



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN:

“EL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO HUMANO: DIVERSAS  
ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO DE UNA VACUNA.”

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

RODRIGO URIBE ALVAREZ



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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: AIDA NAVAS PEREZ

VOCAL: Profesor: ANA ESTHER AGUILAR CARDENAS

SECRETARIO: Profesor: ROCIO GABRIELA TIRADO MENDOZA

1er SUPLENTE: Profesor: ALEJANDRO CAMACHO CRUZ

2° SUPLENTE: Profesor: BEATRIZ RUIZ VILLAFAN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

ASESOR DEL TEMA: DRA. ROCÍO TIRADO MENDOZA

---

SUSTENTANTE: RODRIGO URIBE ALVAREZ

## Agradecimientos

A la Dra. Rocío Tirado por la gran ayuda y el tiempo brindados en este proyecto.

A las integrantes del comité tutorial por sus correcciones, tiempo y enseñanzas.

A la UNAM, por ser mi segundo hogar, por darme educación, cultura, deporte, amigos y la oportunidad de representarla.

## Dedicatorias

En especial a mis padres por haberme aguantado, apoyado y ayudado en todo durante tanto tiempo.

A Cris y a Pau por hacer más divertida mi vida.

# ÍNDICE

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Generalidades.....</b>	<b>3</b>
2.1 Estructura del hRSV.....	3
2.1.1 Proteínas virales.....	5
2.2 Ciclo de replicación del hRSV .....	7
2.3 Importancia del hRSV en infecciones del tracto respiratorio.....	8
2.4 Patogénesis del hRSV.....	10
2.4.1 Patología.....	10
2.4.2 Respuesta inmune.....	13
2.4.2.1 Inmunidad innata.....	13
2.4.2.2 Inmunidad adaptativa.....	15
2.5 Tratamiento.....	16
2.6 Estrategias para desarrollar una vacuna.....	19
2.6.1 Desarrollo de una vacuna contra el hRSV.....	19
2.6.2 Vacunas inactivadas.....	24
2.6.3 Vacunas de DNA.....	25
2.6.4 Vacunas vivas atenuadas.....	26
2.6.5 Vacunas basadas en vectores.....	27
2.6.6 Vacunas basadas en subunidades.....	28
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>29</b>
<b>4. Metodología.....</b>	<b>29</b>
<b>5. Discusión.....</b>	<b>30</b>
<b>6. Conclusión.....</b>	<b>32</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>33</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

El Virus Sincitial Respiratorio humano (hRSV por sus siglas del inglés human Respiratory Syncytial Virus) es el principal agente etiológico de las infecciones de tracto respiratorio inferior que ocurren en niños menores de dos años.<sup>a,1</sup> Por lo tanto, el desarrollo de una vacuna contra este virus es importante y urgente para prevenir el índice de mortalidad por infecciones respiratorias agudas en la población infantil.

Se estima que el hRSV es responsable del 40% al 50% de los casos de niños hospitalizados con bronquiolitis y del 25% de todos los casos de neumonía.<sup>a,1</sup> Además, a nivel mundial el hRSV es responsable de 64 millones de infecciones y 160,000 muertes anuales.<sup>a</sup> Este virus es altamente contagioso y responsable de epidemias anuales, que se presentan principalmente durante el periodo invernal. En países templados los brotes se presentan de noviembre a marzo, y en países tropicales durante todo el año.<sup>a</sup> De acuerdo con estos reportes y ante la falta de opciones terapéuticas y de una vacuna eficiente para la profilaxis de esta infección en la población infantil, se considera al hRSV como un candidato para el cual es indispensable desarrollar una vacuna eficiente.<sup>2</sup>

Con la finalidad de mejorar la calidad en materia de salud de la población mundial, la Organización de las Naciones Unidas (ONU)<sup>b</sup> se ha planteado diversos objetivos para el año 2015.<sup>b</sup> Entre estos objetivos destaca la disminución de la mortalidad en niños menores de 5 años en dos terceras partes. Actualmente la mortalidad de este grupo de niños asciende a 11 millones de muertes por año. Es lamentable que el 37% ocurra dentro del primer mes de vida.<sup>b</sup> Una de las principales causas de muerte infantil es la neumonía. Este padecimiento causa 1.9 millones de muertes de niños menores a los 5 años de edad y se presenta con una frecuencia de 156 millones de episodios anuales en el mundo.<sup>3,4,5</sup> El hRSV causa el 40% de los casos de neumonía viral, y es uno de los tres principales agentes infecciosos en causar la muerte por infecciones respiratorias además de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, para los cuales ya hay

vacuna. Además estos últimos pueden aparecer como una complicación de la infección por hRSV.<sup>a,3</sup>

El hRSV es altamente infeccioso y puede ser transmitido por contacto con superficies contaminadas como fómites o por gotas de saliva. La infección por hRSV ocurre cuando el material infeccioso entra en contacto con las mucosas de los ojos, boca o nariz.<sup>6</sup>

Para el primer año de vida el 50% de los niños ya han sido infectados, al llegar al segundo año de vida ya es el 90% de los niños que han sido infectados y prácticamente todos los niños han sido infectados por el hRSV al llegar al tercer año de edad. Además el hRSV induce una inmunidad deficiente, por lo que las reinfecciones son comunes a lo largo de la vida llegando a ser de gran importancia en las personas de la tercera edad, ya que en ellos el virus ocasiona una enfermedad grave parecida a la influenza y en éste grupo las enfermedades respiratorias son la cuarta causa de muerte.<sup>7,8</sup> Más aún es importante mencionar que las infecciones respiratorias por hRSV contribuyen a la exacerbación de los síntomas en padecimientos como asma, fibrosis quística y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).<sup>9</sup>

Se ha observado que acciones como lavarse las manos disminuyen la propagación del hRSV considerablemente.<sup>6</sup> Sin embargo, estas son medidas difíciles de lograr considerando que miles de millones de personas en el mundo carecen de agua potable y de instalaciones básicas de saneamiento. Son estas carencias lo que ocasiona que los países en vías de desarrollo padezcan el 95% del total de las muertes de niños menores de 5 años en el mundo.<sup>b</sup>

El tratamiento para la infección causada por hRSV, debido a su alto costo, se proporciona sólo a pacientes de alto riesgo como: 1. Niños nacidos prematuramente 2. Niños con fallas cardíacas congénitas 3. Niños con displasia broncopulmonar crónica y 4. Pacientes inmunocomprometidos o inmunosuprimidos por trasplante de medula ósea.<sup>6,10</sup>



## 2.- GENERALIDADES

### 2.1.- Estructura del hRSV

El hRSV pertenece a la familia Paramixoviridae, subfamilia Pneumovirinae y género Pneumovirus. Es un virus envuelto, pleomórfico, de aproximadamente 150nm de diámetro, con un genoma de una sola hebra de ARN de polaridad negativa de aproximadamente 15.2kb. La nucleocápside es una hélice simétrica con diámetro de 12 a 15nm.<sup>2</sup> Para este virus se han descrito dos subgrupos: el A y el B. Esta tipificación se estableció con base a la variabilidad de secuencia del gen de la glicoproteína G.

El genoma del hRSV contiene 10 genes (Fig.1), que se encuentran ordenados en el sentido 3' a 5' de la siguiente manera: NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L, y que codifican para 11 proteínas, 9 son estructurales (L, G, F, N, P, M, M2-1, M2-2 y SH) y 2 no estructurales (NS1 y NS2).<sup>2</sup>

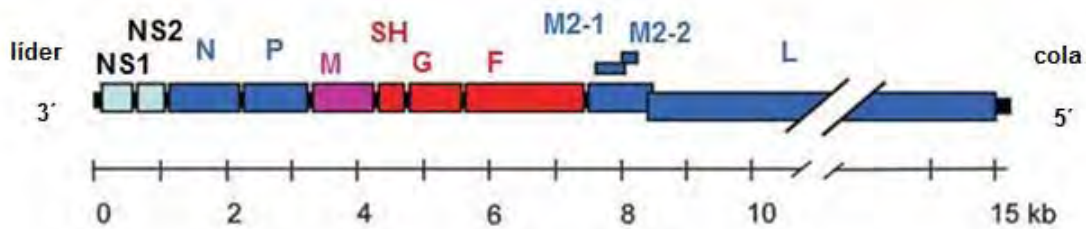


Fig.1. Representación esquemática del genoma de hRSV. Los genes están representados por rectángulos de colores y entre estos, de negro, se encuentran regiones intergénicas variables de 1-56 nucleótidos que son no codificantes, con excepción de los dos últimos genes que se traslapan por 68 nucleótidos. En los extremos tenemos las regiones extragénicas, la región líder en 3' y la cola en 5' en las cuales se encuentran los elementos básicos del promotor viral. Se encuentran señaladas las proteínas no estructurales (NS1 y NS2), la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), la proteína de matriz (M), la proteína pequeña hidrofóbica (SH), la proteína de unión (G), la proteína de fusión (F), las proteínas estructurales pequeñas (M2-1 y M2-2), y la proteína polimerasa viral (L). [Tomado y modificado de Collins 2008 <sup>17</sup>].

El hRSV tiene 3 proteínas transmembranales de superficie que son la proteína de fusión (F), la proteína de unión (G) y la proteína pequeña hidrofóbica (SH). Las proteínas F y G son las únicas que inducen anticuerpos neutralizantes. La proteína de matriz (M) se localiza en la cara interna de la envoltura viral. El RNA está asociado con cuatro proteínas, el factor de procesividad de transcripción (M2-1), la nucleoproteína (N), que se asocia al RNA viral, junto con la polimerasa dependiente de RNA (L) y la fosfoproteína (P). Estas tres últimas proteínas junto con el genoma viral constituyen el complejo ribonucleoprotéico (RNP)<sup>2,11</sup>(Figura 2).

