras.

## X. Bibliografía

1. Beltra, J.-C., & Decaluwe, H. (2016). Cytokines and persistent viral infections. *Cytokine*, 82, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.02.006>
2. Bergeron, H., & Tripp, R. (2021). Immunopathology of RSV: An Updated Review. *Viruses*, 13(12), 2478. doi: 10.3390/v13122478
3. Bergeron, H. C., & Tripp, R. A. (2020). Emerging small and large molecule therapeutics for respiratory syncytial virus. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 29(3), 285–294. <https://doi.org/10.1080/13543784.2020.1735349>
4. Boldogh, I. (1996). *Persistent viral infections*. Medical Microbiology - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8538/>
5. Borchers, A., Chang, C., Gershwin, M., & Gershwin, L. (2013). Respiratory Syncytial Virus—A Comprehensive Review. *Clinical Reviews In Allergy & Immunology*, 45(3), 331-379. doi: 10.1007/s12016-013-8368-9
6. Bukreyev, A., Yang, L., Fricke, J., Cheng, L., Ward, J. M., Murphy, B. R., & Collins, P. L. (2008). The secreted form of respiratory syncytial virus G glycoprotein helps the virus evade antibody-mediated restriction of replication by acting as an antigen decoy and through effects on fc receptor-bearing leukocytes. *Journal of Virology*, 82(24), 12191–12204. <https://doi.org/10.1128/jvi.01604-08>
7. Branigan, P. J., Day, N. D., Liu, C., Gutshall, L. L., Melero, J. A., Sarisky, R. T., & Vecchio, A. M. (2006). The cytoplasmic domain of the F protein of human respiratory syncytial virus is not required for cell fusion. *Journal of General Virology*, 87(2), 395–398. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81481-0>
8. Bueno, S., González, P., Riedel, C., Carreño, L., Vásquez, A., & Kalergis, A. (2011). Local cytokine response upon respiratory syncytial virus infection. *Immunology Letters*, 136(2), 122-129. doi: 10.1016/j.imlet.2010.12.003
9. Cao, D., Gao, Y., & Liang, B. (2021). Structural Insights into the Respiratory Syncytial Virus RNA Synthesis Complexes. *Viruses*, 13(5), 834. <https://doi.org/10.3390/v13050834>



10. Chen, J., Qiu, X., Avadhanula, V., Shepard, S. S., Kim, D. K., Hixson, J., Piedra, P. A., & Bahl, J. (2021). Novel and extendable genotyping system for human respiratory syncytial virus based on whole-genome sequence analysis. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 16(3), 492–500. <https://doi.org/10.1111/irv.12936>
11. Cui, G., Zhu, R., Qian, Y., Deng, J., Zhao, L., Sun, Y., & Wang, F. (2013). Genetic Variation in Attachment Glycoprotein Genes of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroups A and B in Children in Recent Five Consecutive Years. *PLOS ONE*, 8(9), e75020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075020>
12. Driscoll, A., Arshad, S., Bont, L., Brunwasser, S., Cherian, T., & Englund, J. et al. (2020). Does respiratory syncytial virus lower respiratory illness in early life cause recurrent wheeze of early childhood and asthma? Critical review of the evidence and guidance for future studies from a World Health Organization-sponsored meeting. *Vaccine*, 38(11), 2435-2448. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.01.020
13. Eshaghi A, Duvvuri VR, Lai R, Nadarajah JT, Li A, et al. (2012) Genetic Variability of Human Respiratory Syncytial Virus A Strains Circulating in Ontario: A Novel Genotype with a 72 Nucleotide G Gene Duplication. *PLoS ONE* 7(3): e32807. doi:10.1371/journal.pone.0032807
14. Estripeaut, D., Torres, J. P., Somers, C., Tagliabue, C., Khokhar, S., Bhoj, V., Grube, S. M., Wozniakowski, A., Gomez, A. R. C., Ramilo, O., Jafri, H. S., & Mejias, A. (2008). Respiratory Syncytial Virus Persistence in the Lungs Correlates with Airway Hyperreactivity in the Mouse Model. *The Journal of Infectious Diseases*, 198(10), 1435–1443. <https://doi.org/10.1086/592714>
15. Fuentes, S., Tran, K. P., Luthra, P., Teng, M. M. H., & He, B. (2007). Function of the Respiratory Syncytial Virus Small Hydrophobic Protein. *Journal of Virology*, 81(15), 8361–8366. <https://doi.org/10.1128/jvi.02717-06>
16. Grieves JL, Jurcisek JA, Quist B, Durbin RK, Peeples ME, Durbin JE, Bakaletz LO. (2010). *Mapping the Anatomy of Respiratory Syncytial Virus Infection of the Upper Airways in Chinchillas (Chinchilla lanigera)*. PubMed Central (PMC). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2890398/>

17. Griffiths, C., Drews, S., & Marchant, D. (2017). Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(1), 277-319. doi: 10.1128/cmr.00010-16
18. Ghildyal, R., Li, D., Peroulis, I., Shields, B., Bardin, P. G., Teng, M. N., Collins, P. L., Meanger, J., & Mills, J. (2005). Interaction between the respiratory syncytial virus G glycoprotein cytoplasmic domain and the matrix protein. *Journal of General Virology*, 86(7), 1879–1884. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80829-0>
19. Ha, L. A., DO, Wilm, A., Van Doorn, H. R., Lam, H., Sim, S., Sukumaran, R., Tran, A. T., Nguyen, B. K., Tran, T. H., Tran, Q. T., Vo, Q. B., Dac, N. T., Trinh, H. S., Nguyen, T. H. O., Binh, B. T. L., Le, K. C., Nguyen, M. L., Thai, Q. T., Vo, T., . . . Hibberd, M. L. (2015). Direct whole-genome deep-sequencing of human respiratory syncytial virus A and B from Vietnamese children identifies distinct patterns of inter- and intra-host evolution. *Journal of General Virology*, 96(12), 3470–3483. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000298>
20. Hause, A. M., Henke, D. M., Avadhanula, V., Shaw, C. A., Tapia, L. I., & Piedra, P. A. (2017). Sequence variability of the respiratory syncytial virus (RSV) fusion gene among contemporary and historical genotypes of RSV/A and RSV/B. *PLOS ONE*, 12(4), e0175792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175792>
21. Jung, H. E., Kim, T. Y., & Lee, H. (2020). Contribution of Dendritic Cells in Protective Immunity against Respiratory Syncytial Virus Infection. *Viruses*, 12(1), 102. <https://doi.org/10.3390/v12010102>
22. Kane, M., & Golovkina, T. (2010). Common Threads in Persistent Viral Infections. *Journal Of Virology*, 84(9), 4116-4123. doi: 10.1128/jvi.01905-09
23. Kuo, L., Grosfeld, H., Cristina, J., Hill, M., & Collins, P. (1996). Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. *Journal of Virology*, 70(10), 6892–6901. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.10.6892-6901.1996>
24. Lawlor, H. A., Schickli, J. H., & Tang, R. S. (2013). A single amino acid in the F2 subunit of respiratory syncytial virus fusion protein alters growth and fusogenicity.

*Journal of General Virology*, 94(12), 2627–2635.  
<https://doi.org/10.1099/vir.0.055368-0>