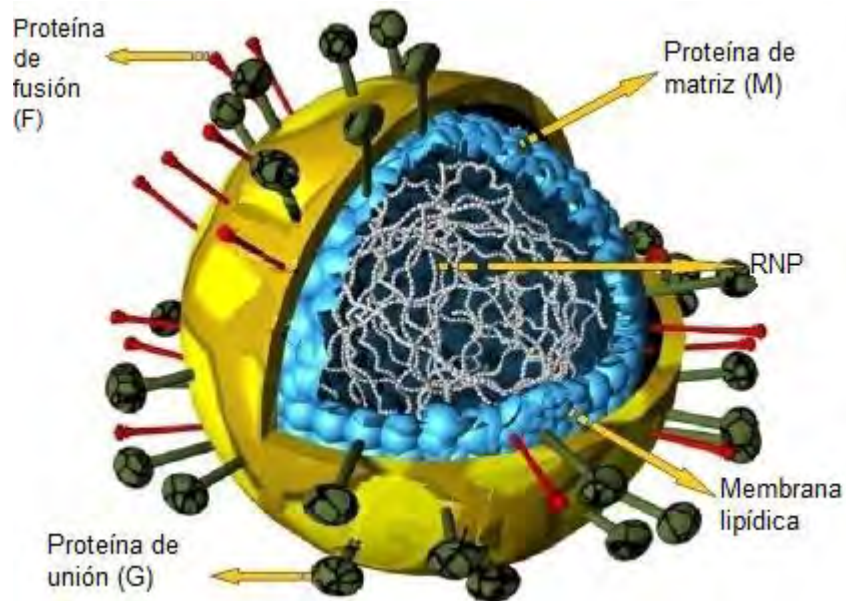


Figura 2 Representación esquemática de hRSV. En este esquema se puede observar la estructura del hRSV. En amarillo se representa la envoltura y ancladas a la envoltura en color rojo y verde las glicoproteínas virales F y G respectivamente. En la cara interna, de color azul, se localiza la proteína de matriz. En gris se representa al complejo RNP (RNA viral asociado a las proteínas N, P y L). [Tomado de ICTVdB- The universal virus database<sup>9</sup>].

### 2.1.1.- Proteínas virales

Las proteínas no estructurales NS1 y NS2 se consideran no estructurales porque no se han encontrado en virus maduros, aunque abundan en células infectadas. Las NS1/NS2 inhiben la actividad del interferón tipo 1 (IFN tipo1) producido en respuesta a la actividad viral. La interferencia a la respuesta del IFN-1 mediada por estas proteínas virales es resultado de la inhibición de la fosforilación y de la traslocación nuclear del factor 3 regulador de interferón (IRF3 del inglés Interferon Regulatory Factor 3), y del factor nuclear  $\kappa\beta$  (NF-  $\kappa\beta$  del inglés Nuclear Factor  $\kappa\beta$ ), ambos son factores de transcripción que controlan la expresión del interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ ).<sup>12,13</sup>

La nucleoproteína (N) se une firmemente al RNA genómico para formar nucleocápsides helicoidales resistentes a las RNAasas celulares; durante la replicación viral también se une a los intermediarios replicativos de polaridad positiva o antígenoma.

La fosfoproteína (P) forma parte del complejo de la polimerasa y además forma un complejo con la proteína N libre manteniendo a esta última en una forma soluble disponible para el ensamblaje de la nucleocápside.

La proteína de matriz (M) forma una cubierta proteica en la superficie interna de la membrana y regula la morfogénesis del virión.

La proteína pequeña hidrofóbica (SH) no ha sido totalmente caracterizada; se sugiere que inhibe la señalización del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$  del inglés Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) impidiendo la muerte celular, facilitando así la propagación del virus.<sup>14,15</sup>

La proteína de unión (G) es una proteína viral altamente glicosilada y participa en la unión del virión a la superficie de la célula blanco.

La proteína G es una glicoproteína de superficie, transmembranal, no globular de tipo 2 de superficie. Dos terceras partes de la molécula del extremo C-terminal están orientadas hacia el espacio extracelular, esta región presenta cuatro residuos de cisteína que forman parte de un motivo estructural que se ha

propuesto como el sitio de unión a los glicosaminoglicanos (GAGs) tales como el heparán sulfato y el condroitín sulfato B que se encuentran en la superficie celular.<sup>16</sup> Los GAGs son polisacáridos largos que se encuentran en la matriz extracelular y que consisten en subunidades de disacáridos repetidas. El gen que codifica para la proteína G tiene un codón alternativo; a partir de éste se sintetiza una forma soluble de la proteína G que se ha sugerido que sirve como señuelo para los anticuerpos neutralizantes. Se produce en gran cantidad al principio de la infección y así facilita la evasión de las partículas virales a la acción de estos anticuerpos.<sup>17</sup> Además, modula la respuesta inflamatoria generada por la infección de las células epiteliales de pulmón, favoreciendo la replicación viral.<sup>18</sup>

La región no glicosilada rica en cisteína es parecida a la quimiocina CX3C (fractalcina) y por lo tanto también se une al receptor de ésta, el CX3CR1. La glicoproteína G del hRSV induce inflamación pulmonar mediante la unión al receptor CX3CR1 (receptor a fractalcina), iniciando una cascada de mediadores solubles de la inflamación.<sup>17,19,20</sup> La proteína G tiene otros receptores como la anexina-II y la Selectina-L<sup>21</sup>, la anexina-II puede ser un receptor para el hRSV en células epiteliales y la selectina-L en los leucocitos.<sup>19</sup>

La proteína de fusión (F), es una proteína transmembranal de tipo 1. Ésta promueve la fusión de la membrana del virión con la membrana de la célula hospedera para que se lleve a cabo la descarga del genoma en el citoplasma de la célula. También, al ser expresada en la superficie de la célula hospedera tras la infección, genera que la membrana de la célula infectada se fusione con la membrana de las células vecinas. Una vez que desaparecen las barreras intercelulares se forman sincitios que se observan en imágenes anatomo-patológicas como células gigantes multinucleadas. La formación de sincitios favorece la diseminación del virus de una célula a otra sin tener que ser expuestos al medio extracelular donde pueden ser destruidos por las moléculas que median la respuesta inmune.<sup>12</sup> A esta peculiaridad se debe el nombre característico: *virus sincitial respiratorio humano*.

Se ha observado que también hay receptores para F en la célula hospedera como son RhoA<sup>22</sup>, TLR-4 (del inglés Toll-like Receptors 4), CD14 (del inglés cluster of differentiation 14) y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1 del inglés Inter-cellular Adhesion Molecule 1) que al unirse con F inducen citocinas proinflamatorias.<sup>23,24</sup>

La proteína M2-1 es el factor de elongación de la transcripción, fundamental para la viabilidad viral.<sup>25</sup>

La proteína M2-2 es el regulador de la transcripción, regula el balance entre transcripción y replicación del genoma viral.<sup>26</sup>

La proteína L (L del inglés large, ya que es la proteína más grande del hRSV) está asociada a la nucleocápside. La proteína L es la polimerasa viral dependiente de RNA. Esta proteína presenta seis regiones altamente conservadas, que parecen incluir los dominios con actividad de polimerasa. En el genoma hay una región de solapamiento entre los genes M2 y L.<sup>2</sup>

## **2.2.- Ciclo de replicación del hRSV**

El ciclo de replicación del virus tiene una duración de entre 16 y 20 horas. Todos los eventos que suceden en el ciclo replicativo del hRSV ocurren en el citoplasma. Incluso, el virus puede replicarse en células carentes de núcleo.<sup>27</sup>

La infección comienza con la unión de la proteína G a los receptores celulares. El segundo paso, o la siguiente fase es la fusión de la envoltura viral a la membrana citoplasmática. Mecanismo mediado primero por la exposición del dominio de fusión de la proteína F y segundo por la unión de esta proteína a su receptor o receptores.

Una vez que el complejo RNP se encuentra en el citoplasma, inicia la transcripción y traducción de los diferentes genes con la consecuente producción de las proteínas del virus. La acumulación de la proteína viral M2-2 cambia el modo operacional de la polimerasa (L) de transcripción a replicación del RNA

viral.<sup>27</sup> Los RNAs y las proteínas del hRSV pueden ser detectados intracelularmente 4-6 horas después de la infección.<sup>17,27</sup>

Las proteínas de la envoltura F, G y SH se ubican en las balsas lipídicas de la membrana plasmática del hospedero.<sup>2</sup> La proteína M se localiza en la cara interna de las balsas lipídicas, donde interactúa con las proteínas de la envoltura y dirige el ensamblaje del hRSV. El hRSV sale de la célula por gemación.<sup>2</sup>

La liberación de los nuevos virus empieza 10-12 horas después de la infección, alcanza su máximo a las 24 horas y continúa hasta que las células se empiezan a deteriorar entre las 30-48 horas post-infección.<sup>2</sup>

### **2.3.- Importancia del hRSV en infecciones del tracto respiratorio**

El hRSV es causante de varias enfermedades como la laringotraqueobronquitis, la otitis media, la bronquitis, la bronquiolitis y la neumonía. Además de que contribuye a exacerbar la sintomatología en pacientes con asma, fibrosis quística y EPOC.<sup>2,3,9</sup>

#### **Bronquiolitis**

Es la enfermedad del tracto respiratorio bajo más común en niños menores de un año. Es una enfermedad inflamatoria de los bronquiolos que impide el flujo del aire y no permite la eliminación de secreciones ocasionando dificultad respiratoria.<sup>28</sup> El tratamiento para la bronquiolitis es a base de medidas de sostén.<sup>28</sup> Además, las coinfecciones con bacterias son comunes, sucediendo en aproximadamente el 40% de los casos en niños pequeños.<sup>5,29</sup> A su vez, los niños que son ingresados al hospital por bronquiolitis antes del año de vida tienen mayor probabilidad para desarrollar asma, especialmente en los meses subsecuentes a la infección.<sup>30</sup>

## Neumonía

Este padecimiento se debe a una infección de los alveolos, la porción distal de las vías respiratorias y el intersticio pulmonar, se acompaña de un infiltrado inflamatorio con leucocitos, eritrocitos y fibrina, con la consecuente reducción de la superficie de intercambio de gases a nivel alveolar, ocasionando insuficiencia respiratoria severa. La mayoría de los casos de neumonía en niños menores de un año son ocasionados por virus, siendo el más importante el hRSV. Otras neumonías, como las bacterianas, pueden presentarse como complicación de la infección por hRSV.<sup>31</sup>

## Asma

El asma es una enfermedad crónica por hipersensibilidad tipo 1 del tracto respiratorio y es una enfermedad alérgica que produce constricción e inflamación de los bronquios. Cuando se presenta un ataque de asma, los músculos que rodean a los bronquios se tensan y el revestimiento de dichas vías aéreas se inflama. Esto reduce la cantidad de aire que circula ocasionando sibilancias al paso del aire. En los niños la principal causa de exacerbación son los resfriados comunes. El asma produce síntomas como angustia, respiración sibilante, falta de aire, opresión en el pecho y tos.<sup>30,32</sup>

Hay una asociación bidireccional entre el asma y la infección por hRSV, después de una infección severa por hRSV las probabilidades de padecer asma aumentan considerablemente.<sup>30,32</sup>

## Apnea

Definida como la interrupción completa del flujo nasobucal de por lo menos 15 a 20 segundos y tiene una incidencia del 10 al 20% en pacientes con infección por hRSV.<sup>33</sup>

## Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

Esta enfermedad se caracteriza por limitación crónica del flujo aéreo el cual no es completamente reversible. Ésta enfermedad es usualmente progresiva y se asocia tanto a una respuesta inflamatoria de las vías respiratorias bajas, como a

exacerbaciones intermitentes lo que lleva a un deterioro de la función pulmonar y de la calidad de vida. Es la cuarta causa de mortalidad en el mundo.<sup>9</sup>

### Bronquitis crónica

Es la respuesta inflamatoria de los bronquios, bronquiolos y en ocasiones alveolos a diferentes agentes entre los que se encuentran las infecciones repetidas de hRSV. Esta enfermedad se caracteriza por producción de esputo y por destrucción de los alvéolos como consecuencia de la respuesta inflamatoria.