25. Li, D., Jans, D. A., Bardin, P. G., Meanger, J., Mills, J., & Ghildyal, R. (2008). Association of respiratory syncytial virus M protein with viral nucleocapsids is mediated by the M2-1 protein. *Journal of Virology*, 82(17), 8863–8870. <https://doi.org/10.1128/jvi.00343-08>
26. Li, X., Shen, L., Xu, Z., Liu, W., Li, A., & Xu, J. (2022). Protein palmitoylation modification during viral infection and detection methods of palmitoylated proteins. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.821596>
27. Liu, Y., Haas, D. L., Poore, S., Isakovic, S., Gahan, M., Mahalingam, S., Fu, Z. F., & Tripp, R. A. (2009). Human metapneumovirus establishes persistent infection in the lungs of mice and is reactivated by glucocorticoid treatment. *Journal of Virology*, 83(13), 6837–6848. <https://doi.org/10.1128/jvi.00379-09>
28. McLellan, J. S., Ray, W. C., & Peeples, M. E. (2013). Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 83–104. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1_4)
29. Mikhail, I., & Grayson, M. (2019). Asthma and viral infections. *Annals Of Allergy, Asthma & Immunology*, 123(4), 352-358. doi: 10.1016/j.anai.2019.06.020
30. Muñoz-Escalante, J. C., Comas-García, A., Bernal-Silva, S., Robles-Espinoza, C. D., Gómez-Leal, G., & Noyola, D. E. (2019). Respiratory syncytial virus A genotype classification based on systematic intergenotypic and intragenotypic sequence analysis. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56552-2>
31. Nicholson, E. G., & Munoz, F. M. (2018). A review of therapeutics in clinical development for respiratory syncytial virus and influenza in children. *Clinical Therapeutics*, 40(8), 1268–1281. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2018.06.014>
32. Pandya, M., Callahan, S., Savchenko, K., & Stobart, C. (2019). A contemporary view of respiratory syncytial virus (RSV) biology and strain-specific differences. *Pathogens*, 8(2), 67. <https://doi.org/10.3390/pathogens8020067>

33. Pangesti, K. N. A., Ghany, M. a. E., Walsh, M., Kesson, A. M., & Hill-Cawthorne, G. A. (2018). Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Reviews in Medical Virology*, 28(2), e1968. <https://doi.org/10.1002/rmv.1968>
34. Piedimonte, G., & Perez, M. K. (2014). Alternative mechanisms for respiratory syncytial virus (RSV) infection and persistence: Could RSV be transmitted through the placenta and persist into developing fetal lungs? *Current Opinion in Pharmacology*, 16, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.03.008>
35. Piedimonte, G. (2013). Respiratory syncytial virus and asthma. *Current Opinion in Pediatrics*, 25(3), 344–349. <https://doi.org/10.1097/mop.0b013e328360bd2e>
36. Prakash, Y. S., & Martin, R. M. (2014). Brain-derived neurotrophic factor in the airways. *Pharmacology & Therapeutics*, 143(1), 74–86. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.02.006>
37. Proença-Módena, J. L., Valera, F. C. P., Jacob, M. G., Buzatto, G. P., Saturno, T. H., Lopes, L. M., Souza, J. M., Paula, F. M., Silva, M. M., Carezzi, L. R., Tamashiro, E., Arruda, E., & Anselmo-Lima, W. T. (2012). High Rates of Detection of Respiratory Viruses in Tonsillar Tissues from Children with Chronic Adenotonsillar Disease. *PLOS ONE*, 7(8), e42136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042136>
38. Rey-Jurado, E., & Kalergis, A. M. (2017). Immunological Features of Respiratory Syncytial Virus-Caused Pneumonia—Implications for Vaccine Design. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 556. <https://doi.org/10.3390/ijms18030556>
39. Rivera-Toledo, E., & Gómez, B. (2012). Respiratory syncytial virus persistence in macrophages alters the profile of cellular gene expression. *Viruses*, 4(12), 3270–3280. <https://doi.org/10.3390/v4123270>
40. Rousso, I., Mixon, M. B., Chen, B. K., & Kim, P. S. (2000). Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13523–13525. <https://doi.org/10.1073/pnas.240459697>