La bronquitis crónica puede complicarse para convertirse en enfisema. El enfisema ocurre cuando hay enfermedades coexistentes en los pulmones lo que hace que las vías aéreas se vuelvan más angostas. Esto lleva a una limitación del flujo de aire en los pulmones ocasionando dificultad respiratoria. En contraste con el asma, la limitación del flujo aéreo es poco reversible y empeora progresivamente conforme pasa el tiempo.<sup>34</sup>

## **2.4.- Patogénesis del hRSV**

La sintomatología asociada a hRSV es consecuencia de: 1. Infección de epitelio respiratorio y 2. Inducción de citocinas proinflamatorias, tales como la interleucina 8 (CXCL8), RANTES (del inglés Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted), MIP1 $\beta$  (del inglés Macrophage inflammatory protein), MIP1 $\alpha$  y MCP-1 (del inglés monocyte chemoattractant protein-1), producidas por células infectadas (células epiteliales, linfocitos B y macrófagos).<sup>1</sup>

### **2.4.1.- Patología**

La infección de células epiteliales de los conductos respiratorios de menor diámetro (bronquiolos) por el hRSV causa una respuesta inflamatoria mediada por citocinas proinflamatorias, que ocasionan el cierre de los bronquiolos y favorece la infección. Asimismo se presenta desfoliación celular y aumento de secreciones, procesos que facilitan la proliferación viral.



En las secreciones respiratorias o lavados bronquiales así como en los espacios peribronquiales y perialveolares se encuentra aumento en el número de neutrófilos y eosinófilos.<sup>35</sup> Las vías aéreas pequeñas acumulan fibrina, moco y una mezcla de células epiteliales y células inflamatorias.<sup>35</sup>

La proteína F induce citocinas proinflamatorias mediante la unión a los receptores tipo Toll 4 y al receptor CD14.<sup>23</sup> Esta respuesta de citocinas es mediada por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, que induce la transcripción de genes para CXCL8, interleucina 10 (IL-10) e IL-6. La unión de la proteína F del hRSV con TLR4 provoca sobreexpresión de TLR4 y amplificación de una respuesta que incluye un aumento en la cantidad de fluidos extracelulares, destinados a diluir partículas invasoras o moléculas irritantes, pero que bloquean el paso del aire y favorecen la multiplicación o la infección de hRSV.<sup>12,17</sup> La proteína F también puede unirse a ICAM-1 (del inglés Inter-Cellular Adhesion Molecule 1) que es la molécula de adhesión que se expresa en células epiteliales.<sup>36</sup> La proteína F además puede unirse al receptor RhoA. La unión puede activar a RhoA disparando funciones efectoras, tales como la fosforilación de miosina de cadena ligera, la cual induce contracción del músculo liso en bronquiolos (hiperreactividad).<sup>37</sup> y expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y CXCL8.<sup>1,36</sup>

La proteína G también está en la superficie del virión. Esta glucoproteína tiene un asa CX3C, un dominio altamente glicosilado "tipo mucina" y un segmento transmembranal que la ancla a la membrana viral. Todas estas características la hacen parecida a la quimiocina fractalcina CX3C. Las quimiocinas pueden tener varias estructuras y se clasifican en C, CC y CXXXC. Al activarse, la fractalcina recluta leucocitos tipo NK (del inglés natural killers), linfocitos CD4+ y linfocitos CD8+, lo que favorece una respuesta inmune e inflamatoria. Aparentemente, la proteína G del hRSV evita este reclutamiento compitiendo con la fractalcina. Por otro lado, para evadir la respuesta inmune, la proteína G puede producirse en una forma asociada a la membrana y en una forma soluble. La forma anclada al virión permite la unión del virus a la célula hospedera y favorece la unión de la proteína

F y su actividad fusogénica. La proteína G soluble es la isoforma que se codifica por un codón de iniciación alternativo que se localiza abajo del segmento hidrofóbico. La forma soluble parece combinarse con las células reclutadas, evitando que lleguen a la fractalcina e interrumpiendo el ciclo de respuesta que ocurriría cuando un antígeno es presentado adecuadamente. Es interesante observar que la estructura terciaria de la proteína G debe conservarse para que esta proteína ejerza su función.<sup>12,38,39</sup>

En modelos animales se ha demostrado que la proteína G soluble induce eosinofilia asociada a un incremento en la producción de citocinas como IL-4, IL-5, IL-13 y eotaxina, promoviendo la activación de linfocitos CD4+ y que se aumente la respuesta Th2 disminuyendo la Th1.<sup>40</sup> El incremento de eosinófilos en pulmón así como la producción de citocinas contribuyen en gran medida a la patogénesis del proceso inflamatorio durante la infección por hRSV.<sup>39,40</sup>

Las proteínas NS1 y NS2 bloquean la síntesis del IFN $\alpha/\beta$  que media la respuesta tipo Th1 del hospedero. NS1 y NS2 bloquean la activación del factor 3 de regulación del IFN y la señalización a través de la vía JAK/STAT.<sup>13</sup> Un mecanismo aparente es que NS1/NS2 promueven la degradación de STAT2. Con esto, la respuesta inmune se desplaza hacia el tipo Th2 que es de corta duración. La estrategia seguida por las proteínas NS1 y NS2 no es única para hRSV pues se ha reportado que el virus de la influenza y la proteína C del virus del sarampión también bloquean la respuesta tipo1 del IFN.<sup>12,17</sup>

Se ha reportado que cuando se elimina la proteína SH de los paramixovirus se induce apoptosis en cultivos celulares y atenúa al virus in vivo,<sup>14,15</sup> esto es porque hay un incremento de TNF- $\alpha$ , además de la activación de NF- $\kappa$ B.<sup>14</sup> La proteína SH se encarga de bloquear la vía de apoptosis mediada por el TNF- $\alpha$ .<sup>14,15</sup> La habilidad para evitar que las células infectadas sufran apoptosis favorece la replicación viral y como resultado se observa un incremento en el título viral.<sup>15</sup>

## 2.4.2.- Respuesta inmune

### 2.4.2.1.- Inmunidad innata

En los pulmones la primera línea de defensa contra el hRSV es el surfactante pulmonar. El surfactante está formado por una capa de fosfolípidos (lecitina, espingomielina) y por proteínas surfactantes. Las proteínas surfactantes A (SP-A) y B (SP-B), forman parte de la familia de las colectinas, se unen a los oligosacáridos de superficie de patógenos y favorecen la opsonización y la activación del sistema del complemento.<sup>39,41</sup>

Los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs por sus siglas en inglés Pattern Recognition Receptor) reconocen a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés Pathogen Associated Molecular Patterns).<sup>39</sup> Puede haber dos tipos de PRRs: Secretados y asociados a células. Dentro de los primeros se encuentran las colectinas y el CD14, y en el segundo grupo podemos encontrar a las moléculas adaptadoras y a los receptores tipo Toll (TLRs por sus siglas en inglés Toll-like receptors).<sup>39</sup> Los TLRs reconocen a los PAMPs, inclusive el TLR4 juega un papel importante contra la infección por hRSV, ya que la expresión de citocinas y quimiocinas asociada a la infección por hRSV parece ser inicialmente dependiente de TLR4.<sup>23</sup> Tanto el TLR4 como el CD14 son activados por la proteína F.<sup>23</sup>

Las células epiteliales infectadas por hRSV producen quimiocinas y citocinas que afectan el balance entre la eliminación del virus y la patogénesis de la enfermedad, inclusive en diferentes estudios se ha indicado que la expresión de citocinas y quimiocinas puede ser correlacionada con la severidad de la enfermedad.<sup>39</sup> Entre las quimiocinas secretadas durante una infección por hRSV están MIP-1 $\alpha$  y RANTES que han sido correlacionadas con bronquiolitis severa.<sup>42,43</sup> Durante la etapa aguda de la infección, la secreción de citocinas inicia la respuesta inflamatoria local, ya sea de manera directa o amplificando el evento inflamatorio previamente iniciado por macrófagos activados, eosinófilos y neutrófilos.<sup>20,44,45,46,47</sup>

Los componentes celulares más importantes en la respuesta inmune innata contra el hRSV son los macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés Natural Killer), y eosinófilos. Estas células tienen funciones importantes controlando la infección, pero durante una respuesta no balanceada pueden exacerbar la inflamación y contribuir a la patogénesis de la enfermedad.<sup>39</sup>

Los neutrófilos son las células predominantes en la bronquiolitis causada por hRSV.<sup>48</sup> Los macrófagos y las células epiteliales son las primeras en tener contacto con el hRSV en las vías respiratorias.<sup>49</sup> La infección de ambos tipos de células por hRSV secretan citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  y RANTES.<sup>41</sup> A los eosinófilos se les ha asociado con la enfermedad exacerbada del hRSV como en el caso de los infantes fallecidos tras la vacunación con FI-hRSV y subsecuente infección natural, además de ser característicos en enfermedades respiratorias como el asma.<sup>50,51,52</sup> En la primera fase de la infección por hRSV las células NK migran de la sangre a los pulmones y son responsables por una gran parte de la producción del IFN- $\gamma$ .

El sistema inmune del hospedero depende en gran parte de la acción del interferón (IFN) contra los virus: Las isoformas de IFN son: 1.- Alfa (IFN- $\alpha$ ) producido principalmente por leucocitos infectados con virus 2.- Beta (IFN- $\beta$ ), tanto alfa como beta son producidas por varios tipos celulares como células T, macrófagos y células endoteliales, 3.- Lambda (IFN- $\lambda$ ) producida por las células NK activadas y 4.- Gamma (IFN- $\gamma$ ) producido en células T activadas, que generan diferentes respuestas. El IFN es una molécula que se induce en respuesta a una infección viral. A su vez el interferón  $\alpha/\beta$  induce señales al interior del núcleo generando un ambiente hostil o de alerta en células no infectadas (induce el estado antiviral).<sup>38</sup> Hay dos tipos de sistemas de IFN que corresponden a las isoformas de interferón. El sistema tipo uno es mediado por el IFN- $\alpha$ , el IFN- $\beta$  y el IFN- $\lambda$ . Estas moléculas se unen a sus receptores y a través del sistema Januscinasa STAT (JAK-STAT) estimulan la transcripción de genes que participan en: 1. Maduración de las células dendríticas, 2.- Proliferación de células NK (Natural Killers). Estas células eliminan y presentan antígenos a las células linfocíticas que establecen una memoria a largo plazo y se encargan de generar una respuesta a

base de inmunoglobulinas.<sup>17,38,39</sup>

#### **2.4.2.2.- Inmunidad adaptativa**

Esta es la inmunidad mediada por la respuesta humoral (células B) y celular (células T). Tanto las células B como T crean especificidad antigénica, diversidad de reconocimiento de antígenos, memoria e inmunidad auto-tolerante.

En las vías respiratorias altas la resistencia es mediada por la inmunoglobulina A (IgA), sin embargo una respuesta humoral más duradera está asociada con IgM e IgG.

La respuesta inmune contra hRSV mediada por anticuerpos maternos circulantes IgG protege a los niños menores de dos años de infecciones en el tracto respiratorio inferior, sugiriéndose que en los neonatos afectados, los títulos de anticuerpo son inferiores a los requeridos para protección.<sup>53</sup> Sin embargo es a los dos meses de edad que se ve un mayor número de casos de niños hospitalizados.<sup>a</sup> Las infecciones de hRSV son recurrentes a lo largo de la vida, pues la inmunidad que induce es de corta duración y los anticuerpos son de baja afinidad debido a una pobre estimulación de los TLRs.<sup>54,55</sup> También se llama inmunidad incompleta.<sup>55</sup> Se piensa que el hRSV puede causar hipersensibilidad respiratoria y sus infecciones repetidas dejar secuelas como el asma.<sup>56</sup>

La respuesta Th1 coordina la acción del sistema inmune contra las infecciones por patógenos intracelulares. La respuesta tipo Th2 regula la inmunidad contra los patógenos extracelulares mediante el estímulo de la secreción de anticuerpos.

El hRSV provoca una respuesta tipo Th2 a la vez que evita la respuesta Th1 polarizándose la respuesta hacia tipo Th2. El problema con la respuesta tipo Th2 es que el hospedero no puede crear una memoria inmunológica estable como la que se deriva de una respuesta Th1 normal.<sup>17,41,57,58</sup> Diversos estudios señalan la participación de las células CD4+ (Th2) y a las citocinas que producen como factores importantes en la patogénesis generada por el hRSV.<sup>1</sup>

Durante la infección por hRSV se estimula la producción de anticuerpos IgE específicos que, causan la sensibilización de las células cebadas y la consecuente secreción de histamina. Al ocurrir una infección subsecuente, el hRSV interactúa con los anticuerpos IgE específicos y activa la liberación de los mediadores de las células cebadas, con el eventual desarrollo de hiperreactividad y obstrucción de las vías respiratorias. La respuesta tipo Th2 es una estrategia de infección del hRSV para evadir al sistema inmune.<sup>17,39</sup>

El sistema tipo Th2, es mediado por el IFN- $\gamma$  que es secretado por las células NK. Las células NK se encuentran en gran proporción en los pulmones en los primeros días de la infección. El IFN- $\gamma$  influye principalmente en la diferenciación y proliferación de las células T tipo CD4+ que generan principalmente inmunoglobulinas tipo E (IgE) y tipo G (IgG).<sup>59,60</sup> Las IgE participan en la reacción alérgica al antígeno, con reclutamiento de eosinófilos y de interleucinas.<sup>59,60</sup>

## **2.5.- Tratamiento**

El primer tratamiento que se aprobó por la FDA fue la inmunoglobulina de RSV intravenosa (RSV-IGIV). La RSV-IGIV es un anticuerpo policlonal IgG purificado a partir de plasma de individuos sanos en alta concentración.<sup>61</sup> De igual manera la RSVIG-IV puede prevenir la infección del tracto respiratorio bajo.<sup>62</sup>

Otro fármaco, el palivizumab, un anticuerpo monoclonal que se aprobó casi simultáneamente con el RSV-IGIV y no tiene efectos adversos en niños con enfermedad cardíaca crónica, no hay riesgo de transmisión de enfermedad infecciosa asociado con productos derivados del plasma humano y además es de aplicación intramuscular. El palivizumab (Synagis de MedImmune) es un anticuerpo monoclonal dirigido a la proteína F que posee un alto grado de eficiencia: hasta del 80%,<sup>62,d</sup> previniendo la hospitalización de niños prematuros con enfermedad pulmonar crónica (COPD por sus siglas en inglés). Es de uso restringido para niños de alto riesgo, incluyendo a aquellos con enfermedad pulmonar crónica, enfermedades del corazón congénitas y prematuros. Además,

se ha reportado que previene las enfermedades respiratorias de las vías bajas y se reduce las sibilancias torácicas recurrentes en niños prematuros.<sup>62,63,64</sup>

Además del palivizumab, que es la única droga profiláctica con licencia para el hRSV, actualmente solo hay un medicamento anti-RSV aprobado por la FDA, la ribavirina. Es un inhibidor de la transcripción y la replicación viral y se ha usado para infecciones severas, aunque la evidencia de beneficio es escasa y tiene un alto costo.<sup>65</sup> Su uso se ha dirigido a tratar la infección en un grupo especial de individuos inmunodeficientes y solo durante el curso severo de la enfermedad.<sup>65</sup>

Recientemente se autorizó el motavizumab que es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado, de segunda generación, derivado del palivizumab, pero con una mayor afinidad por la proteína F y con una mayor capacidad neutralizante. También pertenece a MedImmune, y se espera que para el 2014 sustituya al palivizumab como el tratamiento profiláctico de mayor uso.<sup>66,67,f</sup>

Además se espera que otros antivirales como el RSV604 y el ALN-RSV01, que tienen como blanco la nucleoproteína del hRSV entren al mercado, estos fármacos se encuentran actualmente en fase de estudios clínicos 2.<sup>66</sup>

Actualmente se realiza investigación en inhibidores de fusión donde el TMC353121 se encuentra bajo evaluación de Tibotec, inhibidores de unión como el MBX-300, inhibidores de proteína N como el RSV-604 y agentes anti-RSV antisentido como el ALN-RSV01.<sup>65</sup>

Para que una vacuna sea aprobada y pueda salir al mercado se necesitan hacer estudios preclínicos y clínicos. Estos estudios se mencionan brevemente en la tabla 1.

Tabla 1. Estudios preclínicos y clínicos

Estudios preclínicos	<p>Se prueba la estabilidad de la molécula de aparente acción terapéutica con pruebas físicas y químicas.</p> <p>Después se prueba el nuevo fármaco en cultivos celulares, órganos aislados y modelos animales. Las pruebas realizadas son: toxicidad, mutagénesis y carcinogénesis. Además se realizan estudios de farmacocinética, farmacodinamia, eficacia y seguridad.</p> <p>Si los estudios preclínicos se completan y el tratamiento aún sigue siendo prometedor se avanza a estudios clínicos donde ya se prueba en humanos.</p>
Estudios clínicos	<p>Fase I. Se prueba en humanos sanos, grupos menores de 100 personas donde se determina si el fármaco es seguro y se trata de determinar la dosis y la mejor vía de administración.</p> <p>Fase II. Se prueba en individuos que padezcan la enfermedad que cura el fármaco. Se determina la eficacia terapéutica del fármaco y la toxicidad. Se determina la dosis óptima.</p> <p>Fase III. Se mide eficacia, toxicidad y relación entre seguridad y eficacia.</p> <p>Fase IV. También llamada fase de farmacovigilancia. Consiste en el seguimiento del fármaco después de que ha sido comercializado.</p>

Tabla 1. Se mencionan las pruebas que implican los estudios clínicos y preclínicos a los que se somete un medicamento antes de sacarlo al mercado.



## **2.6.- Estrategias para desarrollar una vacuna**

### **2.6.1.- Desarrollo de una vacuna contra el hRSV**

Una vacuna viral es un fragmento, una forma muerta o una forma atenuada del virus que una vez dentro del organismo sirve de antígeno y genera una producción de anticuerpos por parte del organismo.

El desarrollo de una vacuna contra una enfermedad que afecta principalmente a niños de dos a seis meses es una tarea difícil. El sistema inmune de los niños es aún inmaduro y los anticuerpos maternos pueden modificar la respuesta inmune del individuo. Sin embargo, se considera que vale la pena buscar esta vacuna porque los costos de esta enfermedad son altísimos pues hay grandes epidemias y la morbi-mortalidad es elevada. Incluso la vacuna es importante y puede ser aplicable en individuos de la tercera edad, donde el hRSV causa una enfermedad similar a la influenza tipo A.<sup>8</sup> También sería útil para evitar infecciones recurrentes por hRSV, y sus posibles complicaciones por sensibilización alérgica, como el asma.