41. Ruiz-Gómez, X., Vázquez-Pérez, J., Flores-Herrera, O., Esparza-Perusquía, M., Santiago-Olivares, C., & Gaona-Bernal, J. et al. (2021). Steady-state persistence of respiratory syncytial virus in a macrophage-like cell line and sequence analysis of the persistent viral genome. *Virus Research*, 297, 198367. doi: 10.1016/j.virusres.2021.198367
42. Santiago-Olivares, C., Martínez-Alvarado, E., & Rivera-Toledo, E. (2023). Persistence of RNA Viruses in the Respiratory Tract: An Overview. *Viral Immunology*, 36(1), 3–12. <https://doi.org/10.1089/vim.2022.0135>
43. Sarmiento, R. E., Tirado, R., & Gómez, B. (2002). Characteristics of a respiratory syncytial virus persistently infected macrophage-like culture. *Virus research*, 84(1), 45- 5
44. Schmidt, M. E., & Varga, S. M. (2017). Modulation of the host immune response by respiratory syncytial virus proteins. *Journal of Microbiology*, 55(3), 161–171. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-7045-8>
45. Shang, Z., Tan, S., & Ma, D. (2021). Respiratory syncytial virus: from pathogenesis to potential therapeutic strategies. *International Journal Of Biological Sciences*, 17(14), 4073-4091. doi: 10.7150/ijbs.64762
46. Staadegaard, L., Caini, S., Wangchuk, S., Thapa, B., De Almeida, W. a. F., De Carvalho, F. C., Fasce, R., Bustos, P., Kyncl, J., Nováková, L., Bruno, A., De Mora Coloma, D. J., Meijer, A., Hooiveld, M., Huang, Q. S., Wood, T., Guiomar, R., Rodrigues, A. P., Lee, V. J. M., . . . Paget, J. (2021). Defining the seasonality of respiratory syncytial virus around the world: National and subnational surveillance data from 12 countries. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 15(6), 732–741. <https://doi.org/10.1111/irv.12885>
47. Van Deuren, M., Dofferhoff, A., & Van Der Meer, J. (1992). Cytokines and the response to infection. *The Journal of Pathology*, 168(4), 349–356. <https://doi.org/10.1002/path.1711680403>
48. Vorobjeva, N., & Chernyak, B. V. (2020). NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biokhimiya*, 85(10), 1178–1190. <https://doi.org/10.1134/s0006297920100065>

49. Wheeler, D., & Bhagwat, M. (2007). BLAST QuickStart: Example-Driven Web-Based BLAST Tutorial. En N.H. Bergman (Ed.), *Comparative Genomics: Volumes 1 and 2* (pp. Capítulo 9). Totowa, NJ: Humana Press. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1734/>
50. Wong-Chew, R. M., García-León, M. L., Noyola, D. E., Gonzalez, L. F., Meza, J., Vilaseñor-Sierra, A., Martínez-Aguilar, G., Rivera-Nuñez, V. H., Newton-Sánchez, O., Firo-Reyes, V., Del Río-Almendarez, C. N., Gonzalez-Rodriguez, A. P., Ortiz-García, E. R., S, N., Soria-Rodríguez, C. G., Carrasco-Castillo, A., Sánchez-Medina, E., López-Martínez, I., Hernández-Andrade, T., . . . Santos-Preciado, J. I. (2017). Respiratory viruses detected in Mexican children younger than 5 years old with community-acquired pneumonia: a national multicenter study. *International Journal of Infectious Diseases*, *62*, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.06.020>
51. Zhang, J. (2000). Rates of conservative and radical nonsynonymous nucleotide substitutions in mammalian nuclear genes. *Journal of Molecular Evolution*, *50*(1), 56–68. <https://doi.org/10.1007/s002399910007>
52. Zhu, Q., Patel, N. K., McAuliffe, J. M., Zhu, W., Wachter, L., McCarthy, M. P., & Suzich, J. A. A. (2011). Natural polymorphisms and resistance-associated mutations in the fusion protein of respiratory syncytial virus (RSV): Effects on RSV susceptibility to palivizumab. *The Journal of Infectious Diseases*, *205*(4), 635–638. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir790>
53. Zhu, C., Fu, S., Zhou, X., & Yu, L. (2017). Complete Genome Sequence of Human Respiratory Syncytial Virus from Lanzhou, China. *Genome Announcements*, *5*(34). <https://doi.org/10.1128/genomea.00739-17>