El hRSV no genera una inmunidad de largo plazo, por lo que es probable que el esquema de vacunación se tenga que aplicar anualmente.<sup>68</sup> Otro factor importante que debe ser considerado es que la vacuna debe incluir a los dos subtipos, A y B. Las proteínas de superficie G y F, del hRSV, son las únicas que inducen anticuerpos neutralizantes. Los principales epítopes de F parecen ser dependientes de su conformación, ya que la mayoría de los anticuerpos monoclonales y policlonales reaccionan pobremente con la proteína desnaturalizada, no así los de G donde sus epítopes no dependen de una estructura altamente plegada.<sup>2</sup>

Como en el caso de los tratamientos contra el hRSV, MedImmune tiene los dos candidatos para vacunas más viables en pruebas clínicas, el MEDI-559 que es un virus vivo atenuado por pase en frío y el MEDI-534 que es un virus de parainfluenza humano-bovino quimérico que expresa la proteína F del RSV,

ambos en fase 1 de estudios clínicos.<sup>66</sup> Sin embargo hay quien prevé que no se tendrá en el mercado una vacuna hasta 2020.<sup>66</sup>

Hay diferentes tipos de vacunas que se han producido para el hRSV, todas han presentado algunos problemas, sin embargo se considera que tienen cierto potencial para ser aplicables en el mediano plazo. Las diferentes propuestas de vacunas pueden clasificarse en: vacunas de virus inactivados, atenuados, de subunidades, de DNA y basadas en vectores. A continuación se describe cada tipo de vacuna y su avance en la búsqueda de una vacuna efectiva contra el hRSV.

**Tabla 2. Vacunas Inactivadas**

<b>TIPO DE VACUNA</b>	<b>FRACASOS</b>	<b>ÉXITOS</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>
<b>Vacuna inactivada con formalina FI-RSV</b>	La población vacunada presentó una respuesta inmune tipo Th2 que se asoció a la exacerbación de la sintomatología después del reto.		Se discontinuó su prueba.
<b>Vacunas de virosomas</b>		Se utilizó P3CSK4 como inductor de TLRs, favoreciendo un balance entre el tipo de respuesta inmune Th1 y Th2. Es protectora e inmunogénica en roedores.	Uso de virosomas de hRSV como candidato para vacuna.

**Tabla 3. Vacunas de ADN**

<b>TIPO DE VACUNA</b>	<b>FRACASOS</b>	<b>ÉXITOS</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>
<b>Plásmidos de ADN que expresan las proteínas F, G y N del hRSV.</b>	Poca incorporación del plásmido a la célula, y baja expresión de las proteínas deseadas.	Estas vacunas han sido inmunogénicas y protectoras en roedores y primates generando una respuesta Th1/Th2 nivelada.	Se ha mejorado su incorporación a las células y la expresión de las proteínas. Se ha mejorado su inmunogenicidad y protección con adyuvantes.

**Tabla 4. Vacunas vivas atenuadas**

TIPO DE VACUNA	FRACASOS	ÉXITOS	PERSPECTIVAS
<b>Fenotipos sensibles a la temperatura por pases en frío a 26 °C (Cpts 248/404 y Cpts 530/1009).</b>	Ambas vacunas pasaron por fase clínica 1, sin embargo los datos mostraron que la atenuación por pases sucesivos a bajas temperaturas no fue suficiente para su uso en infantes.	Se demostró que eran protectoras e inmunogénicas en roedores.	Actualmente los fenotipos atenuados por pase en frío sirven como base para técnicas recombinantes de atenuación.
<b>Recombinantes. Este tipo de vacunas presenta delección de genes o mutaciones atenuantes. (Cpts 248/404/1030/ΔSH).</b>	La Cpts 248/404/ΔNS2 y la Cpts 530/1009/ΔNS2 se han probado en niños y de acuerdo con el estudio resultaron inmunogénicas. Sin embargo la respuesta inmune humoral fue menor en aquellos infantes que todavía presentaban anticuerpos maternos residuales.	La Cpts 248/404/1030/ΔSH. Ha probado ser inmunogénica y protectora en humanos generando una respuesta Th2.	La Cpts 248/404/1030/ΔSH se encuentra en fase 1 clínica y es uno de los candidatos principales para ser la primera vacuna de hRSV.

**Tabla 5. Vacunas basadas en vectores**

TIPO DE VACUNA	FRACASOS	ÉXITOS	PERSPECTIVAS
<b>El modelo del virus de Vaccinia que expresa los genes que codifican para las proteínas F y G en su superficie.</b>	Los ensayos en primates demostraron su pobre inmunogenicidad y nula protección.	En el modelo en ratones este tipo de vacunas resulto inmunogénica y protectora.	
<b>El modelo del Adenovirus que expresa el gen que codifica para la proteína F en su superficie.</b>	Los ensayos en primates demostraron su pobre inmunogenicidad y nula protección.	En el modelo en ratones este tipo de vacunas resulto inmunogénica y protectora.	
<b>Staphylococcus carnosus expresando porciones de la proteína G.</b>	Protectividad limitada y variable en ratones.		

<b>Alfavirus , virus de Newcastle y Rinovirus humano 14 expresando las proteínas F y G como modelos virales para la expresión de los genes que codifican para las proteínas F y G.</b>	En el modelo en ratones este tipo de vacunas resultaron inmunogénicas y protectoras en grados variables.		
<b>Virus de la parainfluenza humana (HPIV3) y un virus quimérico de la parainfluenza humana y bovina ((BPIV)/HPIV-3) expresando las proteínas F y G.</b>		Este modelo quimérico viral se probó en primates donde demostró inmunogénico y protector.	Actualmente se encuentra en fase clínica 1 y es un candidato fuerte para ser la vacuna contra el hRSV.

**Tabla 6. Vacunas basadas en subunidades**

<b>TIPO DE VACUNA</b>	<b>FRACASOS</b>	<b>ÉXITOS</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>
<b>Proteína RSV F purificada.</b>	Las primeras pruebas clínicas con la proteína F purificada resultaron en la exacerbación de la enfermedad.	Demostró ser inmunogénica y protectora en roedores.	Se ha combinado con adyuvantes de TLRs para evitar la exacerbación de la enfermedad.
<b>Vacuna de las proteínas F, G y M.</b>		Ha avanzado a pruebas clínicas fase 1 donde ha demostrado ser inmunogénica en adultos sanos y en individuos de alto riesgo.	
<b>Péptido G de hRSV conjugado a la proteína G de estreptococos (BBG2Na).</b>	No avanzó de fase 3 de estudios clínicos debido a efectos adversos y un declive en el nivel de anticuerpos después de tres semanas.	Demostró ser protectora e inmunogénica en adultos.	
<b>Proteína F/G quiméricas.</b>		Se encuentran en estudios clínicos de fase 1.	
<b>Péptidos derivados de las proteínas F y G.</b>		Generan una inmunidad modesta en roedores.	

### 2.6.2.- Vacunas Inactivadas

En los sesentas se decidió inactivar al virus hRSV con formalina (FI-RSV por sus siglas en inglés Formalin inactivated RSV) y probarlo como vacuna en infantes. Los resultados fueron catastróficos ya que la vacuna no solo no protegió a los infantes contra la enfermedad, además exacerbó la enfermedad; incluso, el 80% de los niños vacunados que fueron infectados por el hRSV tuvo que ser hospitalizado y hubo dos muertes.<sup>69</sup> En retrospectiva, se piensa que se generó el mismo problema que se observa en los pacientes que se infectan frecuentemente con hRSV, es decir que los síntomas se agravan al exponerse repetidamente al agente infeccioso.<sup>69</sup> Esta exacerbación fue causada aparentemente por una respuesta inmune alterada por parte del hospedero. Esto se cree que se debe a una respuesta robusta mediada por linfocitos TCD4+ RSV-específicos que debió ser mantenida por un largo período de tiempo ya que la vacuna de FI-RSV no induce respuesta de linfocitos TCD8+ y los anticuerpos que produce son de poca afinidad.<sup>69,54</sup>

La inmunización con hRSV vivo atenuado o con vacunas basadas en vectores que codifican para la proteína F inducen una respuesta dominante Th1 con anticuerpos neutralizantes y linfocitos TCD8+, estos últimos asociados con una patología pulmonar mínima observada la infección viral.<sup>57,70</sup> En contraste, una inmunización con hRSV inactivado induce una respuesta Th2 dominante sin linfocitos TCD8+, lo que lleva a agravamiento de la patología pulmonar.<sup>69,71</sup> Recientemente se observó que mediante un adyuvante del TLR4 no se exacerbaba la enfermedad y la respuesta es Th1/Th2 balanceada.<sup>54,72</sup>

Recientemente se probó una vacuna de virosomas en ratones.<sup>73</sup> Los virosomas son no replicativos, consisten en la membrana reconstituida de virus envueltos con sus proteínas incluidas y pueden inclusive tener antígenos de otros patógenos. Se realizó un virosoma, usando como adyuvante el lipopéptido sintético P3CSK4 que es reconocido por TLR-2.<sup>73</sup> Se agregó el P3CSK4 ya que se ha visto que de esa manera se evita la enfermedad exacerbada tras la administración una vacuna inactivada seguida de una infección por hRSV.<sup>54,74</sup> Se

demostró que estos virosomas inducen una respuesta inmune protectora contra el virus mediante la creación de una gran cantidad de anticuerpos neutralizantes contra el virus y la secreción de IFN- $\gamma$  con un perfil Th1/Th2 balanceado.<sup>73</sup>

### **2.6.3.- Vacunas de ADN**

Al insertar un plásmido en una célula se espera que esta produzca las proteínas para las que codifican los genes insertados en el plásmido. De esta manera, células presentadoras de antígeno toman estos antígenos y los llevan al nódulo linfático donde se producen linfocitos citotóxicos y los linfocitos B producen anticuerpos contra las epítopes del hRSV.<sup>75</sup>

La generación de un prospecto de vacuna mediante la inserción del gen que codifica para un inmunógeno en un plásmido ha sido usada con éxito y se ha encontrado que puede inducir una inmunogenicidad alta con poco riesgo,<sup>76</sup> incluso se predice que con este sistema podrán desarrollarse vacunas contra el virus de la inmunodeficiencia humana<sup>75</sup> y se ha desarrollado una vacuna nueva contra la influenza tipo H1N1.<sup>77</sup> En modelos animales se han inyectado por diversas rutas plásmidos que contienen los genes de las proteínas F, G y N del hRSV y los resultados indican que son inmunogénicos y protectores.<sup>76,78</sup> Inclusive en un estudio realizado en primates menores a los dos meses de edad se encontró que la vacuna de DNA fue segura, protectora e inmunogénica.<sup>76</sup> Una ventaja de este tipo de vacunas es que pueden evitar la inmunosupresión de la respuesta anti-hRSV generada por los anticuerpos maternos.<sup>68,76</sup> También para aumentar la inmunogenicidad de la vacuna se ha demostrado que se pueden agregar al plásmido secuencias que codifiquen para moléculas adyuvantes.<sup>75</sup>

El problema común a este tipo de vacunas era la baja tasa de incorporación del plásmido a la célula y por lo tanto la cantidad de ADN requerida para generar una respuesta inmune clínicamente relevante.<sup>68</sup> Sin embargo se han creado técnicas de administración para solucionar este problema como son sistemas de parches dérmicos, sistemas en que se inyectan los plásmidos con

aire a presión y un sistema donde después de la inyección de los plásmidos con aguja se hace una electroporesis, que son estímulos eléctricos que hacen que se formen poros en las células facilitando la entrada de los plásmidos. Debido a su baja expresión y rápida inactivación se requiere de una administración múltiple y repetida de estas moléculas de ADN,<sup>68,75</sup> sin embargo mediante técnicas de biología molecular se han descrito secuencias que aumentan la expresión del gen de interés.<sup>75</sup>

#### **2.6.4.- Vacunas vivas atenuadas**

El reto principal de generar una cepa de hRSV atenuada es crear una vacuna con la capacidad de generar una respuesta inmune amplia y protectora sin provocar ninguna enfermedad clínica significativa. En un estudio realizado con vacunas con diferentes grados de atenuación se demostró que en ningún caso se exacerbó la enfermedad tras la infección natural.<sup>79</sup>

Se han utilizado cepas de virus que han sido mantenidas a través de pases seriales a 26°C durante varias generaciones (pase en frío), lo que ha resultado en hipersensibilidad a la temperatura y a llevado al aislamiento de cptsRSV (del inglés cold-passaged temperature sensitive RSV).<sup>68</sup> Estas cepas generarían una infección limitada a las vías aéreas superiores, generando inmunidad sin infectar las vías respiratorias inferiores. Han sido utilizadas con éxito en individuos sin previa exposición al hRSV. Vacunas atenuadas por pase en frío son la Cpts 248/404 y la Cpts 530/1009. Además, para aumentar el grado de atenuación, mediante ingeniería genética se han eliminado genes que codifican para proteínas del hRSV, de modo que tenemos la rA2 Cpts 248/404/1030/ $\Delta$ SH (MEDI-559), a la que se le eliminó el gen SH.<sup>68</sup> La proteína SH se sabe que disminuye la respuesta Th1, inhibiendo la respuesta antiviral del hospedero in vivo.<sup>80</sup> Un virus que carece de la proteína SH generaría por lo tanto una mayor inmunogenicidad. Esta vacuna se encuentra en pruebas clínicas en fase 1.<sup>66</sup>

Con las cepas virales modificadas genéticamente, se obtiene mayor y mejor atenuación y se conserva la inmunogenicidad.<sup>81,82</sup> Por ejemplo, se sabe que las



proteínas NS1 y NS2 se encargan de inhibir la respuesta inmune tipo IFN1; a partir de este dato, se ha planteado que una cepa de hRSV carente de NS1/NS2 tendría menor virulencia. De acuerdo con esta observación, se ha obtenido una cepa viral mutada en el gen NS2. Actualmente esta mutante  $\Delta$ NS2 se encuentra en fase de prueba en animales. Los resultados hasta el momento reportan efectividad. Estas vacunas en desarrollo son la hRSV A2 cpts248/404/ $\Delta$ NS2 recombinante y hRSV A2 cpts530/1009/ $\Delta$ NS2.<sup>68</sup>

El problema que se ha visto con las vacunas vivas atenuadas como la A2 cpts 248/404/ $\Delta$ NS2 y la rA2cp 248/404/1030/ $\Delta$ SH es que la respuesta de anticuerpos es menor (hay una inmunosupresión) en los infantes que todavía tienen anticuerpos maternos residuales.

#### **2.6.5.- Vacunas basadas en vectores**

Se han usado diferentes vectores virales para expresar uno o varios antígenos de hRSV. Esta estrategia tiene como objetivo inducir una respuesta inmune eficiente y evitar la inestabilidad genética. Sin embargo los logros al respecto han sido diversos.<sup>61</sup> Se ha tenido éxito al lograr inmunogenicidad y protección en modelos animales al expresar las proteínas F y G en vectores de virus de Sendai (SeV)<sup>83</sup>, de Newcastle<sup>84</sup>, de rinovirus 14<sup>85</sup>, de Adenovirus<sup>86</sup>, y de virus Vaccinia, este último ya probado en primates donde demostró no ser inmunogénico.<sup>87,88,89</sup> También se han usado como vectores el virus de parainfluenza humana (HPIV3) y un virus quimérico de parainfluenza bovino ((BPIV)/HPIV-3), expresando las proteínas F y G. Estos últimos demostraron ser inmunogénicos en primates.<sup>68,90,91</sup> La vacuna hecha con el vector (BIP)/HPIV3 está siendo evaluada en estudios clínicos.<sup>68,90,91</sup>

La vacuna PIV3/RSV F2 (MEDI-534) virus de Parainfluenza quimérico humano-bovino) se encuentra en estudios clínicos de fase 1 y se espera que se reporten datos de eficiencia para 2012. También se ha generado un vector de

*Staphylococcus carnosus* que expresa porciones de la proteína G del hRSV y que ya se encuentra en fase preclínica.<sup>92</sup>

#### **2.6.6.- Vacunas basadas en subunidades**

Estas vacunas consisten en proteínas virales donde su inyección directa ha tenido diversos grados de éxito. Las proteínas de la envoltura viral, entre las que la proteína G y la proteína F son las más importantes podrían ser usadas como antígenos. En los primeros experimentos en que se purificaron las proteínas F y G del hRSV y se usaron como vacuna, el resultado fue la exacerbación de la enfermedad como en el caso de la FI-RSV, sin embargo esto se ha arreglado con adyuvantes para TLRs.<sup>54,68,72</sup>

Las siguientes vacunas de subunidades han avanzado a pruebas clínicas: 3RSV F (proteína F purificada), una vacuna de subunidades que contiene las proteínas F, G y M, y BBG2Na un péptido G conjugado a la proteína G de estreptococos.<sup>68</sup>

La proteína F purificada provoca la formación de anticuerpos anti-RSV en niños y en adultos seropositivos. En general hay una correlación inversa entre la pureza de la preparación de la proteína F del hRSV y la inmunogenicidad subsecuente.<sup>93</sup> La coformulación de F/G/M es inmunogénica en adultos sanos y en individuos de alto riesgo. Las proteínas quiméricas F/G se encuentran en estudios clínicos en fase uno. Los péptidos derivados de las proteínas F y G generan una inmunidad modesta en roedores.<sup>68</sup> La vacuna BBG2Na se quedó en fase 3 de estudios clínicos debido a efectos adversos y un declive del nivel de anticuerpos después de tres semanas.<sup>68</sup>

### **3.- OBJETIVOS**

Recopilar y revisar la información bibliográfica concerniente al diseño, experimentación y aprobación de la vacuna contra el hRSV.

Escribir un trabajo monográfico detallado y actualizado de las diferentes estrategias para la elaboración de una vacuna contra hRSV, señalando sus fracasos, éxitos y perspectivas.

### **4.- METODOLOGÍA**

Para evaluar el estado del conocimiento de la enfermedad causada por el hRSV así como el progreso en el diseño de una vacuna, se realizó una búsqueda bibliográfica en libros y especialmente en revistas especializadas a través de las siguientes bases de datos de internet:

<http://www.medline.com/>

<http://www.scopus.com/>

<http://www.sciencedirect.com/>

<http://.bidi.unam.mx>

<http://www.ibt.unam.mx>

<http://www.ovid.com/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

## 5.- DISCUSIÓN

La posibilidad de tener una vacuna en el mercado parece lejana debido a las precauciones que es necesario tomar después de las complicaciones causadas por la vacuna FI-RSV, la cual ocasiono que el 80% de los niños que recibieron la vacuna y que se infectaron posteriormente con hRSV fueron hospitalizados y con dos casos fatales. Otra complicación importante de mencionar para obtener una vacuna es el tipo de inmunidad que genera el hRSV, ya que ni siquiera la infección natural misma genera una inmunidad protectora, así como por sus distintos tipos de mecanismo de virulencia. Son estas las razones por las que varias vacunas producidas por diferentes métodos no han sido lo suficientemente inmunogénicas para proteger contra el hRSV.

El desarrollo de una vacuna contra el hRSV es un campo de intensa actividad. Se están intentando diversos enfoques incluyendo vacunas inactivadas, de subunidades del virus, atenuadas, utilización de genes del hRSV expresados en plásmidos y proteínas del hRSV expresadas en vectores virales.

Tanto en las vacunas de subunidades como en las vacunas inactivadas se ha demostrado que inducen inmogenicidad sin exacerbar la enfermedad cuando se usan con un adyuvante para la inducción de TLRs, sin embargo debido al incidente causado en los sesentas por la inmunización con una vacuna inactivada se necesitarán muchas pruebas antes de que puedan ser usadas. Además se ha demostrado que al agregar un adyuvante para TLRs, estas vacunas se pueden potenciar e inclinar la balanza hacia una respuesta tipo Th1.

En el caso de las vacunas de subunidades la vacuna de proteína quimérica F/G se encuentra en fase clínica 1 y la vacuna BBG2Na se quedó en fase clínica 3 debido a complicaciones. Actualmente no hay vacunas inactivadas en fases clínicas sin embargo se ha demostrado que una vacuna de virosomas de hRSV genera inmunidad protectora en ratones.

Por otro lado las vacunas vivas atenuadas, las de vectores y las de plásmidos también tienen buenas posibilidades de lograr su objetivo. En el caso

de las de vectores, el vector quimérico hecho con virus de parainfluenza humano y bovino da buenos resultados en cuanto a inmunogenicidad y protección, se encuentra en fase clínica 1, y es uno de los candidatos más fuertes para ser la vacuna del hRSV.