## Anexo 1. Mutaciones encontradas en el genoma de RSV persistente (Ruíz-Gómez et al., 2021)

Localización genómica	Posición del nucleótido	Secuencia de referencia	Secuencia de RSV persistente
Región Leader y primer GS	4	C	G
	12	T	A
	27	T	A
	38	A	T
	39	-	A
	50	C	A
NS1	160	G	A
	344	T	C
	371	A	G
	466	A	T
NS2	896	A	G
N	1 318	A	G
	1 347	T	C
	1 407	T	A
	1 948	A	G
	2 040	C	T
Región no codificante N-P	2 329	-	A
	2 342	A	G
P	2 503	A	G
	2 570	A	G
	2 693	T	C
	2 722	T	C
M	3 391	G	T
	3 406	T	A
	3 496	T	C
	3 660	C	T
3 838	A	G	
Región no codificante M-SH	4 291	A	G
SH	4 330	A	G
	4 415	A	G
Región no codificante SH-G	4 629	A	T
	4 661	T	C
G	4 705	A	T
	4 773	G	T
	4 837	T	C
	5 026	C	T
	5 086	C	T
	5 129	T	C

Localización genómica	Posición del nucleótido	Secuencia de referencia	Secuencia de RSV persistente
G	5 253	A	G
	5 570	C	A
	5 591	A	T
	5 596	A	C
Región no codificante G-F	5 863	A	C
	5 898	A	G
	5 901	C	A
	5 962	A	C
	6 037	A	G
	6 116	T	C
	6 156	C	T
	6 535	A	G
	6 628	A	T
	6 832	T	C
	6 840	T	C
	7 151	A	C
	7 204	C	A
	7 237	A	C
	7 309	T	A
Región no codificante F-M2	7 436	T	C
	7 587	A	-
M2-1	7 915	A	G
	7 938	C	A
L	8 893	G	A
	9 448	T	A
	9 541	A	G
	9 610	T	A
	9 619	T	C
	9 731	G	A
	9 898	T	C
	10 324	C	T
	10 675	A	G
	10 717	C	T
	11 074	G	A
	11 832	A	G
	11 867	G	A
	12 577	T	C
	12 646	A	T
14 041	T	C	

# Anexo 2. Constancia informativa de uso de muestras respiratorias



Dirección de Investigación  
Subdirección de Investigación Clínica  
Depto. de Investigación en Tabaquismo y EPOC

Ciudad de México, 26 de octubre del 2020

## COMISIONES DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA FACULTAD DE MEDICINA, UNAM PRESENTE

Por este medio, hago constar que las muestras respiratorias obtenidas de pacientes con asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, exacerbadas por enfermedades virales, que se encuentran bajo mi custodia en el Laboratorio de Biología Molecular en Enfermedades Emergentes y EPOC, serán utilizadas para el desarrollo del proyecto **“Búsqueda de marcadores genéticos asociados a la persistencia del virus sincicial respiratorio en pacientes adultos con enfermedades respiratorias crónicas, exacerbadas por infección viral”**, como una colaboración con la Dra. Evelyn Rivera Toledo, Profesora Asociada C, de la Facultad de Medicina, UNAM.

Dicho banco de muestras se encuentra a disposición para investigación como parte del proyecto “Diversidad viral y bacteriana presente en la enfermedad respiratoria aguda: implicaciones en la estimulación del sistema inmune innato” (B10-20), que ya ha sido aprobado por los Comités de Ética en Investigación del INER.

Atentamente,

**Dr. Joel Armando Vázquez Pérez**  
Investigador en Ciencias Médicas  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias





## Anexo 3. Datos del análisis de las muestra

Muestra	Extracción doble	[RNA] ng/uL	Ct RSV	Desviación estándar Ct
E118	No	62.4	38.054	-
15	No	66.5	37.193	-
E119	No	65.5	38.076	-
E70	No	79	36.372	0.907
26	No	76.8	36.205	1.129
E199	Si	176.9	21.768	0.069
E197	Si	150.4	37.168	-
2544	Si	146.2	37.222	0.642
2594	Si	191.1	17.196	-
B685	Si	160.2	-	-
B837	Si	175.5	35.925	0.677
B861	Si	179.5	37.044	-
B875	Si	172.2	-	-
B920	Si	148.4	37.309	-
B946	Si	151.5	-	-
B948	Si	157	31.765	0.949
2156	Si	158.4	30.736	0.271
2166	Si	161.4	33.526	0.535

Muestra	Extracción doble	[RNA] ng/uL	Ct RSV	Desviación estándar Ct
C169	Si	165.4	28.887	2.379
C199	Si	147.4	34.403	0.401
3403	No	77.3	28.889	0.053
A830	Si	166	37.917	0.268
837	Si	128.7	36.566	0.188
841	Si	185.8	34.364	1.339
842	Si	249.1	34.584	0.213
847	Si	170.7	24.692	0.006
B707	Si	197.9	37.903	0.301
B721	Si	184.1	35.865	1.114
B723	Si	159.4	36.947	-
B781	Si	235.7	38.433	-
B782	Si	159.6	37.796	-
B795	Si	199.3	36.845	-
B822	Si	181.9	36.733	-
B823	Si	929.3	36.94	0.122
B958	Si	171.5	36.611	-
B1989	Si	187.2	36.119	0.068

## Anexo 4. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del genoma de RSV

Primer	Secuencia	Nombre oligo	No. Bases	Nanomoles finales	Agua (µl) para 100µM	Tm	Tamaño amplicón	Escala
1	TGGGGCAAAATAAGAATTTGATAAG	RSV-43F	24	34.78	347.8	63.9	1101	50 nM
2	CAACTTGACTTTGCTAAGAGC	RSV-1144R	21	41.59	415.9	58.9		50 nM
3	RTGAARCTATTGCACAAAATGRRG	RSV-827F	23	40.43	404.3	63	1409	50 nM
4	ATCTIGRTTYCTCGGTGTACCTC	RSV-2236R	23	44.18	441.8	64.5		50 nM
5	ARTGGGWWGGAAGCWWGG	RSV-2018F	18	31.51	315.1	62.8	1237	50 nM
6	CACGTATGTTCCATATTTGCCCC	RSV-3255R	23	40.11	401.1	66.1		50 nM
7	GAAAGYGAAARATGGCAAAAGACAC	RSV-2951F	26	45.21	452.1	68.3	1036	50 nM
8	CGTGTAGCTGTRTGCTTCC	RSV-3987R	19	42.16	421.6	60.8		50 nM
9	RGCATATGATGTAACYACACC	RSV-3568F	21	45.4	454	57.9	1167	50 nM
10	GATTRAGAGTRTCCAGGTC	RSV-4735R	20	41.73	417.3	58.1		50 nM
11	AATTCWCAAGCAAATTTGGCC	RSV-4329F	22	32.9	329	65.7	1512	50 nM
12	CTYGTCTACTGCACTRCATG	RSV-5841R	21	31.93	319.3	61.1		50 nM
13	CTGGGGCAAATAACMATGGAG	RSV-5620F	21	32.06	320.6	66.5	1579	50 nM
14	CATTGACTTGAGATATTGATGCATC	RSV-7199R	25	45.03	450.3	63.7		50 nM
15	GAGCYATWGTGTCATGCTATGG	RSV-6966F	22	42.05	420.5	62.6	705	50 nM
16	CTTCGYGACATATTTGCCCC	RSV-7671R	20	47.03	470.3	66.6		50 nM
17	TAARGCCARAARACACACCAG	RSV-7384F	20	43	430	63.1	1180	50 nM
18	AATAATGGGATCCATTTTGTC	RSV-8564R	23	44.38	443.8	65.7		50 nM
19	RGATATCCACAARAGCATAACC	RSV-8186F	22	30.85	308.5	60.2	1612	50 nM
20	AAGRTTATTRTCACCTGCAAGC	RSV-9798R	22	43.6	436	61.8		50 nM
21	CTTAGGSTTRAGATGYGGATTC	RSV-9465F	22	40.52	405.2	62.3	1000	50 nM
22	GTCTRAACATWCCCGTTGC	RSV-10465R	20	48.46	484.6	64		50 nM
23	YTRATATGGACTAGTTTYCCTAG	RSV-10212F	23	46.23	462.3	55.6	1546	50 nM
24	TTGTCTYTCAGAYCCTAAAGC	RSV-11758R	21	43.81	438.1	59.3		50 nM
25	ATGYTRITTTGGTGGTGTGATCC	RSV-11518F	23	39.3	393	68.5	1305	50 nM
26	GGAGGTTTCATCAAATGTATCTC	RSV-12823R	23	46.01	460.1	60.7		50 nM
27	YTWACAGTCAGTAGACCATG	RSV-12589F	23	40.25	402.5	55.5	1414	50 nM
28	YATGATGCCAAGGAAGCATGC	RSV-14003R	21	43.32	433.2	68.7		50 nM
29	RRATTATAGATCAITCAGGTAATACAG	RSV-13904F	27	42.44	424.4	57.8	1118	50 nM
30	AMACTACCTGTRATTTTAATCAG	RSV-15022R	23	46.12	461.2	55		50 nM

## Anexo 5. Ejemplo de cálculo del número de copias de RSV por cada 100 ng de RNA total

Se tomarán como ejemplo los datos de la muestra E118:

$$\begin{aligned} [RNA] &= 62.4 \text{ ng}/\mu\text{L} \\ Ct &= 38.054 \end{aligned}$$

Para la preparación de cDNA se emplearon 8  $\mu\text{L}$  de RNA total y se asumió que el RNA se transformó en su totalidad a cDNA, por lo que:

$$8 \mu\text{L RNA total} \left( \frac{62.4 \text{ ng RNA total}}{1 \mu\text{L RNA total}} \right) \left( \frac{1 \text{ ng cDNA total}}{1 \text{ ng RNA total}} \right) = 499.2 \text{ ng cDNA total}$$

El volumen final después de la síntesis de cDNA fue de 20  $\mu\text{L}$ :

$$\frac{499.2 \text{ ng cDNA total}}{20 \mu\text{L cDNA total}} = 24.960 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

Para la reacción de PCR en tiempo real se emplearon 5  $\mu\text{L}$ :

$$5 \mu\text{L cDNA total} \left( \frac{24.960 \text{ ng cDNA total}}{1 \mu\text{L cDNA total}} \right) = 124.8 \text{ ng cDNA total}$$

Para el cálculo del número de copias se empleó la ecuación obtenida de la regresión lineal de la curva estándar de RSV:

$$Ct = -2.986 \text{ Log} (\text{copias} / 5 \mu\text{L}) + 42.26$$

Al despejar, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\text{Log} (\text{copias} / 5 \mu\text{L}) = (Ct - 42.26) / -2.986$$

Al sustituir:

$$\begin{aligned} \text{Log} (\text{copias} / 5 \mu\text{L}) &= (38.054 - 42.26) / -2.986 = 1.408 \\ \text{copias} / 5 \mu\text{L} &= 25.58 \end{aligned}$$

La cantidad de copias por cada 100 ng de RNA total se obtuvo:

$$\frac{25.58 \text{ copias RSV}}{124.8 \text{ ng cDNA total}} \times 100 = 20.50 \text{ copias RSV} / 100 \text{ ng RNA total}$$