Las vacunas atenuadas también son inmunogénicas y protectoras, sin embargo en las vacunas atenuadas por pase en frío podría presentarse reversión al genotipo viral original y ocasionar enfermedad. De este tipo de vacunas hay dos prospectos importantes que son vacunas atenuadas por pase en frío y por ingeniería genética se eliminaron los genes que codifican para las proteínas SH y NS2 respectivamente. Ambas se encuentran en estudios clínicos aunque se ha demostrado que la respuesta de anticuerpos es menor (hay una inmunosupresión) en los infantes que todavía tienen anticuerpos maternos residuales.

Las vacunas de plásmidos de DNA apenas se encuentran en experimentación, sin embargo son una buena opción ya que aunque es el método más nuevo, se han visto avances grandes en pruebas con animales y es un método que inclusive se utiliza en la generación de varias vacunas y tratamientos de otras enfermedades. Este método consiste en introducir un plásmido a la célula para que esta produzca una proteína determinada y después se generen anticuerpos contra esta. Además se puede introducir la secuencia que codifique para una molécula adyuvante dentro del mismo plásmido.

Varios de estos enfoques presentan avances importantes, pero la reacción inflamatoria que causa la infección viral representa grandes problemas que aún deben resolverse. Por otro lado, el desarrollo de nuevas tecnologías deberán favorecer el desarrollo de las ansiadas vacunas en un futuro que se espera sea cercano. Realmente sería difícil prever cual va a ser la primera vacuna contra el hRSV autorizada para su uso.

## **6- CONCLUSIÓN**

Es muy difícil conceptualizar una vacuna contra el hRSV que produzca inmunidad a largo plazo cuando la infección natural misma no lo hace. Sin embargo, avances como las vacunas que se encuentran en fases clínicas o aquellas en fases preclínicas hacen pensar que la solución a este problema está cercana y aunque tendría que ser evaluada en humanos por un largo periodo de tiempo, una vacuna eficiente podría desarrollarse para ser aplicada en niños de 0 a 5 años, adultos mayores y pacientes inmunocomprometidos.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1- Tirado Mendoza, Rocío Gabriela. Efecto de la persistencia del virus sincitial respiratorio en la expresión del gen de la interleucina 8. Tesis Doctorado. UNAM. Facultad de Medicina. 2006.
- 2- Collins LP, Crowe EJ. Respiratory syncytial virus and Metapneumovirus: Fields Virology, Raven Press, New York. 1990; 1602-1646.
- 3- Rudan I, Boschi-Pinto C, Biloglav Z, Mulholland K, Campbelle H. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. *Bull World Health Organ.* 2008; 86:408–416.
- 4- Scott JAG, Brooks WA, Peiris JSM, Holtzman D, Mulholland EK. Pneumonia research to reduce childhood mortality in the developing world. *J Clin Invest* 2008; 118:1291–1300.
- 5- Ranganathan SC, Sonnappa S. Pneumonia and other respiratory infections. *Pediatr Clin N Am.* 2009; 56:135–156.
- 6- Forbes M. Strategies for preventing respiratory syncytial virus. *Am J Health-Syst Pharm.* 2008; 65(8):13-19.
- 7- Schildgen O. The lack of protective immunity against RSV in the elderly. *Epidemiol Infect.* 2009; 137:1687-1690.
- 8- Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory Syncytial Virus Infection in Elderly and High-Risk Adults. *N Engl J Med.* 2005; 352:1749-1759.
- 9- Fragoso Sánchez, Alberto. Virus Sincitial Respiratorio y sus implicaciones en la patogénesis de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Química. 2010
- 10- Boyce et al. Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus infection among children in Medicaid. *The Journal of Pediatrics.* 2000; 137:865-870.
- 11- Collins PL, Huang YT, Wertz GW. Identification of a Tenth mRNA of Respiratory Syncytial Virus and Assignment of Polypeptides to the 10 Viral Genes. *Journal of Virology.* 1984; 49:572-578.

- 12- Power UF. Respiratory syncytial virus (RSV) vaccines—Two steps back for one leap forward *Journal of Clinical Virology*. 2008; 41:38–44.
- 13- Spann KM, Tran KC, Collins PL. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 on human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines. *J virol*. 2005; 79:5353-5362.
- 14- Fuentes S, Tran KC, Luthra P, Teng MN, He B. Function of the Respiratory Syncytial Virus Small Hydrophobic Protein. *Journal of Virology*. 2007; 81:8361–8366.
- 15- Wilson RL, Fuentes SM, Wang P, Taddeo EC, Alicia Klatt A, Henderson AJ, He B. Function of Small Hydrophobic Proteins of Paramyxovirus. *Journal of Virology*; 2006: 80(4):1700–1709.
- 16- Martinez I, Melero JA. Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. *J Gen Virol*. 2000; 81:2715–2722.
- 17- Collins PL, Graham BS. Viral and Host Factors in Human Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis. *Journal of Virology*; 2008; 82(5):2040-2055.
- 18- Arnold R, König B, Werchau H, König W. Respiratory syncytial virus deficient in soluble G protein induced an increased proinflammatory response in human lung epithelial cells. *Virology*. 2004; 330(2):384-397.
- 19- Tripp RA, Jones LP, Haynes LM, et al. 2001. CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat. Immunol*. 2001; 2:732–738.
- 20- Openshaw PJ, Tregoning JS. Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18:541–55.
- 21- Malhotra R, Ward M, Bright H, Priest R, Foster MR, Hurle M, Blair E, Bird M. Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells. *Microbes Infect*. 2003; 5:123–133.
- 22- Gower TL, Peeples ME, Collins PL, Graham BS. RhoA is activated during respiratory syncytial virus infection. *Virology*. 2001; 283:188-196.



- 23- Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L *et al.* Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol.* 2000; 1:398–401.
- 24- Finberg RW, Wang JP, Kurt-Jones EA. Toll-like receptors and viruses. *Reviews in Medical Virology.* 2007; 17(1):35-43.
- 25- Fearn R, Collins PL. Role of the M2-1 Transcription Antitermination Protein of Respiratory Syncytial Virus in Sequential Transcription. *J Virol.* 1999; 73(7):5852-5864.
- 26- Bermingham A, Collins PL. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 11259-11264.
- 27- Vergara H, Gutierrez M, Mohapatra S. Biología molecular del Virus Sincitial Respiratorio y desarrollo de estrategias profilácticas. *Salud Uninorte.* 2006; 22(2):135-153.
- 28- Mansbach JM, Camargo CA. Respiratory Viruses in Bronchiolitis and Their Link to Recurrent Wheezing and Asthma. *Clin Lab Med.* 2009; 29:741–755.
- 29- Shah S, Sharieff GQ. Pediatric Respiratory Infections *Emerg Med Clin N Am.* 2007; 25:961-979.
- 30- Stensballe LG *et al.* The causal direction in the association between respiratory syncytial virus hospitalization and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 123:131-137.
- 31- Thorburn K, Harigopal S, Reddy V, Taylor N, van Saene HKF. High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. *Thorax.* 2006; 61:611–615.
- 32- Martinez FD. Heterogeneity of the Association between Lower Respiratory Illness in Infancy and Subsequent Asthma. *Proc Am Thorac Soc.* 2005; 2:157–161.
- 33- Ralston S, Hill V. Incidence of Apnea in Infants Hospitalized with Respiratory Syncytial Virus. Bronchiolitis: A Systematic Review. *The journal of pediatrics.* 2009; 155:728-33.

- 34- Wilkinson TMA, Donaldson GC, Johnston SL, Openshaw PJM, and Wedzicha JA. Respiratory Syncytial Virus, Airway Inflammation, and FEV1 Decline in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173:871-876.
- 35- Olsen MR, Varga SM. Pulmonary immunity and immunopathology: lessons from respiratory syncytial virus. *Expert Rev Vaccines.* 2008; 7(8):1239–1255.
- 36- Behera AK, Matsuse H et al. Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280:188-195.
- 37- Kureishi Y, Kobayashi S et al. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem.* 1997; 272:12257-12260.
- 38- Bueno SM et al. Host immunity during RSV pathogenesis. *International Immunopharmacology.* 2008; 8:1320-1329.
- 39- Tripp RA, Pathogenesis of Respiratory Syncytial Virus Infection. *Viral Immunology.* 2004; 17(2):165-181.
- 40- Graham BS, Rutigliano JA, Johnson TR. Respiratory Syncytial Virus Immunobiology and Pathogenesis. *Virology.* 2002; 297:1-7.
- 41- McNamara PS, Smyth RL The pathogenesis of respiratory syncytial virus disease in childhood. *British Medical Bulletin.* 2002; 61: 13–28.
- 42- Garofalo RP, Patti J, Hintz KA, et al. Macrophage inflammatory protein–1alpha (not T helper type 2 cytokines) is associated with severe forms of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2001; 184:393–399.
- 43- Harrison, A.M., C.A. Bonville, H.F. Rosenberg, et al. 1999. Respiratory syncytial virus–induced chemokine expression in the lower airways: eosinophil recruitment and degranulation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; 159:1918–1924.
- 44- Tang YW, Graham BS. T cell source of type 1 cytokines determines illness patterns in respiratory syncytial virus-infected mice. *J Clin Invest* 1997; 99:2183–2191.

- 45- Harker J, Bukreyev A, Collins PL, Wang B, Openshaw PJM, Tregoning JS. Virally Delivered Cytokines Alter the Immune Response to Future Lung Infections. *Journal of virology*. 2007; 81(23):13105–13111.
- 46- Hornsleth A, Loland L, Larsen LB. Cytokines and chemokines in respiratory secretion and severity of disease in infants with respiratory syncytial virus (RSV) infection. *Journal of Clinical Virology*. 2001; 21:163–170.
- 47- Castro M, Schweiger T, Yin-DeClue H, Ramkumar TP, Christie C, Zheng J, Cohen R, Schechtman KB, Strunk R, Bacharier LB. Cytokine response after severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in early life. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 122(4):726-733.
- 48- Everard ML, Swarbrick A, Wright M et al. Analysis of cells obtained by bronchial lavage of infants with respiratory syncytial virus infection. *Arch Dis Child* 1994; 71:428–432.
- 49- Kimpen JL. Respiratory syncytial virus and asthma. The role of monocytes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163:7–9.
- 50- O’Sullivan SM. Asthma Death, CD8+T Cells, and Viruses. *Proc Am Thorac Soc*. 2005; 2:162-165.
- 51- Ehlenfeld DR, Cameron K, and Welliver. Eosinophilia at the time of respiratory syncytial virus bronchiolitis predicts childhood reactive airway disease. *Pediatric*. 2000; 105:79–83.
- 52- Schwarze J, Cieslewicz G, Hamelmann E, et al. IL-5 and eosinophils are essential for the development of airway hyperresponsiveness following acute respiratory syncytial virus infection. *J Immunol*. 1999; 162:2997–3004.
- 53- Glezen WP, Paredes A, Allison JE, Taber LH, Frank AL. Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level. *J Pediatr*. 1981; 98:708-715.
- 54- Delgado MF et al. Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nature Medicine*. 2009; 15(1):34-41.

- 55- Hashem M, Hall CB. Respiratory syncytial virus in healthy adults: the cost of a cold. *Journal of Clinical Virology*. 2003; 27:14-21.
- 56- Kusel MMH, y cols. Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 119:1105-1110.
- 57- Peebles RS Jr, Graham BS. Pathogenesis of respiratory syncytial virus infection in the murine model. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2:110–115.
- 58- Rosete DP, Archundia FJ, Cabello C, Manjarrez ME. Patogenia de las infecciones respiratorias por virus. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 2002; 15(4):239-254.
- 59- Braciale TJ. Respiratory syncytial virus and T cells: interplay between the virus and the host adaptive immune system. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2:141–146.
- 60- Alwan WH, Record FM, Openshaw PJ. CD41 T cells clear virus but augment disease in mice infected with respiratory syncytial virus. Comparison with the effects of CD81 T cells. *Clin Exp Immunol* 1992; 88:527–536.
- 61- Empey KM, Stokes Peebles RS, Kolls JK. Pharmacologic Advances in the Treatment and Prevention of Respiratory Syncytial Virus. *Clinical Infectious Diseases*. 2010; 50(9):1258–1267.
- 62- Simoes EAF, Groothuis JR, Carbonell-Estrany X, Rieger CHL, Mitchell I, Fredrick LM, Kimpen JLL, and the palivizumab long-term respiratory outcomes study group. Palivizumab Prophylaxis, Respiratory Syncytial Virus, and Subsequent Recurrent Wheezing. *J Pediatr*. 2007; 151:34-42.
- 63- Geskey JM, Thomas NJ, Brummel GL. Palivizumab: a review of its use in the protection of high risk infants against respiratory syncytial virus (RSV). *Biologics: Targets & Therapy*. 2007; 1(1):33–43.
- 64- Chang RKR, Chen AY. Impact of Palivizumab on RSV Hospitalizations for Children with Hemodynamically Significant Congenital Heart Disease. *Pediatr Cardiol*. 2010; 31:90–95.
- 65- Olszewska W, Openshaw P. Emerging drugs for respiratory syncytial virus infection. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2009; 14(2):207–217.

- 66- Storey S. Respiratory syncytial virus market. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010; 9:15-16.
- 67- Carbonell-Estrany X, Simões EA, Dagan R et al. Motavizumab for Prophylaxis of Respiratory Syncytial Virus in High-Risk Children: a noninferiority trial. *Pediatrics*.2010; 125(1): 35-51.
- 68- Murata Y. Respiratory Syncytial Virus Vaccine Development. *Clin Lab Med* 2009; 29:725–739.
- 69- Varga SM. Fixing a failed vaccine. *Nature Medicine*. 2009; 15(1):21-22.
- 70- Openshaw PJ, Clarke SL, Record FM. Pulmonary eosinophilic response to respiratory syncytial virus infection in mice sensitized to the major surface glycoprotein G. *Int Immunol*. 1992; 4:493–500.
- 71- Murphy BR, Sotnikov AV, Lawrence LA, et al. Enhanced pulmonary histopathology is observed in cotton rats immunized with formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) or purified F glycoprotein and challenged with RSV 3–6 months after immunization. *Vaccine*. 1990; 8:497–502.
- 72- Hancock GE, et al. Adjuvants recognized by toll-like receptors inhibit the induction of polarized type 2 T cell responses by natural attachment (G) protein of respiratory syncytial virus. *Vaccine*. 2003; 21:4248-4358.
- 73- Stegmann T, Kamphuisa T, Meijerhofa T, Goudb E, Haana A, Wilschuta J. Lipopeptide-adjuvanted respiratory syncytial virus virosomes: A safe and immunogenic non-replicating vaccine formulation. *Vaccine*. 2010; 28:5543–5550.
- 74- Boukhvalova MS, Prince GA, Soroush L, Harrigan DC, Vogel SN, Blanco JC. The TLR4 agonist, monophosphoryl lipid A, attenuates the cytokine storm associated with respiratory syncytial virus vaccine-enhanced disease. *Vaccine*. 2006; 24:5027–5035.
- 75- Morrow MP, Weiner DB. DNA drugs come of age. *Scientific American*. 2010; 49-53.

76- Vaughan K, Rhodes GH, Gershwin LJ. DNA immunization against respiratory syncytial virus (RSV) in infant rhesus monkeys. *Vaccine*. 2005; 23:2928–2942.

77- Wei C et al. Induction of Broadly Neutralizing H1N1 Influenza antibodies by vaccination. *Science*. 2010; 329:1060-1064.

78- Wu H, Dennis VA, Pillai SR, Singh SR. RSV fusion (F) protein DNA vaccine provides partial protection against viral infection. *Virus Research*; 2009; 145:39–47.

79- Wright PF, Karron RA, Belshe RB, Shi JR, Randolph VB, Collins PL, O'Shea AF, Gruber WC, Murphy BR. The Absence of Enhanced Disease with Wild-Type Respiratory Syncytial Virus Infection Occurring After Receipt of Live, Attenuated, Respiratory Syncytial Virus Vaccines. *Vaccine*. 2007; 25(42):7372–7378.

80- Karron RA, Buonagurio DA, Georgiu AF, Whitehead SS, Adamus JE, Clements-Mann ML, Harris DO, Randolph VB, Udem SA, Murphy BR, Sidhu MS. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication *in vitro*: Clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1997; 97:13961–13966.

81- Collins PL and Murphy BR. New Generation Live Vaccines against Human Respiratory Syncytial Virus Designed by Reverse Genetics. *Proc Am Thorac Soc*. 2005; 2:166–173.

82- Whitehead SS, Hill MG, Firestone CY, St Claire M, Elkins WR, Murphy BR, Collins PL. Replacement of the F and G Proteins of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Subgroup A with Those of Subgroup B Generates Chimeric Live Attenuated RSV Subgroup B Vaccine Candidates. *Journal of Virology*. 1999; 73(12):9773-9780.

83- Takimoto T, Hurwitz JL, Zhan X, et al. Recombinant sendai virus as a novel vaccine candidate for respiratory syncytial virus. *Viral Immunol* 2005; 18(2):255–66.

84- Murawski MR, McGinnes LW, Finberg RW, Kurt-Jones EA, Massare MJ, Smith G, Heaton PM, Fraire AE, Morrison TG. Newcastle Disease Virus-Like Particles Containing Respiratory Syncytial Virus G Protein Induced Protection in BALB/c Mice, with No Evidence of Immunopathology. *Journal of Virology*. 2010; 84:1110-1123.

85- Dollenmaier G, Mosier SM, Scholle F, et al. Membrane-associated respiratory syncytial virus F protein expressed from a human rhinovirus type 14 vector is immunogenic. *Virology*. 2001; 281:216–230.

86- Kohlmann R, Schwannecke S, Tippler B, Ternette N, Temchura VV, Tenbusch M, Uberla K, and Grunwald T. Protective Efficacy and Immunogenicity of an Adenoviral Vector Vaccine Encoding the Codon-Optimized F Protein of Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Virology*. 2009; 83:12601-12610.

87- Antonis AFG, Most RG, Suezzer Y, Stockhofe-Zurwieden N, Dausa F, Sutter G, Schrijver RS. Vaccination with recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing bovine respiratory syncytial virus (bRSV) proteins protects calves against RSV challenge. *Vaccine*. 2007; 25:4818–4827.

88- Fu Y, He J, Zheng X, Wud Q, Zhang M, Wang X, Wangd Y, Xie C, Tang Q, Wei W, Wang M, Song J, Qua J, Zhang Y, Wang X, Hong T. Intranasal immunization with a replication-deficient adenoviral vector expressing the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus elicits protective immunity in BALB/c mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009; 381:528–532.

89- Collins PL, Purcell RH et al. Evaluation of vaccinia virus recombinants that express the surface glycoproteins of human respiratory syncytial virus. *Vaccine*. 1990; 8:164-168.

90- Tang RS, MacPhail M, Schickli JH, Kaur J, Robinson CL, Lawlor HA, Guzzetta JM, Spaete RR, Haller AA. Parainfluenza Virus Type 3 Expressing the Native or Soluble Fusion (F) Protein of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Confers Protection from RSV Infection in African Green Monkeys. *Journal of Virology*. 2004; 78(20):11198-11207.

91- Tang RS, Schickli JH, MacPhail M, et al. Effects of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus antigen insertion in two 30 proximal genome positions of bovine/human parainfluenza virus type 3 on virus replication and immunogenicity. *J Virol* 2003; 77:10819–28.

92- Cano F, et al. Partial protection to respiratory syncytial virus (RSV) elicited in mice by intranasal immunization using live staphylococci with surface-displayed RSV-peptides. *Vaccine*. 2000; 18:2743-2752.

93- Piedra PA, Cron SG, Jewell A, Hamblett N, McBride R, Palacio MA, Ginsberg R, Oermann CM, Hiatt PW. Immunogenicity of a new purified fusion protein vaccine to respiratory syncytial virus: a multi-center trial in children with cystic fibrosis. *Vaccine*. 2003; 21:2448–2460.

#### SITIOS DE INTERNET

- a) Hall CB. Respiratory syncytial virus in young children. [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com).  
Publicado en línea el 16 de Abril del 2010.
- b) <http://www.un.org/spanish/millenniumgoals/childhealth.shtml>
- c) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>
- d) <http://www.synagis.com/>
- e) <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess>