



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Análisis *in vitro* del péptido antiviral HRA2pl
producido en tabaco, contra Ortopneumovirus y
Rubulavirus humanos”**

Tesis que presenta

Marcela Solis Rodríguez

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de Tesis

Ángel Gabriel Alpuche Solís

San Luis Potosí, S.L.P., febrero 2018



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Análisis in vitro del péptido antiviral HRA2pl producido en tabaco, contra Ortopneumovirus y Rubulavirus humanos**" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Marcela Solís Rodríguez** y aprobada el dos de marzo del dos mil dieciocho por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Director de la tesis

Dr. Rocío Gabriela Tirado Mendoza
Miembro del Comité Tutorial

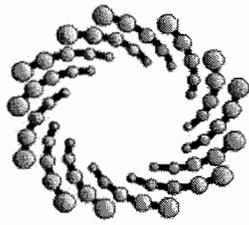
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Miembro del Comité Tutorial



Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas perteneciente a la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. y en el Laboratorio de Biología Molecular del Citoesqueleto de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No.589035) y el apoyo del proyecto CONACYT de Ciencia Básica No. 257528.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 179 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 2 días del mes de marzo del año 2018, se reunió a las 13:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Dra. Rocío Gabriela Tirado Mendoza
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Presidenta
Secretaria
Sinodal

IPICYT
UNAM
IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Marcela Solis Rodríguez

sobre la Tesis intitulada:

Análisis in vitro del péptido antiviral HRA2pl producido en tabaco, contra Ortopneumovirus y Rubulavirus humanos

que se desarrolló bajo la dirección de

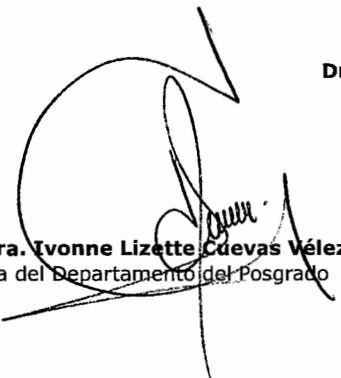
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 15:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 2 días del mes de marzo de 2018.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico



DEDICATORIA

A Victorina Cruz Antonio, porque aunque no trascendió en nada, más que en mi vida, gracias a ella he luchado cada día por no quedarme en donde estoy, para poder ayudar a los demás.

A Dios porque aunque no soy lo mejor entre lo que pudo escoger, lo ha hecho.

A mi familia por ser mi motivación para esforzarme y soñar.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Dios porque tanto amor.

A mis padres Griselda Rodríguez Cruz y Juan Gastón Solís Ávalos, mi hermana Estefania Solis Rodríguez y a Said Alejandro Salazar Solis, por apoyarme y alentarme cuando es necesario.

Al Dr. Ángel G. Alpuche Solís por haberme aceptado en su equipo de trabajo y por confiarme este proyecto.

A los técnicos de laboratorio Q.F.B. Rosalba Castillo Collazo y Lic. Biólogo Salvador Ambríz Granados por facilitarnos los reactivos y el material.

A la Dra. Rocío Gabriela Tirado Mendoza, Q.F.B. Karla Zárate Conde, Dr. Guillermo Pastor Palacios, M.C. Ma. Teresa Esquivel Contreras, M.C. Karen Lizbeth Reyes Barrera, M.C. Norma Angélica Luna Cruz y M.C. Angélica Romero por enseñarme las técnicas que utilicé en este proyecto y a mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular de Plantas del IPICYT por el apoyo y los consejos que me dan.

Al IPICYT por haberme aceptado en su programa de posgrado y finalmente agradezco a CONACYT por la beca 589035, otorgada para la realización de este trabajo.

A la Dra. Araceli Patrón Soberano del LINAN y al LANBAMA por las facilidades otorgadas.

CONTENIDO

DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS	VI
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABLAS	X
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 AGENTES ETIOLÓGICOS	3
1.1.1 <i>Familia Pneumoviridae</i>	3
1.1.2 <i>Familia Paramyxoviridae</i>	6
1.2 PROCESO DE INFECCIÓN	8
1.2.1 <i>Glicoproteína F</i>	8
1.2.2 <i>Transmisión</i>	10
1.2.3 <i>Manifestaciones clínicas</i>	10
1.2.4 <i>Patogénesis</i>	11
1.2.5 <i>Diagnóstico</i>	12
1.2.6 <i>Tratamiento</i>	13
1.3 PLANTAS COMO PLATAFORMAS PARA PRODUCIR PROTEÍNAS RECOMBINANTES.	15
1.3.1 <i>Sistema de transformación transitoria Magniffection®</i>	16
2 OBJETIVO	19
2.1 OBJETIVO GENERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 HIPÓTESIS	20
4 METODOLOGÍA	21
4.1 TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA POR AGROINFILTRACIÓN (MAGNIFECTION®)	21
4.2 CONTROL DE LA AGROINFILTRACIÓN	21
4.3 EXTRACCIÓN DE ADN VEGETAL	22
4.4 EXTRACCIÓN DE ARN VEGETAL Y SÍNTESIS DE ADNc.	22
4.5 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	23
4.6 ANÁLISIS DEL TRANSGÉN	24
4.7 ANÁLISIS DEL TRANSCRITO	24
4.8 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	24
4.8.1 <i>Cuantificación por método de Bradford</i>	24
4.8.2 <i>Electroforesis de proteínas</i>	25
4.8.3 <i>Dot-blot</i>	25
4.8.4 <i>Western Blotting</i>	25
4.8.5 <i>Revelado en película</i>	26
4.9 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	26
4.9.1 <i>Preparación de la columna</i>	26

4.9.2	<i>Procedimiento de purificación</i>	27
4.10	EXPRESIÓN DE HRA2PL EN BACTERIAS	27
4.10.1	<i>Inducción de células de E. coli BL21</i>	27
4.10.2	<i>Diálisis</i>	28
4.11	CULTIVO CELULAR	28
4.11.1	<i>Propagación de células HEp-2 y Vero</i>	28
4.11.2	<i>Viabilidad celular</i>	29
4.11.3	<i>Ensayo de unión</i>	29
4.12	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
5	RESULTADOS	32
5.1	ENSAYO DEL CONTROL DE INFECCIÓN TRANSITORIA MAGNIFECTION®	32
5.2	DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN GENÓMICO	32
5.3	IDENTIFICACIÓN DEL TRANSCRITO	32
5.4	IDENTIFICACIÓN DEL PÉPTIDO RECOMBINANTE	33
5.5	INDUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PÉPTIDO RECOMBINANTE EN BACTERIAS	33
5.6	Diálisis de la elución 4 de <i>E. coli</i> BL21	34
5.7	PURIFICACIÓN DE HRA2pl A PARTIR DE <i>N. benthamiana</i>	35
5.8	EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBIDOR DE HRA2pl	35
5.8.1	<i>Ensayo de citotoxicidad</i>	35
5.8.2	<i>Ensayo de unión</i>	36
6	CONCLUSIONES	38
7	PERSPECTIVAS	39
8	REFERENCIAS	40
9	TABLA	45
10	FIGURAS	46
11	MATERIAL SUPLEMENTARIO	60

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.- Diagrama de una partícula de Metapneumovirus humano.	6
2.-Proteína F.	11
3.-Sistema Magniffection ®.	21
4.- Diseño de la placa del ensayo de unión.	46
5.-Expresión de GFP, el control positivo de la agroinfiltración.	47
6.-PCR de actinas.	48
7.-Gel de calidad de ARN.	49
8.-Detección de los transcritos de actinas y del gen.	50
9.- Electroforesis de proteínas SDS-PAGE Tricina al 16%.	51
10.- Detección del péptido antiviral por quimioluminiscencia	52
11.- Inducción y extracción de proteínas producidas en <i>E. coli</i> BL21	53
12.- Electroforesis de proteínas purificadas por columna de níquel y transferidas a la membrana de PVDF	54
13.- Membrana Western blot de las proteínas inducidas y purificadas a partir de <i>E. coli</i> BL21.	55
14.- Viabilidad celular	56
15.- Evaluación del efecto citopático	57
16.- Ensayo de inhibición viral en placas tipo ELISA	58
17. Inhibición viral	59

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1.-Epidemiología de los virus más frecuentes en IRA'S.	2
2.- Proteínas de los virus pertenecientes a la familia <i>Pneumoviridae</i> .	4
3.-Concentración de las muestras para la evaluación de la viabilidad celular.	45
4.-Tabla de cepas y plásmidos	60

RESUMEN

Análisis *in vitro* del péptido antiviral HRA2pl producido en tabaco, contra Ortopneumovirus y Rubulavirus humanos

Las infecciones respiratorias agudas (IRA's) representan un importante problema de salud ya que ocupan el segundo lugar a nivel mundial de morbilidad en niños menores de 5 años. Los principales agentes causales son los virus, entre los cuales se encuentran el Ortopneumovirus (hOPV), Metapneumovirus (hMPV), Respirivirus (hREV) y Rubulavirus humanos (hRUV) e Influenza Virus (IV), entre otros. Para el 2012 el costo estimado de las IRA's por paciente hospitalizado en México es de aproximadamente \$9, 000 dólares. En este estudio se agroinfiltraron plantas de *Nicotiana benthamiana* de 6 semanas de edad con *Agrobacterium tumefaciens*, para expresar el péptido HRA2pl que diseñado a partir del péptido HRA que es parte de la proteína de fusión F de hMPV. El péptido fue identificado por Dot blot y Western blot, fue purificado posteriormente por columna de afinidad de níquel y se analizó su efecto antiviral en líneas celulares de mamífero (HEp-2 y Vero) contra los virus hOPV y hRUV. En el ensayo de inhibición viral en placa se observó que para hOPV B la menor dosis infectiva media del cultivo celular (TCID₅₀) fue de 362.6 con la dosis del péptido de 2.6×10^{-3} µg/mL y para hRUV-2 la menor TCID₅₀ fue de 936.7 con la dosis del péptido de 1.8×10^{-3} µg/mL. Es importante resaltar que a pesar de estar diseñado para inhibir la fusión virus-célula de hMPV, es funcional también contra otros virus, como hOPV B y hRUV-2 debido a que tienen mecanismos de entrada son similares, por lo cual este péptido puede ser utilizado como tratamiento profiláctico en guarderías y hospitales para prevenir infecciones por estos patógenos.

Palabras clave: Enfermedades respiratorias, transformación transitoria de plantas, biofármacos.

ABSTRACT

***In vitro* analysis of the antiviral peptide HRA2pl produced in tobacco, against human Orthopneumovirus and Rubulavirus**

Acute respiratory infections (ARI's) represent a major health problem since they can rank second worldwide in terms of morbidity and mortality in children under 5 years old. The main causative agents are viruses; among the most frequent are human Orthopneumovirus (hOPV), Metapneumovirus (hMPV), Respirovirus (hREV), Rubulavirus (hRUV) and Influenza Virus (IV), among others. For the 2012, the estimated cost of AIR's per patient in Mexico was of approximately \$ 9,000 USD. In this study, 6-week-old *Nicotiana benthamiana* plants were agroinfiltrated with *Agrobacterium tumefaciens*, to express the HRA2pl, which was designed from HRA, a fragment of the fusion protein F of hMPV. The peptide was detected by Dot blot and Western blot and was purified by nickel affinity column to analyze its antiviral effect on human cellular lines (HEp-2 and Vero) against hOPV and hRUV viruses. In plaque viral inhibition assay, it was shown that for hOPV B, the lowest median tissue culture infective dose (TCID₅₀) was of 362.6 with the peptide dose of 2.6×10^{-3} µg/mL and for hRUV-2 the TCID₅₀ was 936.7 with the peptide dose of 1.8×10^{-3} µg/mL. It is important to highlight that although the peptide was designed to inhibit the hMPV virus-cell fusion, it is also functional for other viruses, such as hOPV B and hRUV-2 due to their similar infection mechanisms. Therefore this peptide can be used as a prophylactic treatment in day care centers and hospitals to prevent infections by these pathogens.

Key words: Respiratory infections, transient plant transformation, biopharmaceuticals

1 INTRODUCCIÓN

1
2 Las infecciones respiratorias agudas (IRA's) representan un importante problema
3 de salud ya que ocupan el segundo lugar a nivel mundial de morbilidad en
4 niños menores de 5 años, también son frecuentes en personas de la tercera edad,
5 así como sujetos inmunocomprometidos (Marquez-Escobar et al. 2015). Se
6 calcula que cada año mueren alrededor del 15% de infantes menores de 5 años
7 por neumonía. A pesar de que las IRA's se presentan en todo el mundo, son los
8 países en vías de desarrollo los que presentan mayores índices de mortalidad
9 (Esposito and Mastrolia 2016) superando en un 20% a los países desarrollados
10 (Panda et al. 2014). En México, hasta el 2016 el INEGI reportó que las IRA's
11 ocupan el 9° lugar de mortalidad, provocando 21, 572 de defunciones en la
12 población general, pero en infantes de 1 a 4 años ocupan el tercer lugar causando
13 500 muertes anuales (INEGI 2016).

14 La mayoría de las IRA's son causadas por virus, el agente etiológico más
15 frecuente es el Ortopneumovirus humano (hOPV) [antes llamado Virus Sincicial
16 Respiratorio humano (hRSV)] causante del 20% de hospitalizaciones en infantes
17 menores de un año (Fraser et al. 2017), seguido del Metapneumovirus humano
18 (hMPV) con 5-15% de hospitalizaciones (Wei et al. 2014), Respirovirus humano
19 (hREV) y Rubulavirus humano (hRUV) [antes conocidos como virus de
20 Parainfluenza humano (hPIV)], seguidos del Virus de la Influenza (IV), Coronavirus
21 y Rinovirus, entre otros. La epidemiología de algunos de estos virus se presenta en
22 la Tabla 1. Muchos de los casos de IRA's se atribuyen a más de un patógeno
23 (Panda et al. 2014), lo que hace difícil su diagnóstico, asimismo, se ha sugerido
24 que probablemente existan patógenos aún desconocidos circulantes, los cuales
25 son causantes de este tipo de enfermedades (Esposito and Mastrolia 2016). Así
26 ocurrió en Holanda, durante el año de 2001, cuando van den Hoogen y
27 colaboradores reportaron un nuevo agente etiológico el hMPV el cual presenta
28 manifestaciones clínicas similares a los causados por hOPV; ya que ambos
29 patógenos pueden llegar a causar resfriados severos, bronquiolitis y neumonía,
30 además de que los factores de riesgo, como la edad (infantes menores de 5 años

31 y personas de la tercera edad) y el estado de compromiso de la inmunidad de los
 32 pacientes, son también parecidos, lo cual hace que su diagnóstico clínico sea
 33 difícil (Wei et al. 2013).

34 **Tabla 1**

35 Epidemiología de los virus más frecuentes en infecciones respiratorias agudas
 36 (Modificado de Hodinka 2016).
 37

Virus	Población afectada	Frecuencia	Síndromes asociados
Ortopneumovirus humano	Infantes <5 años (más frecuente de 6 meses a 2 años), personas de la tercera edad.	Otoño e invierno en climas templados.	Bronquiolitis y neumonía.
Metapneumovirus humano	Infantes <5 años (pico en 6 meses y 2 años) y personas de la tercera edad.	Meses de invierno y primavera	Bronquiolitis y neumonía.
Rubulavirus y Respirovirus humano	hREV-1 y hRUV-2: infantes de 6 a 12 meses. hREV-3: menores de 1 año.	hREV-1 y hRUV-2: en otoño. hREV-3 en primavera y los primeros meses de verano. hRUV-4: los patrones estacionales no establecidos.	hREV-1: laringotraqueobronquitis hRUV-2: tos e infecciones del tracto respiratorio bajo. hREV-3: bronquitis, bronquiolitis y neumonía. hRUV-4: bronquitis y neumonía

38

39 En la actualidad el costo estimado de las IRA's por hospital en países
 40 desarrollados como Estados Unidos es de aproximadamente 34,466 dólares
 41 anuales (Murray et al. 2016), en México, el costo varía por zona demográfica, pero
 42 se calcula que es de aproximadamente \$8, 313.20 +/- \$595.3 dólares por paciente
 43 hospitalizado y de \$230.0 a \$3.57 dólares para pacientes externos (Flores et al.
 44 2003; Mould-Quevedo et al. 2012), lo cual pudiera disminuir con tratamiento
 45 profiláctico como la inmunización, aunque no existen vacunas para todas las
 46 enfermedades virales. Usualmente los tratamientos utilizados son principalmente
 47 de soporte que incluyen medicación para disminuir los síntomas, administración de
 48 oxígeno, remplazo de fluidos y en caso de ser necesario, ventilación mecánica
 49 (Hodinka 2016). Los tratamientos antivirales como anticuerpos humanizados (por

50 ejemplo palivizumab entre otros) son de aproximadamente \$12,000 por dosis,
 51 (Marquez-Escobar et al. 2015) y se utilizan para pacientes de alto riesgo como
 52 inmunocomprometidos e infantes con neumonía (Hodinka 2016).

53 1.1 AGENTES ETIOLÓGICOS

54 1.1.1 Familia *Pneumoviridae*

55 Esta familia pertenece al orden de los *Mononegavirales*, anteriormente eran una
 56 subfamilia (*Pneumovirinae*) de los *Paramyxoviridae*, pero debido a las diferencias
 57 entre las demás subfamilias y a su cercanía filogenética con la familia *Filoviridae* el
 58 Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) ascendió de categoría a
 59 familia *Pneumoviridae* (ICTV 2017). Por el momento solo existen dos géneros,
 60 para esta nueva familia, *Metapneumovirus* y *Ortopneumovirus*, con dos y tres
 61 especies respectivamente. Al igual que las demás familias pertenecientes a este
 62 orden, su genoma es ARN de cadena sencilla y negativa, cuentan también con
 63 una doble capa lipídica pleomórfica (Cox and Plemper 2017), las características
 64 que distinguen a los *Pneumiviridae* de su anterior familia, es que sus marcos de
 65 lectura abiertos (ORFs por sus siglas en inglés), son más cortos, además cuentan
 66 con los genes NS1 y NS2 y la exclusividad de la proteína M2-1, carecen de
 67 hemaglutinina-neuraminidasa (Tabla 2), su glicoproteína (G) está extensivamente
 68 O-glicosilada y falta de similitud entre las secuencias de aminoácidos con
 69 *Paramyxoviridae*, excepto en la glicoproteína de fusión (F) y la polimerasa
 70 dependiente de ARN (P) (ICTV 2017).

71 **Tabla 2.- Proteínas de los virus pertenecientes a la familia *Pneumoviridae*.**
 72 Respirivirus humano (**hREV**), Rubulavirus humano (**hRUV**), Ortopneumovirus
 73 humano (**hOPV**), y Metapneumovirus humano (**hMPV**) (Hoodinka 2016; ICTV
 74 2017).

75

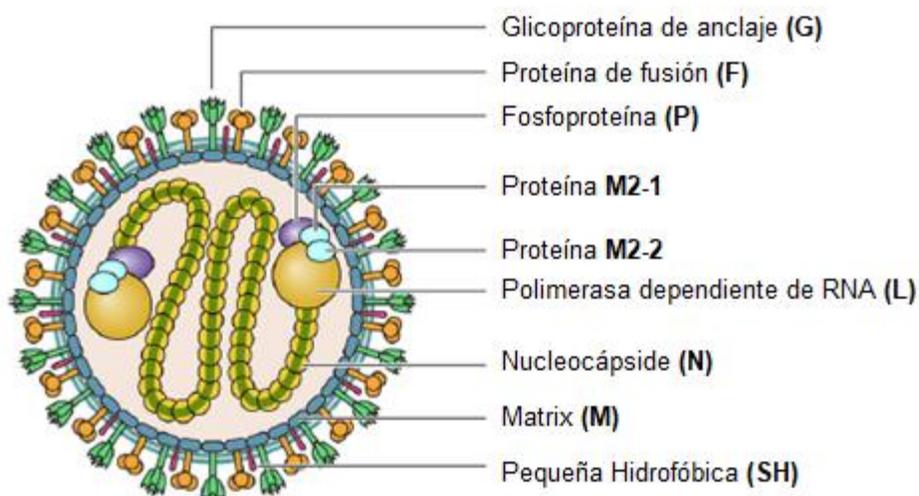
Proteína	Abreviación	Virus que la porta	Función
Nucleoproteína	N	hOPV, hMPV, hREV y hRUV	Encapsida el genoma viral, por lo tanto lo protege de las nucleasas
Fosfoproteína	P	hOPV,	Actúa como un cofactor que

		hMPV, hREV y hRUV	estabiliza la proteína L; Forma parte del complejo RNP (Ribonucleoproteína viral)
Proteína de matriz	M	hOPV, hMPV, hREV y hRUV	Rodea el genoma del virus, permitiendo el desarrollo y la interacción del complejo RNP
Glicoproteína de fusión	F	hOPV, hMPV, hREV y hRUV	Encargada de la fusión con la superficie celular. Receptores putativos: Integrina $\alpha 4\text{-}\beta 1$, ICAM-1 y TLR4
Factor de transcripción	M2-1	hOPV, hMPV, hREV y hRUV	Factor transcripcional de elongación
Factor regulador de RNA	M2-2	hOPV y hMPV	Juega el papel de mayor virulencia ya que regula los patrones de reconocimiento de los receptores tipo toll y los inducibles por ácido retinoico.
Glicoproteína pequeña hidrofílica	SH	hOPV, hMPV, hREV y hRUV	Probablemente forma un canal ionicoprotón selectivo que permite el desarrollo de la fusión viral
Glicoproteína de anclaje	G	hOPV y hMPV	Ayuda en la fusión viral por el reconocimiento de heparan sulfato y CX3CR1
Polimerasa de ARN	L	hOPV, hMPV, hREV y hRUV	Transcribe el RNA genómico, se asegura que el RNA esté protegido en ambos extremos (CAP y Poliadenilación)
Hemaglutinina-neuraminidasa	HN	hREV y hRUV	Permiten el anclaje del virión a la membrana de la célula blanco en receptores que contienen ácido siálico.

76 1.1.1.1 Metapneumovirus humano (hMPV)

77 Miembro del género *Metapneumovirus*, del cual es el único que infecta humanos.
78 hMPV es un virón pleomórfico de 150 nm a 300 nm (ICTV 2017), su genoma tiene
79 una longitud de aproximadamente 13 kb y consta de ocho genes (Fig. 1) en el
80 orden 3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5', codifican nueve proteínas ilustradas en la Tabla
81 2. hMPV comprende dos subgrupos A y B, con 4 linajes genéticos (A1, A2, B1 y

82 B2) (Céspedes et al. 2016), los cuales se designaron debido a las diferencias
83 entre sus proteínas F y G (Panda et al. 2014).
84 Los virus pertenecientes a esta familia constan de la proteína F, encargada de
85 fusionar el virión con la membrana mediante el reconocimiento a receptores de la
86 célula blanco y que en la actualidad se utiliza como un blanco terapéutico
87 (Marquez-Escobar et al. 2015). hMPV y hOPV comparten un 37.9% de identidad
88 en la secuencia de aminoácidos de la glicoproteína de fusión (Wen et al. 2016). Un
89 estudio realizado en la universidad de Maryland demostró que aislados clínicos de
90 dos de los linajes de hMPV conservan un porcentaje de identidad para la proteína
91 M de un 97%, seguido de la nucleoproteína con 96%, glicoproteína F con 95%, y
92 la proteína SH es la menos conservada con 59% (Skiadopoulos et al. 2004).



94 **Fig. 1**

95 Diagrama de una partícula de Metapneumovirus humano.

96 1.1.1.2 Ortopneumovirus humano (hOPV)

97 Perteneciente al género *Ortopneumovirus*, al igual que su homólogo del género
98 *Metapneumovirus*, su genoma es de ARN monocatenario con polaridad negativa,
99 su longitud aproximada de 15 kb (ICTV 2017) con 10 genes (3'-NS1-NS2-N-P-M-
100 SH-G-F-M2-L-5') que codifican para 9 proteínas estructurales y dos no
101 estructurales (NS1 y NS2), que no se encuentran en hMPV (Hodinka 2016), en su
102 bicapa lipídica las proteínas F y G (Tabla 2) determinan su antigenicidad. hOPV es

103 clasificado en dos subgrupos principales A y B (Zhu et al. 2011) con 10 y 13
104 genotipos respectivamente, lo cual está determinado por las diferencias en la
105 secuencia de su proteína G, por el contrario la proteína F entre los subtipos de
106 hOPV está altamente conservada con una diferencia menor del 5% (Tapia et al.
107 2014).

108 **1.1.2 Familia Paramyxoviridae**

109 Perteneciente al orden de los *Mononegavirales*, en general las partículas virales
110 de los miembros de esta familia, son pleomórficas, con envoltura lipídica que
111 envuelve a la nucleocápside, cuentan con genomas no segmentados de ARN, de
112 polaridad negativa además de su propia polimerasa dependiente de ARN y en la
113 envoltura del virión se encuentran glicoproteínas de superficie densamente
114 empacadas (Cox and Plemper 2017), éstas glicoproteínas se presentan como
115 homo-oligómeros que pueden medir de 8 a 10 nm y separadas entre sí por 7 a
116 10nm de distancia, dependiendo del género. Se divide en 7 géneros de los cuales
117 *Respiruvirus* y *Rubulavirus* albergan a 4 de los virus anteriormente conocidos
118 como Parainfluenza virus (ICTV 2017) y que se han reportado como agentes
119 etiológicos en IRA's abarcando del 2 al 17% en infantes menores de cinco años
120 (Frost et al. 2014; Fry et al. 2006; Liu et al. 2013).

121 **1.1.2.1 Respiruvirus**

122 Este género consta de 5 especies de las cuales dos son agentes patógenos de
123 humanos, hREV-1 y hREV-3. Los miembros de este género tienen la actividad de
124 hemaglutinina-neuraminidasa, tiene 6 elementos transcripcionales 3'-N-P-M-F-HN-
125 L-5', que codifican para 6 proteínas estructurales y dos o tres no estructurales,
126 dependiendo de la especie, ya que el gen P mediante ediciones transcripcionales
127 puede dar origen a proteínas P, la V (o C dependiendo del virus) y D, aunque
128 estos virus comparten proteínas con otros géneros, la identidad entre sus
129 secuencias es muy baja (ICTV 2017).

130 **1.1.2.1.1 Respirivirus humano 1 y 3**

131 hREV-1 y hREV-3 como los demás miembros de su género constan de 6 genes 3'-
132 N-P-M-F-HN-L-5', de los cuales P es editado transcripcionalmente para obtener,
133 en el caso de hREV-3 la proteína D única de su familia, la proteína C y la V que
134 están implicadas en la síntesis de ARNm (Durbin et al. 1999), sin embargo, en
135 hREV-1 la edición del transcrito de P codifica para la proteína C que está
136 implicada en la síntesis de RNAm (Latorre et al. 1998) que da lugar a las proteínas
137 Y1 y Y2 de las cuales no se ha descrito una función (Greninger et al. 2017),
138 además de la proteína P .

139 **1.1.2.2 Rubulavirus**

140 Los *Rubulavirus* están conformados por 17 especies, pero es en este género
141 donde se encuentran los virus antes conocidos como hPIV-2 y hPIV-4, que al igual
142 que sus homólogos hREV-1 y hREV-3, a partir del 2016 el ICTV cambió sus
143 nombres a hREV-2 y hREV-4. Todos los integrantes de este género cuentan con
144 la actividad de hemaglutinina-neuraminidasa, su genoma que es de
145 aproximadamente 15 kb 3'-N-V/P-M-F-SH-HN-L-5', codifica para 8 proteínas y al
146 igual que en los *Respirovirus* el transcrito del gen V/P es editado para dar lugar a
147 las proteínas V y P (ICTV 2017; ViralZone).

148 **1.1.2.2.1 Rubulavirus humano 2 y 4**

149 hRUV-2 y hRUV-4 a diferencia de los demás Rubulavirus, no cuentan con la
150 proteína de superficie SH, sus genomas codifican para 6 proteínas estructurales,
151 además de la proteína V, actualmente se han descrito dos subtipos para cada
152 virus, hRUV-2, hRUV-2 V94, hRUV-4a y hRUV-4b; este conjunto de virus está
153 implicado en infecciones en humanos (aunque en menor porcentaje que hREV-1 y
154 3). La diferencia más notable entre estos rubulavirus es que hRUV-4 tiene un
155 genoma 2 kb más grande y debido a la falta de patrones que causa su efecto
156 citopático su detección es complicada por lo que carece de información
157 epidemiológica (Frost et al. 2014; ICTV 2017; Komada et al. 2011; Liu et al. 2013).

1.2 PROCESO DE INFECCIÓN

1.2.1 Glicoproteína F

158

159

160 Como se mencionó anteriormente tanto los *Paramyxoviridae* como los
161 *Pneumoviridae*, portan la proteína F o glicoproteína de fusión, encargada de
162 fusionar el virión con la membrana mediante el reconocimiento a receptores de la
163 célula blanco y que en la actualidad se utiliza como un blanco terapéutico
164 (Marquez-Escobar et al. 2015). Se ha reportado hMPV y hOPV comparten un
165 37.9% de similitud en la secuencia de aminoácidos de la proteína F en su forma
166 de prefusión (Wen et al. 2016).

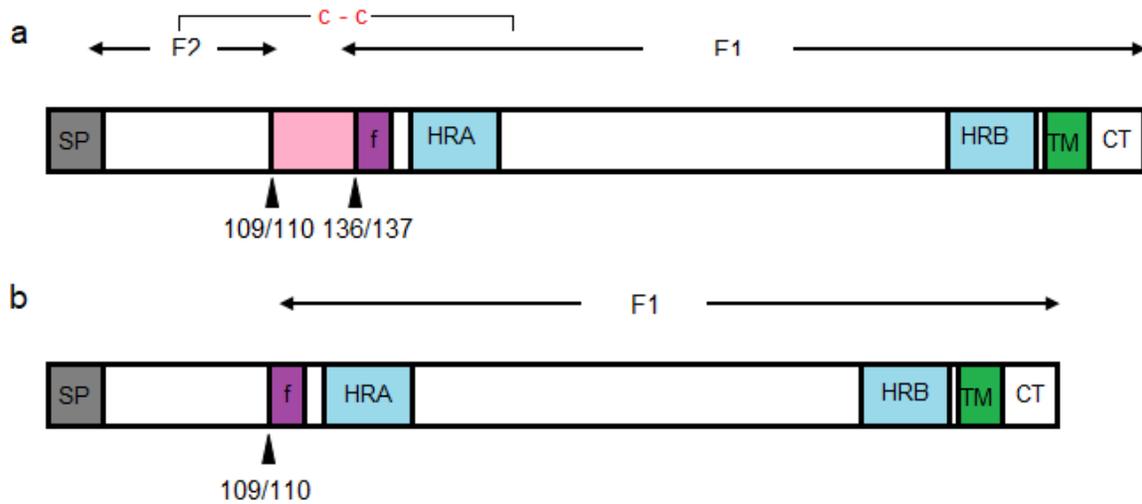
167 La proteína F es una de las principales proteínas que comparten tanto los
168 paramyxovirus como los pneumovirus, aunque aún no se ha reportado la similitud
169 en la secuencia de aminoácidos que existe entre estas familias, la estructura
170 tridimensional que la proteína toma es similar para ambas familias (Connolly et al.
171 2006; Cox and Plemper 2017), esto es debido a que los residuos de cisteínas y
172 por lo tanto los puentes disulfuro se conservan, lo cual justifica que la proteína no
173 pierda su funcionalidad biológica en los diferentes virus (Lamb and Jardetzky
174 2007). Un estudio realizado en la universidad de Maryland demostró que aislados
175 clínicos de dos de los linajes de hMPV conservan un porcentaje de similitud de
176 95% en la glicoproteína F (Skiadopoulos et al. 2004), mientras un estudio realizado
177 en la Universidad de Chile determinó que para hOPV las diferencias entre la
178 identidad de las secuencias de aminoácidos de la proteína F de sus linajes es
179 menor del 10% (Tapia et al. 2014).

180 La glicoproteína F de los Pneumovirus y de algunos Paramyxovirus, como los
181 pertenecientes a los géneros *Respirovirus* y *Rubulavirus*, es una proteína de
182 fusión tipo I, lo cual significa que pasa de su conformación prefusogénica
183 metaestable a un estado menor de energía, la forma fusogénica en la cual su core
184 está conformado predominantemente por α -hélices que tienen sus péptidos N-
185 terminal cercanos al péptido hidrofóbico y en su conformación de post-fusión el
186 dominio fusogénico está caracterizado por trímeros de doble espiral α -hélice
187 (Backovic and Jardetzky 2009; Connolly et al. 2006; Lamb and Jardetzky 2007).

188 La proteína F se sintetiza como un precursor F0, tanto en hMPV como en los
189 hREVs y hRUVs. En hMPV posteriormente se escinde por una proteasa
190 extracelular, pero se ha descrito que para hREVs y hRUVs es la propia HN viral la
191 que hace esta función, al cambiar la conformación estructural de su dominio
192 receptor globular de unión (RBD) y adoptar una estructura particular de las
193 sialidasas, activando la proteína F, que ahora consta de dos subunidades, F1 y
194 F2; produciendo un péptido de fusión hidrofóbico (FP) en el extremo N-terminal de
195 F1.

196 En el caso de hOPV, la proteína F es escindida por una furina en *trans*-Golgi antes
197 de salir de la célula hospedera (Day et al. 2006). Durante el proceso de fusión FP
198 se inserta en la membrana del hospedero (Cox and Plemper 2017; Day et al.
199 2006; Jardetzky and Lamb 2014; Lamb and Jardetzky 2007; Wei et al. 2014).

200 El fragmento F1 contiene un péptido de fusión hidrofóbico N-terminal y dos
201 hidrofílicos que son regiones de secuencias de 7 amino ácidos (héptarepetidas) y
202 conservadas (HR), la héptada N-terminal (HRA), situada inmediatamente
203 adyacente al péptido de fusión y la C-terminal (HRB), que se encuentra proximal al
204 dominio transmembrana (TM) (Fig. 2). Al activarse la proteína F la secuencia HRA
205 se repliega en tres trímeros formando la proteína de prefusión con el extremo N-
206 terminal (FP) insertado, a esto se le llama pre-horquilla F intermediaria, el paso
207 siguiente es el cierre de los extremos N-terminal y C-terminal, donde y HRA y HRB
208 se rearreglan en un haz estable de 6 hélices (6HB), posicionando a los péptidos
209 de fusión y los dominios TM próximos a la misma membrana blanco, (Fig. 2) este
210 proceso es conocido como fusogenización (Connolly et al. 2006; Melero and Mas
211 2015).



212

213

214

215

Fig. 2

Componentes de la proteína F de hOPV y hMPV. **a** Precursor de la proteína F de hOPV, **b** Precursor de la proteína F de hMPV. Los triángulos señalan el sitio de corte. SP: Péptido señal, f: Péptido fusión, HRA/HRB: Héptada repetida A y B, TM: Dominio transmembrana, CT: Extremo C terminal.

216

1.2.2 Transmisión

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

La transmisión de estos virus es por medio del contacto de personas con las partículas de saliva o aerosoles de otra persona enferma cuando tose o estornuda, al tomar o tocar superficies o fómites, también por medio de la auto-infección, que es tomar o tocar superficies u objetos que están contaminados por estos patógenos (Henrickson 2003; Hodinka 2016). Existe un lapso de tiempo en el que el virus sigue viable por ejemplo, para los hREVs y hRUVs 4 horas en superficies no porosas, y en la piel por 10 minutos, y para hOPV 6 horas en superficies no porosas, y 20 min en la piel (Brady et al. 1990; Hall et al. 1980). Los virus no envueltos como los rinovirus y adenovirus, son más estables y permanecen más tiempo a las condiciones ambientales (Henrickson 2003).

227

1.2.3 Manifestaciones clínicas

228

229

230

Enfermedades como neumonía, tos, faringitis, broquiolitis y en algunos casos como asma, son causadas en un 80% por virus. Los pacientes infectados con hRSV y hMPV presentan principalmente bronquitis, bronquiolitis y neumonía como

231 complicaciones severas (Walter and Wunderink 2017), con signos como: fiebre
232 (>38°C), tos, hipoxia, sibilancias, rinorrea, disnea, aunque también se ha descrito
233 que hMPV puede producir una enfermedad asintomática (Panda et al. 2014),
234 linfopenia con monocitosis. En adultos inmunocomprometidos es común los
235 dolores de cabeza, adenopatía cervical, faringitis y herpes labial recurrente
236 (Cespedes et al. 2016). Sin embargo, los hREVs y hRUVs rara vez causan asma,
237 pero si resfriados, laringotraqueobronquitis, traqueobronquitis, bronquiolitis y
238 neumonía, con fiebre, tos seca, obstrucción laríngea, sibilancias y taquipnea,
239 (Henrickson 2003; Hodinka 2016; Pawelczyk and Kowalski 2017).

240 **1.2.4 Patogénesis**

241 La inoculación ocurre a lo largo del tracto respiratorio alto, primero los ojos y la
242 nariz, donde los virus se replican localmente causando inflamación y secreción de
243 moco, por lo tanto destrucción de células ciliadas dejando el epitelio propenso a
244 infecciones por bacterias (Hodinka 2016).

245 En experimentos realizados en ratón, se observó que las células infectas pueden
246 aumentar de tamaño y su forma puede volverse redondeada, además de la
247 aparición de vacuolas en el caso de los hREVs y hRUVs, además de sincicios que
248 es la fusión de dos o más células (Esposito and Mastrolia 2016; Henrickson 2003).

249 La primera acción de defensa ante la infección que se presenta es la secreción de
250 interferones (INF) del tipo I, estableciendo un estado antiviral en las células
251 vecinas no infectadas, además de que promueve la eliminación de células
252 infectadas mediante el mejoramiento de la respuesta antígeno dependiente. La
253 inducción de dicho INF, no podría llevarse a cabo sin el reconocimiento del
254 material genómico del virus, ARN de doble cadena, mediado por Toll Like
255 Receptors (TLR), evento que se presenta durante el ciclo de replicación viral, esto
256 provoca una señalización celular conocida como MAVS (señalización antiviral
257 mitocondrial) que desencadena la expresión de receptores como ICAM-1 y
258 secreción de citocinas proinflamatorias (Cespedes et al. 2016; Pawelczyk and
259 Kowalski 2017), como Interleucina 12 (IL-12), IL-6, IL-8, IL-10, Factor de necrosis
260 tumoral alfa (TNF- α), entre otros. Los virus respiratorios son conocidos por la

261 capacidad de modular las respuestas de las citocinas y hMPV es el menos
262 eficiente en esta capacidad de modulación, pero no queda exento. Finalmente la
263 infección persistente por hMPV puede ser atribuida a una mínima respuesta
264 inmunológica, ya que la depuración del virus mediada por los linfocitos T
265 citotóxicos (CD8+) es ineficiente en la infección primaria, debido a la falta de
266 respuesta de memoria, aunado a esto, hMPV interfiere con la inducción de
267 antígenos timo-dependientes, debido a que también las Células Dendríticas
268 pueden ser infectadas conforme el virus se esparce, lo que afecta en la formación
269 de inmunidad a largo plazo o mejor conocida como de memoria (Panda et al.
270 2014).

271 **1.2.5 Diagnóstico**

272 Debido a las similitudes clínicas y epidemiológicas existentes entre estos virus, es
273 difícil determinar al agente etiológico responsable (Wolf et al. 2015). En la
274 actualidad el estándar de oro en el laboratorio clínico sigue siendo los cultivos,
275 seguidos de ensayos de inmunofluorescencia y posteriormente el análisis de ácidos
276 nucleicos. Las muestra biológicas más comunes para diagnóstico son: los
277 hisopados de garganta, nasofaríngeos, lavados bronqueales y/o nasofaríngeos,
278 aspirados nasofaríngeos o/y endotraqueales (Gill et al. 2017; Henrickson 2003).
279 Debido a que la determinación del agente patógeno por cultivo celular es lento (de
280 2 a 10 días) y que algunos virus como hRUV-4 no presentan claros patrones de
281 efectos citopáticos, se ha optado por probar el análisis de ácidos nucleicos y
282 algunas “variantes” de la Reacción en Cadena de la Polimerasa Retro
283 Transcriptasa (RT-PCR), como RT-PCR multiplex para poder identificar 13
284 posibles patógenos causantes de la enfermedad, el cual ha demostrado ser
285 sensible y altamente específico al no arrojar falsos negativos, pero los costos son
286 elevados (Wong-Chew et al. 2017; Zhang et al. 2016). Por otro lado se ha probado
287 RT-PCR en tiempo Real que es muy sensible y específica, pero en la búsqueda de
288 un diagnóstico más rápido y económico se intentó la evaluación de proteínas
289 como anticuerpos (IgG-hMPV) presentes en los aspirados nasofaríngeos por
290 Inmunofluorescencia Directa (DIF), la cual resultó no ser tan sensible en

291 comparación con RT-PCR (Wolf et al. 2015). En México usualmente el diagnóstico
292 es mediante cultivo celular a partir de aspirados nasofaríngeos y/o en algunos
293 casos se basa solo en el historial clínico y la exploración física (Romero Feregrino
294 et al. 2013).

295 **1.2.6 Tratamiento**

296 En la actualidad el tratamiento que se utiliza en nuestro país es el de tratamiento
297 de soporte (nebulización con solución salina hipertónica al 3% y salbutamol) como
298 lo indica el Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica: IMSS-032-08, además
299 de analgésicos y otros fármacos que ayuden a la disminución de los síntomas; los
300 anticuerpos monoclonales (múridos humanizados) palivizumab o motavizumab
301 (que es una variante de segunda generación de palivizumab), se administran de
302 manera profiláctica en infantes hospitalizados que tienen altas probabilidades de
303 contraer la enfermedad (Wen et al. 2016), en pacientes menores de dos años
304 (Fraser et al. 2017) e inmunocomprometidos con alto riesgo de mortalidad, en los
305 cuales también se consideran otra clase de tratamientos antivirales como: la
306 ribavirina, inhibidores de la neuraminidasa, inhibidores de fusión y pequeños
307 ácidos ribonucleicos interferentes han sido propuestos como tratamiento en el
308 control, a partir de estudios realizados en diferentes partes del mundo como Chile,
309 Canadá, entre otros países (Hodinka 2016; Panda et al. 2014), sin embargo, la
310 ribavirina ya no se está usando en países como México por efectos colaterales.

311 No existen aún vacunas contra hMPV, hOPV, hREVs ni hRUVs que estén
312 aprobadas y sean utilizadas por el sector salud en alguna parte del mundo (Cox et
313 al. 2015), pero esto no significa que no se hayan llevado a cabo intentos por
314 desarrollar tanto vacunas como antivirales eficaces.

315 En un principio se intentaron hacer vacunas inactivadas con formalina o
316 formaldehído de los hREVs y hRUVs, pero la producción de anticuerpos
317 circulantes en los sujetos seropositivos era muy baja y no conferían protección
318 (Henrickson 2003), por lo que se utilizó una cepa atenuada antigénicamente
319 estable, estos virus se desarrollaron por adaptación en frío (CA) y demostraron
320 conferir inmunidad en modelos animales contra hREV-1, hREV-3 y hRUV-2; pero

321 además presentaban infectividad en niños la cual se le atribuyó a que las
322 mutantes se activaban por medio de una proteasa extracelular (Scheid and
323 Choppin 1976). hOPV y hMPV presentan el mismo reto de poca inmunoprotección
324 al utilizar los virus inactivados con formalina (Galvez et al. 2017; Schuster and
325 Williams 2014). Por lo cual existe un interés particular en buscar el antígeno o
326 vacuna adecuada contra estos virus. Un estudio realizado en Chile, donde
327 utilizaron nanopartículas de proteínas F de hOPV, mostró conferir
328 inmunoprotección contra hOPV en comparación con palivizumab en animales
329 (Raghunandan et al. 2014) y un ensayo realizado por Levy et al. (2013) de
330 partículas tipo virales (VLPs), donde insertaron proteína F y G de linajes A y B en
331 el core de un retrovirus que mimetizaba las propiedades de ambos linajes de
332 hMPV, se probó en ratones e indujo anticuerpos neutralizantes contra hMPV,
333 mostrando protección en sistemas murinos (Levy et al. 2013).

334 **1.2.6.1 Péptidos antivirales**

335 Los péptidos antivirales son una alternativa profiláctica y emergente en
336 enfermedades infecciosas causadas por virus, los cuales tienen el objetivo de
337 inhibir la infección de las células hospederas. Estos péptidos actúan
338 profilácticamente y debido a su tamaño pequeño no confieren protección
339 inmunológica de memoria por lo que deben aplicarse varias dosis.

340 La inhibición de la fusión virus/célula se puede lograr ya sea porque el péptido se
341 una al virus y así evite que éste se una a su receptor en la célula, como el
342 reportado por Ortega-Berlanga et al. (2016) para el hOPV, en donde el péptido
343 antiviral RhoA al unirse a la proteína F de hOPV inhibía la fusión hOPV/células
344 HEp-2 (Ortega-Berlanga et al. 2016), o porque el péptido compita por el receptor
345 celular con el virus, como el reportado por Deffrasnes et al.(2008), para hMPV,
346 que con la finalidad de inhibir la fusión del hMPV a sus células blanco
347 desarrollaron péptidos sintéticos y recombinantes, basándose en los péptidos HRA
348 y HRB. En los ensayos de inhibición realizados en cultivos celulares, descubrieron
349 que las héptadas A recombinantes eran más efectivas en bajas concentraciones
350 en comparación con las HRB y con las propias HRA sintéticas, posteriormente

351 realizaron retos virus/péptido en ratones BALB/c y reportaron que el péptido HRA2
352 (compuesto por 50aa del péptido HRA original del virus más 52aa del péptido pET
353 donde fue clonado) era capaz de inhibir la fusión y por lo tanto la entrada del virus
354 (Deffrasnes et al. 2008).

355 Basados en el ensayo de Deffrasnes et al. (2008), en nuestro grupo de
356 investigación, se probó un péptido antiviral HRA2pl desarrollado en plantas de
357 tabaco, pero con la misma estructura de HRA2, el cual también mostró actividad
358 inhibitoria sobre la fusión hMPV/células HEp-2 a concentración de 94.3 µg/mL de
359 proteína total soluble, sugiriendo que dicho péptido es un probable tratamiento
360 profiláctico contra hMPV (Marquez-Escobar et al. 2015). Una modificación de este
361 último tipo de inhibidores es uno desarrollado en Roma, donde a un péptido que
362 también semeja una héptada repetida se une al intermediario entre la proteína F
363 de prefusión y postfusión de hREV-1 le añaden un grupo colesterol y la acción
364 inhibitoria del péptido es mayor que sin éste (Pessi et al. 2012; Porotto et al.
365 2010).

366 **1.3 PLANTAS COMO PLATAFORMAS PARA PRODUCIR** 367 **PROTEÍNAS RECOMBINANTES.**

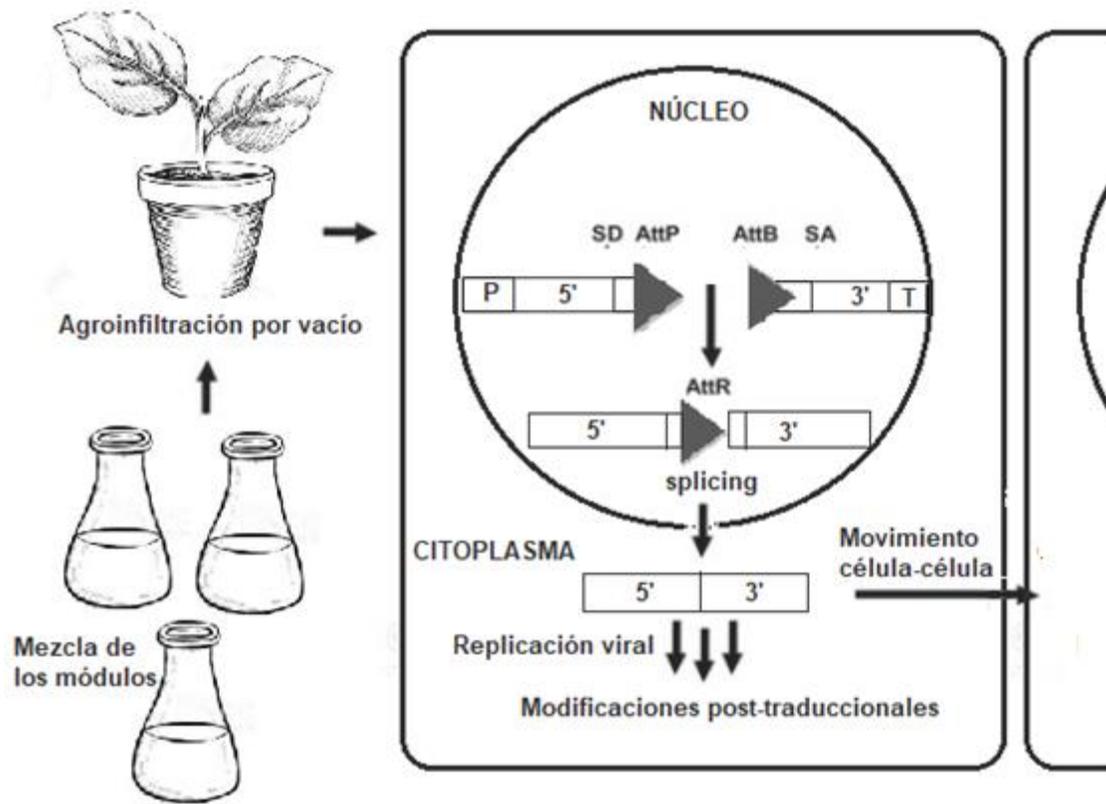
368 La obtención de proteínas recombinantes en la industria farmacéutica, durante
369 años se ha basado en la producción de biofármacos a partir plataformas como
370 microorganismos (bacterias y levaduras), insectos, cultivos de células de
371 mamíferos y animales transgénicos, que son de costos elevados, difícil
372 escalabilidad, además de no ser tan seguros ni compatibles, debido a que se
373 requiere de un gran volumen de biomasa, y que se requiere purificación del
374 biofármaco, lo cual incrementa el costo de obtención. También, algunos productos
375 remanentes en la formulación pueden ser peligrosos para el paciente, por lo cual
376 la búsqueda de un sistema de expresión eficiente y de bajo costo para proteínas
377 recombinantes ha llevado a la investigación del uso de plantas como
378 biorreactores, que prometen ser plataformas menos costosas y más seguras, ya
379 que no corren el riesgo de contaminación por los patógenos convencionales para
380 células de mamífero y además los virus patógenos de plantas no han demostrado
381 infectar células humanas (Gleba et al. 2005; Lee and Ko 2017; Lomonossoff and

382 D'Aoust 2016; Ma et al. 2003). La primera evidencia de que las plantas podían ser
383 confiables reactores de proteínas recombinantes, fue en 1989 cuando el equipo de
384 trabajo de Hiatt produjo un anticuerpo correctamente plegado y glicosilado en
385 hojas de plantas de tabaco (Hiatt et al. 1989), la primera vacuna obtenida en estos
386 reactores fue en 1990 por el grupo de trabajo de Curtis que expresó en plantas de
387 tabaco el antígeno proteico A de *Streptococcus mutans* (Curtiss and Cardineau
388 1997).

389 **1.3.1 Sistema de transformación transitoria Magniffection®**

390 Las principales categorías que se utilizan para obtención de productos
391 recombinantes en plantas, son la transformación estable y la transitoria; la
392 transformación estable fue la primera en desarrollarse, consiste en insertar en el
393 genoma de la planta los genes deseados, para poder obtener plantas transgénicas
394 que expresen ese nuevo gen y se mantenga en su progenie, para lo cual se utiliza
395 a *Agrobacterium tumefaciens* como vector de entrega, el cual transfiere su región
396 de T-DNA que contiene un cassette de expresión con el gen deseado, la
397 transformación estable con promotores constitutivos fuertes permite la obtención
398 de semillas que darán lugar a plantas que expresen la proteína de interés en todos
399 los tejidos, al obtener la planta transgénica estable homocigota, la cantidad de
400 proteína por biomasa aumenta y el costo de producción es menor que utilizando
401 otras plataformas (como las bacterianas). A pesar de estas ventajas la
402 transformación estable es limitada por el tiempo que lleva obtener una planta
403 transgénica estable, además los niveles de expresión de la proteína recombinante
404 continúan siendo bajos (de 0.1 a 0.5% de la proteína soluble total) en comparación
405 con la transformación transitoria conocida como sistema Magniffection®, con la
406 cual en 2 semanas se obtiene hasta un 35% de la proteína soluble total. Esta
407 tecnología se basa en plásmidos virales modificados que son entregados a la
408 célula vegetal mediante *A. tumefaciens*. Los plásmidos utilizados actualmente son
409 plásmidos virales de segunda generación (Gleba et al. 2005; Lee and Ko 2017),
410 los cuales contienen modificaciones para que no codifiquen todas las proteínas
411 virales, de tal forma que se evita que los síntomas de enfermedad de las plantas

412 se agraven y permiten expresar altos porcentajes de proteínas recombinantes.
413 Estos plásmidos solo conservan los elementos virales requeridos para la eficiente
414 expresión de la proteína, además de las proteínas para el movimiento del
415 amplicón, de célula a célula por plasmodesmos. Los vectores se basan en el virus
416 del mosaico del tabaco (TMV); el sistema consta de tres plásmidos, el vector 3'
417 que contiene el gen de interés a expresar; el módulo 5' que contiene la polimerasa
418 dependiente de RNA (RdRp), ambos flanqueados por intrones y sitios de
419 recombinación para la integrasa y el tercer vector contiene a la integrasa que tiene
420 una secuencia señal de retención en el núcleo, al recombinar ambos exones (3' y
421 RdRp), son exportados al citoplasma por su naturaleza de RNA y se lleva a cabo
422 la replicación de éstos y su traducción (Gleba et al. 2007; Marillonnet et al. 2004),
423 como se puede observar en la Fig.3. El sistema de Magniffection a diferencia de la
424 agroinfiltración común, es la utilización de una cámara donde se puedan sumergir
425 las plantas y presión de vacío mediante la cual *A. tumefaciens* pueda ingresar a la
426 planta, a diferencia de la infección por jeringa, la expresión de la proteína
427 recombinante es uniforme en toda la planta y por lo tanto se obtiene un mejor
428 rendimiento (Gleba et al. 2007; Shamloul et al. 2014).



429

430 **Fig. 3**

431 Sistema Magnifection ®. SD: Sitio donador en splicing, SA: sito aceptor en
 432 splicing.

433

2 OBJETIVO

434

435 2.1 OBJETIVO GENERAL

436 Evaluar la capacidad inhibitoria del péptido antiviral HRA2pl en ensayos *in vitro*
437 para Ortopneumovirus humano y Rubulavirus humano.

438

439 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

440

- 441 1. Determinar la plataforma de expresión más eficiente para el péptido antiviral
442 HRA2pl, entre *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum*.
- 443 2. Expresar y purificar el péptido antiviral HRA2pl en *N. benthamiana*
- 444 3. Determinar la dosis infectiva media de cultivo celular (TCID₅₀) y la
445 proporción de inhibición viral para hOPV a diferentes dosis de HRA2pl.
- 446 4. Determinar la dosis infectiva media de cultivo celular (TCID₅₀) y la
447 proporción de inhibición viral para hRUV-2 a diferentes dosis de HRA2pl.

448

449

450

3 HIPÓTESIS

451

452 1. Si HRA2pl inhibe la fusión de hOPV y hRUV en un modelo *in vitro* de
453 infección, entonces disminuirá la producción de partículas virales.

454

4 METODOLOGÍA

455

456 **4.1 TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA POR AGROINFILTRACIÓN** 457 **(MAGNIFECTION®)**

458 Para la agroinfiltración se utilizaron plantas de *N. benthamiana* y *N. tabacum*, de
459 seis semanas de edad, en condiciones controladas (cámara bioclimática) de
460 temperatura (23°C), ciclos de luz de 13 horas y 9 de oscuridad, con fibra de coco
461 como sustrato, además se crecieron de forma independiente transformantes de
462 *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 para dos condiciones, que son la control
463 y la del gen de interés.

464 **Expresión de HRA2pl.** Las cepas de *A. tumefaciens* contenían los vectores
465 virales pICH11599 (módulo 3', contiene el gen que codifica al péptido HRA2pl),
466 pICH4851 [módulo 5', que codifica a la polimerasa dependiente de RNA (RdRp)], y
467 pICH10881 (módulo 1' que codifica para la Integrasa).

468 **Expresión del control de agroinfiltración.** La mezcla de módulos contenía los
469 mismos vectores virales, pero en el caso del gen de interés se utilizó Green
470 Fluorescent Protein (GFP) en el módulo 3' (pICH11599).

471 En 250 mL de medio líquido LB con Kanamicina a 100 mg/mL y Rifampicina a 50
472 mg/mL, se crecieron la cepas hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 Unidades
473 de absorbancia, posteriormente se mezclaron y se llevaron a un volumen final de
474 600 mL con agua MilliQ. Se introdujeron las plantas sin sustrato y el sistema se
475 sometió a una presión de vacío de 20 mm Hg/in², se les eliminó el medio
476 remanente con agua destilada estéril, se regresaron nuevamente en las macetas
477 que las contenía y se cubrieron con bolsas.

478 **4.2 CONTROL DE LA AGROINFILTRACIÓN**

479 Se cosecharon hojas de ambas plantas agroinfiltradas para GFP y observó la
480 fluorescencia de GFP con luz UV en el microscopio estereoscopio *Leica Mz 12s*
481 por intervalos de varios días para tomar como referencia el tiempo de mayor
482 expresión de GFP.

483 **4.3 EXTRACCIÓN DE ADN VEGETAL**

- 484 1. En un mortero con 100 mg de tejido vegetal fresco de cada día post-
485 infiltración, se agregó 0.6 mL de buffer de extracción de ADN (d-sorbitol
486 0.14 M, Tris-HCl 0.22 M pH: 8.0, NaCl 0.8M, CTAB 0.8%, n-laurilsarcosina
487 1%, PVP 1% y β -mercaptoetanol 0.2%) y se trituró.
- 488 2. Se pasó a un tubo Ependorff de 1.5mL y se incubó a 65°C por 45 minutos.
- 489 3. Se agregó un volumen de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (25:24:1).
- 490 4. Se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se
491 transfirió a un tubo nuevo, descartando el precipitado.
- 492 5. Se adicionó un volumen de F-C-AI al sobrenadante y se mezcló por
493 inmersión.
- 494 6. Se centrifugó a 12,000 rpm por tres minutos y la fase acuosa se transfirió a
495 un tubo nuevo, descartando la fase oleosa.
- 496 7. Se agregó 2 μ L de RNAsa a 2 mg/mL y se incubó por 37°C durante 15
497 minutos.
- 498 8. Posteriormente se precipitó el ADN con un volumen de isopropanol frío a
499 temperatura de -20°C por 10 minutos.
- 500 9. Se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C y se descarta el
501 sobrenadante.
- 502 10. Se lavó la pastilla con un mililitro de etanol al 70%.
- 503 11. Se centrifugó a 8,000 rpm durante 3 minutos
- 504 12. Se repitieron el lavado con etanol y la centrifugación
- 505 13. Se deja secar la pastilla a temperatura ambiente y se resuspende en
506 aproximadamente 30 μ L de agua desionizada estéril. Se almacena a -20°C.
507

508 **4.4 EXTRACCIÓN DE ARN VEGETAL Y SÍNTESIS DE ADNc.**

- 509 1. Se tomó una muestra de tejido vegetal (50 a 100 mg) de cada día post-
510 infiltración y se maceró con nitrógeno líquido.
- 511 2. Se adicionó un mL de Reactivo de Trizol ® y se homogenizó por 5 minutos
512 a temperatura ambiente.

- 513 3. Se adicionó 200 μ L de cloroformo y se mezcló vigorosamente por inmersión
514 durante 15 segundos y se incubó en hielo por 2 minutos.
515 4. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
516 5. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo, para adicionarle 0.5mL de
517 isopropanol y se agitó por inmersión, posteriormente se incubó por 15
518 minutos en hielo.
519 6. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
520 7. Se lavó la pastilla dos veces con Etanol-agua DEPC al 75% y después de
521 cada lavado se centrifugó a 7,000 rpm por 5 minutos a 4°C.
522 8. Se dejó secar parcialmente la pastilla en hielo.
523 9. Se resuspendió la pastilla en 30 μ L de agua DEPC.
524 10. Se corrió el gel de calidad.
525 11. Se eliminó el remanente de ADN contaminante con DNAsa II Invitrogen
526 12. Se sintetizó el ADN complementario con OligodT, dNTPs, agua DEPC, Ddt
527 y transcriptasa reversa Superscript II (100 Unidades por cada 500 ng de
528 RNA) de la marca Invitrogen a 45°C por 50 minutos.
529 13. Se inactivó la acción de la enzima a 70°C por 15 min.
530 14. Se almacenó a -20°C.

531

532 **4.5 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**

- 533 1. A una muestra de 10 mg de tejido vegetal (de cada día post-infiltración)
534 macerada con nitrógeno líquido, se le adicionaron 500 μ L de buffer de
535 extracción de proteínas (3.9 mL de PBS 1X a pH: 7.2, 0.08 mL de Tritón X-
536 100 al 25% y 0.02 mL de DIECA 1M).
537 2. Se sonicó en hielo con pulsos de 10 segundos por un minuto a amplitud del
538 30%.
539 3. Se agitó durante media hora a 4°C y se centrifugó a 13,000 rpm durante 15
540 minutos a 4°C.
541 4. Se tomó el sobrenadante (Proteína Soluble Total PST) y se almacena a
542 4°C.

543 **4.6 ANÁLISIS DEL TRANSGÉN**

544 A partir del ADN genómico se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa
545 (PCR) de punto final, los oligonucleótidos utilizados, HRA2pl-F (5'-
546 ATGCATCACCATCACCACC-3') y HRA2pl-R (5'-CTTCAATTCCCTAACAGCGG-
547 3'). La mezcla de reacción contenía 100 ng de ADN, MgCl₂ 1.5 mM, Taq ADN
548 polimerasa 0.5 U, dNTP 0.2 mM, y 0.5 μM de oligos, se llevó a un volumen final de
549 25 μL. Las condiciones de reacción fueron: 94°C por 5 min, y un ciclado de 34
550 repeticiones a 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 45
551 segundos y con un paso de extensión final de 72°C por 5min. El producto de PCR
552 fue analizado por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro
553 de etidio (1 μg/mL), observados y digitalizados en el equipo UVP chemisystem
554 (UVP, Inc.).

555 **4.7 ANÁLISIS DEL TRANSCRITO**

556 Una vez obtenido el ADN complementario como se describe en la sección 4.4
557 paso 12, se realiza la PCR como se describe en la sección 4.6, con la única
558 diferencia de que la mezcla de reacción contenía 300 ng de ADNc.

559 El producto de PCR fue analizado por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%,
560 teñido con bromuro de etidio (1 μg/mL), observados y digitalizados en el equipo
561 UVP chemisystem (UVP, Inc.).

562

563 **4.8 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

564 ***4.8.1 Cuantificación por método de Bradford***

565 En una placa tipo ELISA de 96 pozos se adicionaron 100 μL de solución de
566 Bradford 1X, con 1, 2, 3, 4 y 5 μL de BSA 1 mg/mL, para realizar la curva
567 estándar; y 2 μL de cada muestra a analizar, se aforó a 200 μL con agua
568 desionizada. Tanto las diluciones de la curva como las muestras se realizaron por
569 triplicado. Se incubaron por 5 min con agitación constante y se leyeron las
570 absorbancias a 595 nm en el equipo Bio-Rad 550, lector de microplaca. Se

571 realizaron los cálculos con la ecuación de la recta para interpolar las muestras
572 problema.

573 **4.8.2 Electroforesis de proteínas**

574 La calidad de las proteínas se observó mediante electroforesis de proteínas en un
575 gel de Tricina SDS-PAGE al 16%; se corrió durante 90 minutos a 80 mV y 120 mV,
576 posteriormente se fijó con metanol, se lavó dos veces con agua MilliQ, se incubó
577 con tiosulfato de sodio, posteriormente con nitrato de plata 0.1% y por último se
578 reveló con solución reveladora (Formaldehído 0.036%, Carbonato de sodio 2%),
579 todas la incubaciones y lavados se hicieron por 40 minutos, al final se paró la
580 reacción con EDTA.

581 **4.8.3 Dot-blot**

582 En una membrana de nitrocelulosa se dibujaron círculos y depositaron 3 µg/µL de
583 proteína, se dejó secar la membrana por 15 minutos y se bloqueó con BSA al 5%
584 en PBS-T durante una hora a temperatura ambiente con agitación, se lavó tres
585 veces con PBS-T durante 5 minutos en agitación y se incubó con anticuerpo
586 primario (anti-His de ratón) en una dilución 1:3,000 con PBS, por una hora a
587 temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se lavó tres veces con PBS-T por 5
588 minutos y se incubó con anticuerpo (de conejo) conjugado con peroxidasa de
589 rábano (HRP) por una hora en agitación, se volvió a lavar la membrana con PBS-T
590 tres veces, cada lavado de 5 minutos y se reveló con luminol y se observó la
591 quimioluminiscencia en el equipo UVP chemisystem (UVP, Inc.).

592 **4.8.4 Western Blotting**

593 Se realizó la electroforesis de proteínas como se indicó anteriormente y antes de
594 teñir con plata, se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de Fluoruro
595 de polivinilideno (PVDF) por transferencia semi-húmeda. Se colocaron las
596 almohadillas ya impregnadas con buffer de transferencia 1X en el ánodo, se
597 colocó la membrana también impregnada, posteriormente el gel y por último otro
598 paquete de almohadillas, se cerró el sistema con el cátodo y se colocó en el

599 equipo de transferencia BioRad Sistema de Transferencia trans-blot® turbo se
600 seleccionó el programa de proteínas mixtas y transcurrido el tiempo se sacaron las
601 almohadillas y se lavaron tanto el gel con agua destilada antes de teñirlo y la
602 membrana tres veces con PBS durante 5 minutos en agitación, después se
603 bloqueó la membrana con BSA al 5% en PBS-T durante una hora a temperatura
604 ambiente con agitación, se lavó tres veces con PBS-T durante 5 minutos en
605 agitación y se incubó con anticuerpo primario (anti-His de ratón) en una dilución
606 1:3,000 con PBS, por una hora a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se
607 lavó tres veces con PBS-T por 5 minutos y se incubó con anticuerpo HRP (de
608 conejo) a una dilución en PBS-T de 1:4,000 por una hora en agitación, se volvió a
609 lavar la membrana con PBS-T tres veces, cada lavado de 10 minutos y se incubó
610 con luminol por 2 minutos y se reveló por película fotográfica en el cuarto oscuro.

611 ***4.8.5 Revelado en película***

612 Se retiró el exceso de luminol de la membrana con papel absorbente y se colocó
613 en el cassette entre dos hojas de plástico, teniendo cuidado de no dejar burbujas,
614 se colocó el papel tipo película GE Healthcare Kodak alta resolución para
615 quimioluminiscencia y se dejó incubando durante 8 minutos, en seguida se
616 sumergió en solución reveladora Kodak por 45 segundos y se lavó con agua
617 corriente, después se pasó a solución fijadora en agitación por 30 segundos y se
618 dejó secar.

619 **4.9 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

620 ***4.9.1 Preparación de la columna***

621 Se empacó en la columna 1.5 mL de resina ProBond y se eliminó el líquido por
622 aspiración, después se le adicionaron 6mL de agua desionizada estéril y se
623 resuspendió la resina por pipeteo, se dejó compactar la resina nuevamente y se
624 eliminó el agua, este paso se repitió una vez más, se añadieron 6 mL de buffer
625 nativo (NaH_2PO_4 50mM NaCl , 500mM, pH8), se resuspendió la resina con la
626 pipeta, se dejó que se compacte y se eliminó el buffer por pipeteo, se repitió el
627 lavado 2 veces más.

628 **4.9.2 Procedimiento de purificación**

629 Se añadieron 8 mL de extracto crudo de proteínas de tabaco a la columna
630 preparada, se dejó unir por 2 horas usando agitación a 4°C, se dejó que la resina
631 se compactara por gravedad y se colectó el sobrenadante (EPTS), se almacenó a
632 4°C y se analizó en gel, se lavó con 6 mL de buffer nativo de lavado, se dejó
633 compactar y se colectó el líquido y se analizó, se repitió este lavado dos veces
634 más y se eluyó la columna con 6 mL con buffer nativo de elución a 50 mM de
635 imidazol, se resuspendió y se colectó el eluado, se repitió con 100 mM y 250 mM
636 de imidazol. Tanto fracciones de lavados y eluciones se analizaron en gel de
637 Tricina SDS-PAGE. La elución de 250 mM de imidazol se denominó como
638 HRA2pl.

639 **4.10 EXPRESIÓN DE HRA2PL EN BACTERIAS**

640 **4.10.1 Inducción de células de *E. coli* BL21**

641 En 10 mL de medio LB con 100 mg/L de Kanamicina se inoculó una asada de
642 *Escherichia coli* BL21 transformada con el plásmido pET-28b que contenía la
643 secuencia del péptido HRA2pl optimizada para *E. coli* y se dejó incubando 12
644 horas, se tomó 1 mL y se inocularon en 99 mL de medio LB durante 3 horas hasta
645 llegar a una densidad óptica (D.O.) de 0.3 a 600 nm y se indujo la expresión con
646 IPTG 0.5 mM durante 2 horas a 28°C, hasta llegar a una D.O. de 0.5 a 0.7, se
647 centrifugó a 5,000 rpm a 4°C durante 5 minutos hasta terminar el volumen total; se
648 mantuvieron los pellets en hielo, se resuspendió el pellet en 25 mL de buffer nativo
649 (NaH₂PO₄ 50 mM pH:8.0, NaCl 500 mM), con 1 mg de lisozima (800 U/mL), se
650 homogenizó y se sonicó durante medio minuto con pulsos de 10 segundos y a
651 amplitud de 30%, después se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y
652 se transfirió el sobrenadante en un tubo nuevo. Se realizó la cuantificación de
653 proteína por el método de Bradford, posteriormente la electroforesis de proteínas,
654 Western blot y purificación siguiendo la metodología anteriormente mencionada.

655 **4.10.2 Diálisis**

656 Se prepararon tres litros de buffer nativo 1X (no contiene imidazol), se colocó un
657 litro en un vaso de precipitado con un agitador magnético en una placa de
658 agitación y dentro del vaso se colocó también la membrana de diálisis (Spectra
659 por) cerrada con pinzas para evitar que se saliera muestra purificada de proteína
660 HRA2pl de *E. coli* BL21 y se dejó en agitación por 24 horas, pasado el tiempo se
661 cambió el buffer externo por otro litro de buffer nativo y se repitió este paso hasta
662 las 24 horas siguientes, finalmente se colectó la muestra dializada y se analizó en
663 un gel de tricina SDS-PAGE al 16% y se almacenaron las alícuotas a -80°C.

664 **4.11 CULTIVO CELULAR**

665 **4.11.1 Propagación de células HEp-2 y Vero**

666 Se seleccionaron las líneas celulares HEp-2 (células inmortalizadas de tracto
667 respiratorio) y Vero (células de riñón de mono verde africano), debido a los
668 receptores heparán sulfato y tipo ácido siálico $\alpha 2.3$, respectivamente.

669 A una caja de Petri con una capa confluyente de células se le retiró el medio Medio
670 Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (ladeando la caja sin tocar el fondo de la
671 caja), posteriormente se lavó dos veces con 3 mL de PBS 1X, después se agregó
672 750 μ L de EDTA 1X y 150 μ L de tripsina (0.02%), para separar las células. Se
673 inoculó por tres minutos en una cámara (con 5% de CO₂ a 37°C), se detiene la
674 reacción con 3 mL de medio DMEM con 5% de suero fetal bovino (SFB) y se
675 resuspendió de forma circular. Se observó en el microscopio para asegurarse que
676 se hayan desprendido las células y se colocaron de 1 a 2 mililitros de la
677 suspensión celular un una caja de Petri nueva y se añadieron 3 mL de medio
678 enriquecido con 5% de SFB. Para cultivo celular en caja de 48 pozos se añadieron
679 400 μ L de medio DMEM enriquecido y 100 μ L de suspensión celular, para caja de
680 96 pozos se añadió de una mezcla, de 2.5 mL de suspensión celular con 12.5 mL
681 de DMEM enriquecido, 150 μ L por pozo y se incubaron por 24 y 72 horas hasta
682 observar confluencia celular.

683 **4.11.2 Viabilidad celular**

684 De una caja de 48 pozos se retiró el medio y se agregaron 500 µL de solución
685 problema (Buffer de extracción de Proteínas, PST-HRA2pl, PST-WT, Dosis 1
686 HRA2pl, Dosis 2 HRA2pl, buffer nativo con Imidazol y DMEM), se incubaron en la
687 cámara y se observó la viabilidad celular a las 0, 12 y 24 horas, removiendo la
688 capa celular con tripsina y EDTA (15 y 30µL), se incubó por 3 minutos y se añadió
689 DMEM enriquecido, se tomaron 5µL de muestra y se mezclaron con 1µL de azul
690 de tripano y se contaron las células en cámara de Neubauer en el microscopio. Se
691 realizaron los cálculos con la siguiente fórmula:

$$\frac{\#Células}{mL} = \hat{x}(Fd)(Fc)$$

692 Donde \hat{x} es el promedio contado, Fd el factor de dilución y Fc el factor de la
693 cámara (1,000).

694 **4.11.3 Ensayo de unión**

695 En las placas de 96 pozos con células confluentes se les retiró 150µL del medio y
696 se agregó 100 µL de suspensión viral (hOPV y hRUV-2) en la fila A del pozo de la
697 columna 1 al 12; de la fila B a la H se agregó 70 µL de la solución a evaluar, y se
698 diluyó la concentración del virus (fila A de la columna 1 a la 12) tomando de cada
699 pozo 35 µL del sobrenadante y agregándolos al fila siguiente, como lo muestra la
700 Fig.4, en la última fila no se agregó suspensión viral.

701 Se incubó por dos horas a 4°C y dos horas más en la cámara de incubación,
702 transcurrido el tiempo se eliminó por pipeteo el sobrenadante y se agregaron
703 200µL de DMEM y se incubó: el efecto citopático se observó transcurridas 48
704 horas en microscopio de campo claro. Se realizó el cálculo de la dosis infectiva
705 media de cultivo celular (TCID₅₀) con la siguiente fórmula:

$$TCID50 = 10^{-\left(-\log\Delta + \left(-\log\delta * \left(S - \frac{1}{2}\right)\right)\right)}$$

706 Donde Δ es el factor de dilución (3), δ la última dilución en la cual se observa el
707 efecto citopático, S el número de pozos con el efecto citopático entre el número de
708 pozos utilizados. El efecto citopático se determinó en microscopía de campo claro
709 con la observación de sincicios, para ambos virus.

711 **4.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

712 Los datos se analizaron con ANOVA por GraphPad Prism software. Se utilizó la
713 prueba de la diferencia estadística significativa de Tukey (HSD) para comparar
714 todos los pares de grupos en la prueba de ANOVA. Una $p < 0.05$ fue considerada
715 estadísticamente significativo.

716

717

5 RESULTADOS

718 **5.1 ENSAYO DEL CONTROL DE INFECCIÓN TRANSITORIA** 719 **MAGNIFECTION®**

720 Para asegurar que las condiciones de la agroinfiltración fueron efectivas (presión
721 de vacío, tiempo y concentración e integridad de los plásmidos conteniendo los
722 módulos), se expresó como control positivo la proteína GFP, contenida en uno de
723 los módulos (Fig. 5), se colectaron de 2 a 3 hojas por día, desde el día tres post-
724 infiltración (dpi) hasta el 11dpi, se irradiaron con luz UV en el microscopio
725 estereoscopio Leica MZ125, obteniéndose la mayor la expresión de GFP en las
726 plantas de *N. benthamiana* y el pico de fluorescencia se observó en el día 8.

727 Por lo cual se deduce que la mejor matriz de expresión para esta técnica y para
728 los vectores utilizados en el género *Nicotiana* es la especie *benthamiana* y su
729 mayor expresión se observa es el día 8 para GFP, por lo que fueron las
730 condiciones elegidas para la expresión del péptido HRA2pl. Shamoul et al., 2014
731 reportaron para el vector pBID4 en la cepa de *Agrobacterium* GV3101, la mayor
732 expresión de proteína GFP fue en *N. benthamiana*, lo cual concuerda con este
733 resultado.

734 **5.2 DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN GENÓMICO**

735 Se analizó el ADN genómico de las plantas agroinfiltradas de los días 5 al 8 post-
736 infiltración mediante PCR punto final para el gen actina y determinar la integridad
737 del ADN genómico HRA2pl (Fig. 6). El resultado fue positivo para todos los dpi.

738 **5.3 IDENTIFICACIÓN DEL TRANSCRITO**

739 Del ARN que fue extraído en los dpi 4-8, y que mostró buena calidad ya que no se
740 observa degradación del ARN (Fig. 7), mediante RT-PCR se produjo el ADNc al
741 que se le realizaron la PCR para detección de actina (control positivo de integridad
742 del ADNc), la cual fue positiva para todas las muestras, con lo que se procedió a
743 detectar el ARN mensajero del transgén HRA, mediante PCR punto final, sin
744 embargo, sólo dio positivo en los días postinfiltración: 4, 5, 6 y 8, como se puede

745 observar en la Fig. 8, esto puede ser debido a la menor cantidad de mensajero
746 existente para ese transgén en el día 7 o a la manipulación de la muestra.

747 **5.4 IDENTIFICACIÓN DEL PÉPTIDO RECOMBINANTE**

748 Para la identificación de la proteína recombinante HRA2pl se realizó la extracción
749 de proteínas totales colectando hojas de *N. benthamiana* transgénicas a diferentes
750 días post-infiltración (desde el 3 al 14 dpi), la electroforesis se realizó en un gel de
751 SDS-PAGE Tricina al 16% (Fig. 9), y se observó la integridad y buena resolución
752 en la separación de las proteínas extraídas por esta técnica. Dentro del patrón de
753 bandas separadas, se observan dos bandas en el peso aproximado del péptido
754 HRA2pl (cerca de 11kDa), aunque también se observa una banda similar en la
755 WT por lo que procedimos a la identificación del péptido por Dot Blot y Western
756 blot.

757 En el extremo amino terminal, el péptido antiviral HRA2pl cuenta con una etiqueta
758 de histidinas que permite su identificación y posterior purificación, por lo cual se
759 realizó un Dot blot y un Western blot contra la etiqueta de histidinas. Los
760 resultados del ensayo de Dot blot se muestran en la Fig. 10, donde se detecta al
761 péptido mediante un halo blanquecino alrededor del círculo cargado de proteína a
762 partir del dpi 8.

763 Para el Western blot se cargaron 20 µg de PST en un gel SDS-PAGE Tricina al
764 16%, se transfirió a una membrana de PVDF por transferencia semihúmeda y
765 realizó el procedimiento ya descrito, se reveló en película y debido a la mala
766 calidad obtenida en las películas reveladas con PST de plantas no se muestran
767 estas imágenes. Sin embargo, posteriormente en el Western del péptido HRA2pl
768 producido en *E. coli* BL21, donde se cargaron conjuntamente las PST de plantas,
769 ahí sí se observan las bandas del peso esperado para los extractos de *N.*
770 *benthamiana* al 8dpi y 9dpi (Fig. 13).

771 **5.5 INDUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PÉPTIDO RECOMBINANTE** 772 **EN BACTERIAS**

773 Para la obtención de un control positivo del péptido y poder cuantificar el
774 producido en plantas, se expresó HRA2pl en bacterias *E. coli* cepa BL21 y el

775 péptido extraído se analizó en un gel de Tricina SDS-PAGE al 16% con 6% de
776 entrecruzador bis-acrilamida y se realizó un Dot-blot (Fig. 11) en donde se observa
777 señal positiva para los extractos de PST de BL21 inducida, soluble e insoluble, el
778 contraste de este dotblot es diferente al realizado en plantas, debido al equipo
779 utilizado (Bio Rad Chemidoc). En el SDS-PAGE se observaron bandas
780 diferenciales para el extracto de proteínas totales obtenidas de bacterias inducidas
781 que no han pasado por la columna, en el peso aproximado del péptido (11 kDa),
782 además de la señal positiva en el Dot blot, por estas razones se decidió continuar
783 con la purificación por columna de níquel (Probond). De las fracciones obtenidas,
784 tanto lavados como eluciones (Imidazol al 50, 100, 200 y 500 mM, que
785 corresponden a la elución 1, 2, 3 y 4), al analizarlas mediante un gel SDS-PAGE
786 Tricina al 16% (Fig. 12) y posteriormente un Western blot (Fig. 13), los resultados
787 mostraron que se pudo obtener el péptido a partir de bacterias, con menor
788 cantidad de proteínas contaminantes a 500mM de Imidazol y que además
789 conserva el mismo peso que del péptido expresado en planta, pero la señal
790 positiva en todas las fracciones obtenidas durante la purificación además de la
791 pérdida de péptido a 50mM de Imidazol, indican que el péptido no se está
792 adhiriendo a la resina con buena afinidad, por lo cual el siguiente paso fue buscar
793 el buffer adecuado para evitar la pérdida de péptido durante el proceso de
794 purificación.

795

796 **5.6 Diálisis de la elución 4 de *E. coli* BL21**

797 Se realizó la diálisis de la elución 4 de HRA2pl expresada en bacteria para
798 eliminar el Imidazol remanente que queda en la muestra eluída, con esta finalidad
799 se utilizó el buffer de extracción nativo que es similar al de elución, pero que
800 carece de Imidazol, se cuantificó por Bradford la proteína antes y después de
801 dializar y se detectó una pérdida de 0.38 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, quedando en una concentración
802 de 0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A partir de aquí este péptido se utilizó como control de
803 quimioluminiscencia.

804 **5.7 PURIFICACIÓN DE HRA2pl A PARTIR DE *N. benthamiana***

805 A partir de la proteína soluble total de los días 8, 9 y 10 post-infiltración de las
806 hojas de *N. benthamiana* se purificó por columna de níquel el péptido HRA2pl
807 siguiendo el procedimiento ya descrito, pero con el buffer de extracción utilizado
808 para planta, pero debido a la baja cantidad de péptido purificado, no se pudo
809 obtener una película adecuada para presentar, por esta misma razón se decidió
810 trabajar con la elución de 250 mM de Imidazol, que al cuantificarse por Bradford
811 dio la mayor concentración de 0.026 µg/ µL.

812 **5.8 EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBIDOR DE HRA2pl**

813 **5.8.1 Ensayo de citotoxicidad**

814 Se evaluaron los extractos crudos de proteína tanto de plantas WT (WT_{PST}) como
815 transformadas transitoriamente (HRA_{PST}), además del buffer de extracción (B_{PST}),
816 el péptido de planta purificado a 250 mM de Imidazol (HRA2pl), y el buffer de
817 elución a 250 mM de imidazol (BE_I); para el ensayo se ajustaron las
818 concentraciones de cada condición como lo muestra la Tabla 3, con base en los
819 ensayos realizados por la Dra. Verónica A. Márquez Escobar, excepto la
820 concentración del péptido purificado (y por lo tanto del imidazol) que debió ser
821 mayor (2.85×10^{-3} µg/ µL) y por un error técnico quedó a 2.1×10^{-3} µg/ µL.

822 La viabilidad para las células (HEp-2 y Vero) con el B_{PST}, WT_{PST}, HRA_{PST}, fue
823 evidentemente baja, ya que al observarse el pozo al microscopio, la monocapa
824 desaparecía y el conteo de células con respecto al medio de cultivo (DMEM)
825 disminuía en aproximadamente 80%, para HRA2pl, la viabilidad en ambos tipos
826 celulares fue parecida al control positivo (DMEM) y en BE_I, se observa una
827 cantidad mayor de células a partir del tiempo cero, que podría atribuirse a que el
828 pozo contenía un mayor número de células inicialmente, como se puede observar
829 en la Fig.14.

830 Lo que indica que posiblemente algún componente del buffer de extracción, lisó a
831 las células. Una de las diferencias entre B_{PST} y BE_I es que el primero contiene
832 SDS y el segundo carece de éste y contiene imidazol, el SDS es un detergente
833 que se utiliza en la extracción de proteínas para lisar las células vegetales y

834 aunque en los extractos de PST WT y HRA la cantidad de SDS debiera ser menor
835 debido a que ya lisó las células vegetales, el remanente que queda en los
836 extractos también disminuye el número de células vivas para ambas líneas
837 celulares.

838 **5.8.2 Ensayo de unión**

839 Una vez evaluada la viabilidad celular a las concentraciones que también se
840 utilizaron para el ensayo de inhibición viral o ensayo de unión, se evaluó una dosis
841 más baja de HRA2pl para ambos virus. Los ensayos se realizaron por triplicado
842 para las réplicas biológicas y experimentales. La evaluación de la inhibición viral
843 se realizó de forma semicuantitativa mediante microscopía de campo claro
844 marcando como positivo para infección viral la dilución en la que se observó desde
845 un sincicio (Fig. 15). En la Fig. 15 se observa la disminución de sincicios (15d y
846 15h) cuando está presente el péptido. Para hRUV-2 la inhibición viral se comenzó
847 a observar desde diluciones de 5:81 (Fig. 16) de un stock 10^9 TCID₅₀, además de
848 que conforme aumentaba la concentración de HRA2pl con respecto al virus (Fig.
849 17a), se observó disminución en el tamaño de los sincicios y en el número de
850 sincicios con respecto al control positivo de infección en las diluciones del virus.
851 Se observó algo similar para hOPV (Fig. 17b), excepto que se notó una inhibición
852 de la fusión viral desde diluciones 4:27 (Fig. 16), además de que como se trata del
853 linaje B de este virus los sincicios son menos evidentes y más pequeños que los
854 de hRUV-2 y del linaje A de hOPV. A pesar de que HRA2pl fue diseñado a partir
855 de la secuencia de HRA-2 de la proteína F de hMPV, y que en un ensayo previo
856 realizado en Canadá, el péptido HRA2 expresado en bacteria, mostró poca
857 inhibición de la fusión viral de hOPV A y nula inhibición de hREV-3 (PIV-3)
858 (Defrasnes et al. 2008), este ensayo realizado en la presente tesis con el péptido
859 producido en plantas, demostró inhibir la fusión viral de hOPV B y hRUV-2 (PIV-2),
860 lo cual podría deberse a la diferencia entre los virus y a las glicosilaciones que se
861 dan en planta y no en bacteria (Lomonossoff and D'Aoust 2016), la inhibición para
862 estos virus, se puede explicar debido a que es una proteína conservada, ya que al
863 ser una proteína crucial para la internalización del virus a la célula no puede

864 cambiar tanto que perdiera su acción, según Wertz y Moudy 2004, y Day et
865 al.,2006, demostraron que las cisteínas (37, 313, 322, 333, 343, 358, 367,
866 393,416, y 439) que no solo le dan el plegamiento post-fusogénico, sino que
867 además se encuentran conservadas en los miembros de la familia
868 Paramyxoviridae y Pneumoviridae y por último que la diferencia entre las
869 longitudes del hOPV y hMPV en la forma precursora (F0) se debe a que el corte
870 de la proteína se da en dos sitios para hOPV y uno para hMPV (Day et al. 2006;
871 Melero and Mas 2015; Tapia et al. 2014; Wertz and Moudy 2004).

872 Mediante el cálculo del TCID₅₀, se pudo cuantificar el efecto de las diferentes dosis
873 de HRA2pl, sobre ambos virus. hOPV B disminuyó como lo muestra la Fig. 17d, en
874 una razón de inhibición del doble con respecto al control positivo de infección, para
875 la dosis 1, y aunque entre las dosis no se perciben diferencias significativas de
876 inhibición, la razón de inhibición con respecto al control de infección es de 6 veces
877 para la dosis 2 y de 9 para la dosis 3, lo cual indica que la inhibición para este
878 virus podría ser dosis dependiente. Por otro lado, el control negativo de inhibición
879 (BE_I) no muestra inhibición. Para hRUV-2 como podemos observar en la Fig. 17c,
880 ambas dosis disminuyen la fusión viral, aunque en ese caso la dosis mayor no
881 muestra una relación mayor de inhibición, sin embargo al observar al microscopio,
882 sí disminuyen en número y tamaño de sincicios respecto al control positivo y el
883 control negativo de inhibición al igual que para hOPV B no muestra tener efecto
884 sobre el virus o las células.

885

886

887

888

6 CONCLUSIONES

889 1.- Es posible expresar en plantas el péptido HRA2pl, mediante la técnica de
890 Magniffection® y purificarlo mediante columna de níquel.

891 2.- A pesar de que el péptido HRA2pl está diseñado a partir de hMPV, inhibe la
892 fusión virus-célula de otros géneros, como hOPV B y hRUV-2 debido a las
893 similitudes tanto en la función como en la conformación de la proteína de fusión y
894 para el caso de hRUV-2 con la dosis menor del péptido (1.8µg/µL), es suficiente
895 observar la inhibición.

896 3. El péptido HRA2pl además de inhibir la formación de sincicios en las líneas
897 celulares Vero y HEp-2, disminuye la cantidad y tamaño de sincicios en las
898 diluciones donde hay efecto citopático.

899

7 PERSPECTIVAS

900 El péptido HRA2pl producido en plantas, podría ser utilizado como tratamiento
901 profiláctico de emergencia en guarderías y hospitales para prevenir infecciones
902 por estos patógenos respiratorios, cuando se observen casos de infección por
903 hMPV, hOPV B y hRUV-2.

904

905

8 REFERENCIAS

- 906 Backovic M, Jardetzky TS (2009) Class III viral membrane fusion proteins. *Current*
907 *opinion in structural biology* 19(2):189-196
- 908
- 909 Brady MT, Evans J, Cuartas J (1990) Survival and disinfection of parainfluenza viruses on
910 environmental surfaces. *American journal of infection control* 18(1):18-23
- 911
- 912 Cespedes PF, Palavecino CE, Kalergis AM, Bueno SM (2016) Modulation of Host
913 Immunity by the Human Metapneumovirus. *Clinical microbiology reviews* 29(4):795-818
- 914
- 915 Connolly SA, Leser GP, Yin HS, Jardetzky TS, Lamb RA (2006) Refolding of a
916 paramyxovirus F protein from prefusion to postfusion conformations observed by liposome
917 binding and electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*
918 *United States of America* 103(47):17903-17908
- 919
- 920 Cox RG, Mainou BA, Johnson M, Hastings AK, Schuster JE, Dermody TS, Williams JV
921 (2015) Human Metapneumovirus Is Capable of Entering Cells by Fusion with Endosomal
922 Membranes. *PLoS pathogens* 11(12):e1005303
- 923
- 924 Cox RM, Plemper RK (2017) Structure and organization of paramyxovirus particles.
925 *Current opinion in virology* 24:105-114
- 926
- 927 Curtiss R, Cardineau GA (1997) Oral immunization by transgenic plants. In: *Google*
928 *Patents,*
- 929
- 930 Day ND, Branigan PJ, Liu C, Gutshall LL, Luo J, Melero JA, Sarisky RT, Del Vecchio AM
931 (2006) Contribution of cysteine residues in the extracellular domain of the F protein of
932 human respiratory syncytial virus to its function. *Virology journal* 3:34
- 933
- 934 Deffrasnes C, Hamelin ME, Prince GA, Boivin G (2008) Identification and evaluation of a
935 highly effective fusion inhibitor for human metapneumovirus. *Antimicrob Agents*
936 *Chemother* 52(1):279-287
- 937
- 938 Durbin AP, McAuliffe JM, Collins PL, Murphy BR (1999) Mutations in the C, D, and V
939 open reading frames of human parainfluenza virus type 3 attenuate replication in rodents
940 and primates. *Virology* 261(2):319-330
- 941
- 942 Esposito S, Mastrolia MV (2016) Metapneumovirus Infections and Respiratory
943 Complications. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 37(4):512-522
- 944
- 945 Flores W, Ochoa H, Briggs J, Garcia R, Kroeger A (2003) Economic costs associated with
946 inadequate drug prescribing: an exploratory study in Chiapas, Mexico. *Acta tropica*
947 88(1):57-68
- 948

949 Fraser CS, Jha A, Openshaw PJ (2017) Vaccines in the Prevention of Viral Pneumonia.
950 Clinics in chest medicine 38(1):155-169
951
952 Frost HM, Robinson CC, Dominguez SR (2014) Epidemiology and clinical presentation of
953 parainfluenza type 4 in children: a 3-year comparative study to parainfluenza types 1-3. The
954 Journal of infectious diseases 209(5):695-702
955
956 Fry AM, Curns AT, Harbour K, Hutwagner L, Holman RC, Anderson LJ (2006) Seasonal
957 trends of human parainfluenza viral infections: United States, 1990-2004. Clinical
958 infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America
959 43(8):1016-1022
960
961 Galvez NMS, Soto JA, Kalergis AM (2017) New Insights Contributing to the Development
962 of Effective Vaccines and Therapies to Reduce the Pathology Caused by hRSV.
963 International journal of molecular sciences 18(8)
964
965 Gill PJ, Richardson SE, Ostrow O, Friedman JN (2017) Testing for Respiratory Viruses in
966 Children: To Swab or Not to Swab. JAMA pediatrics 171(8):798-804
967
968 Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S (2005) Magniffection--a new platform for expressing
969 recombinant vaccines in plants. Vaccine 23(17-18):2042-2048
970
971 Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S (2007) Viral vectors for the expression of proteins in
972 plants. Current opinion in biotechnology 18(2):134-141
973
974 Greninger AL, Makhous N, Kuypers J, Shean RC, Jerome KR (2017) Genome sequences
975 of viral positives at UW Virology. In, Unpublished
976
977 Hall CB, Douglas RG, Jr., Geiman JM (1980) Possible transmission by fomites of
978 respiratory syncytial virus. The Journal of infectious diseases 141(1):98-102
979
980 Henrickson KJ (2003) Parainfluenza viruses. Clinical microbiology reviews 16(2):242-264
981 Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K (1989) Production of antibodies in transgenic plants.
982 Nature 342(6245):76-78
983
984 Hodinka RL (2016) Respiratory RNA Viruses. Microbiology spectrum 4(4)
985
986 ICTV (2017) In, International Committee on Taxonomy of Viruses
987
988 INEGI INdEyG (2016) Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de
989 edad y sexo del fallecido. In, p Consulta de resultados. Tabuladores básicos
990
991 Jardetzky TS, Lamb RA (2014) Activation of paramyxovirus membrane fusion and virus
992 entry. Current opinion in virology 5:24-33
993
994 Komada H, Kawano M, Uefuji A, Ito M, Tsurudome M, Hatakeyama E, Nakanishi M,
995 Sakue S, Joh C, Suzumura E, Tamaki T, Tomioka T, Nishio M, Tsumura H, Uematsu J,

996 Yamamoto H, O'Brien M, Bando H, Ito Y (2011) Completion of the full-length genome
997 sequence of human parainfluenza virus types 4A and 4B: sequence analysis of the large
998 protein genes and gene start, intergenic and end sequences. *Archives of virology*
999 156(1):161-166

1000 Lamb RA, Jardetzky TS (2007) Structural basis of viral invasion: lessons from
1001 paramyxovirus F. *Current opinion in structural biology* 17(4):427-436

1002 Latorre P, Cadd T, Itoh M, Curran J, Kolakofsky D (1998) The various Sendai virus C
1003 proteins are not functionally equivalent and exert both positive and negative effects on viral
1004 RNA accumulation during the course of infection. *Journal of virology* 72(7):5984-5993

1005 Lee JH, Ko K (2017) Production of Recombinant Anti-Cancer Vaccines in Plants.
1006 *Biomolecules & therapeutics* 25(4):345-353

1007 Levy C, Aerts L, Hamelin ME, Granier C, Szecsi J, Lavillette D, Boivin G, Cosset FL
1008 (2013) Virus-like particle vaccine induces cross-protection against human
1009 metapneumovirus infections in mice. *Vaccine* 31(25):2778-2785

1010 Liu WK, Liu Q, Chen DH, Liang HX, Chen XK, Huang WB, Qin S, Yang ZF, Zhou R
1011 (2013) Epidemiology and clinical presentation of the four human parainfluenza virus types.
1012 *BMC infectious diseases* 13:28

1013 Lomonosoff GP, D'Aoust MA (2016) Plant-produced biopharmaceuticals: A case of
1014 technical developments driving clinical deployment. *Science* 353(6305):1237-1240

1015 Ma JK, Drake PM, Christou P (2003) The production of recombinant pharmaceutical
1016 proteins in plants. *Nature reviews. Genetics* 4(10):794-805

1017 Marillonnet S, Giritch A, Gils M, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y (2004) In planta
1018 engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules
1019 delivered by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*
1020 *United States of America* 101(18):6852-6857

1021 Marquez-Escobar VA, Tirado-Mendoza R, Noyola DE, Gutierrez-Ortega A, Alpuche-Solis
1022 AG (2015) HRA2pl peptide: a fusion inhibitor for human metapneumovirus produced in
1023 tobacco plants by transient transformation. *Planta* 242(1):69-76

1024 Melero JA, Mas V (2015) The Pneumovirinae fusion (F) protein: A common target for
1025 vaccines and antivirals. *Virus research* 209:128-135

1026 Mould-Quevedo JF, Contreras-Hernandez I, Martínez-Valverde S, Villasis-Keever MA,
1027 Granados-García VM, Salinas-Escudero G, Muñoz-Hernández O (2012) Direct medical
1028 costs of treading Mexican children under 2 years of age with respiratory syncytial virus.
1029 *Boletín médico del Hospital Infantil de México* 69(2):111-115

1030 Murray MT, Heitkemper E, Jackson O, Neu N, Stone P, Cohen B, Saiman L, Hutcheon G,
1031 Larson EL (2016) Direct costs of acute respiratory infections in a pediatric long-term care
1032 facility. *Influenza and other respiratory viruses* 10(1):34-36

1033 Ortega-Berlanga B, Musiyuchuk K, Shoji Y, Chichester JA, Yusibov V, Patino-Rodriguez
1034 O, Noyola DE, Alpuche-Solis AG (2016) Engineering and expression of a RhoA peptide
1035 against respiratory syncytial virus infection in plants. *Planta* 243(2):451-458

1036 Panda S, Mohakud NK, Pena L, Kumar S (2014) Human metapneumovirus: review of an
1037 important respiratory pathogen. *International journal of infectious diseases : IJID : official*
1038 *publication of the International Society for Infectious Diseases* 25:45-52

1039 Pawelczyk M, Kowalski ML (2017) The Role of Human Parainfluenza Virus Infections in
1040 the Immunopathology of the Respiratory Tract. *Current allergy and asthma reports* 17(3):16

1041 Pessi A, Langella A, Capito E, Ghezzi S, Vicenzi E, Poli G, Ketas T, Mathieu C, Cortese
1042 R, Horvat B, Moscona A, Porotto M (2012) A general strategy to endow natural fusion-
1043 protein-derived peptides with potent antiviral activity. *PloS one* 7(5):e36833
1044

1045 Porotto M, Yokoyama CC, Palermo LM, Mungall B, Aljofan M, Cortese R, Pessi A,
1046 Moscona A (2010) Viral entry inhibitors targeted to the membrane site of action. *Journal of*
1047 *virology* 84(13):6760-6768
1048

1049 Raghunandan R, Lu H, Zhou B, Xabier MG, Massare MJ, Flyer DC, Fries LF, Smith GE,
1050 Glenn GM (2014) An insect cell derived respiratory syncytial virus (RSV) F nanoparticle
1051 vaccine induces antigenic site II antibodies and protects against RSV challenge in cotton
1052 rats by active and passive immunization. *Vaccine* 32(48):6485-6492
1053

1054 Romero Feregrino R, Romero Feregrino R, mora Magaña I, Gonzales Saldaña N (2013)
1055 Diagnóstico de Metapneumovirus humano.
1056

1057 Revisión sistemática de la literatura. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría Vol*
1058 *XXVI (Núm 103)*
1059

1060 Scheid A, Choppin PW (1976) Protease activation mutants of sendai virus. Activation of
1061 biological properties by specific proteases. *Virology* 69(1):265-277
1062

1063 Schuster JE, Williams JV (2014) Human Metapneumovirus. *Microbiology spectrum* 2(5)
1064

1065 Shamloul M, Trusa J, Mett V, Yusibov V (2014) Optimization and utilization of
1066 Agrobacterium-mediated transient protein production in Nicotiana. *Journal of visualized*
1067 *experiments : JoVE* (86)
1068

1069 Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, Riggs JM, Surman SR, Amaro-Carambot E,
1070 McAuliffe JM, Elkins WR, St Claire M, Collins PL, Murphy BR (2004) The two major
1071 human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically, and the fusion
1072 (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness. *Journal of virology*
1073 *78(13):6927-6937*
1074

1075 Tapia LI, Shaw CA, Aideyan LO, Jewell AM, Dawson BC, Haq TR, Piedra PA (2014)
1076 Gene sequence variability of the three surface proteins of human respiratory syncytial virus
1077 (HRSV) in Texas. *PloS one* 9(3):e90786
1078

1079 ViralZone Rubulavirus. In, *Bioinformatics Resource Portal*
1080

1081 Walter JM, Wunderink RG (2017) Severe Respiratory Viral Infections: New Evidence and
1082 Changing Paradigms. *Infectious disease clinics of North America* 31(3):455-474
1083

1084 Wei HY, Tsao KC, Huang CG, Huang YC, Lin TY (2013) Clinical features of different
1085 genotypes/genogroups of human metapneumovirus in hospitalized children. *Journal of*
1086 *microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* 46(5):352-357

1087 Wei Y, Zhang Y, Cai H, Mirza AM, Iorio RM, Peeples ME, Niewiesk S, Li J (2014) Roles
1088 of the putative integrin-binding motif of the human metapneumovirus fusion (f) protein in
1089 cell-cell fusion, viral infectivity, and pathogenesis. *Journal of virology* 88(8):4338-4352
1090

1091 Wen X, Pickens J, Mousa JJ, Leser GP, Lamb RA, Crowe JE, Jr., Jardetzky TS (2016) A
1092 Chimeric Pneumovirus Fusion Protein Carrying Neutralizing Epitopes of Both MPV and
1093 RSV. *PloS one* 11(5):e0155917
1094

1095 Wertz GW, Moudy RM (2004) Antigenic and genetic variation in human respiratory
1096 syncytial virus. *The Pediatric infectious disease journal* 23(1 Suppl):S19-24
1097

1098 Wolf JM, Gregianini TS, Seadi CM, Tumieto GL, Dambros BP, Lehmann FK, Carli SD,
1099 Ikuta N, Lunge VR (2015) Performance of direct immunofluorescence assay for the
1100 detection of human metapneumovirus under clinical laboratory settings. *Revista da*
1101 *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48(6):762-764
1102

1103 Wong-Chew RM, Garcia-Leon ML, Noyola DE, Perez Gonzalez LF, Gaitan Meza J,
1104 Vilasenor-Sierra A, Martinez-Aguilar G, Rivera-Nunez VH, Newton-Sanchez OA, Firo-
1105 Reyes V, Del Rio-Almendarez CN, Gonzalez-Rodriguez AP, Ortiz-Garcia ER, Navarrete-
1106 Navarro S, Soria-Rodriguez C, Carrasco-Castillo A, Sanchez-Medina E, Lopez-Martinez I,
1107 Hernandez-Andrade T, Alpuche-Aranda CM, Santos-Preciado JI (2017) Respiratory viruses
1108 detected in Mexican children younger than 5 years old with community-acquired
1109 pneumonia: a national multicenter study. *International journal of infectious diseases : IJID :*
1110 *official publication of the International Society for Infectious Diseases* 62:32-38
1111

1112 Zhang D, Feng Z, Zhao M, Wang H, Wang L, Yang S, Li G, Lu L, Ma X (2016) Clinical
1113 Evaluation of a Single-Tube Multiple RT-PCR Assay for the Detection of 13 Common
1114 Virus Types/Subtypes Associated with Acute Respiratory Infection. *PloS one*
1115 11(4):e0152702
1116

1117 Zhu Q, McAuliffe JM, Patel NK, Palmer-Hill FJ, Yang CF, Liang B, Su L, Zhu W,
1118 Wachter L, Wilson S, MacGill RS, Krishnan S, McCarthy MP, Losonsky GA, Suzich JA
1119 (2011) Analysis of respiratory syncytial virus preclinical and clinical variants resistant to
1120 neutralization by monoclonal antibodies palivizumab and/or motavizumab. *The Journal of*
1121 *infectious diseases* 203(5):674-682
1122

1123

1124

1125

1126

1127

9 TABLA

1128

1129

Tabla 3

1130

Concentración de las muestras para la evaluación de la viabilidad celular. Todas las soluciones fueron diluidas en medio DMEM.

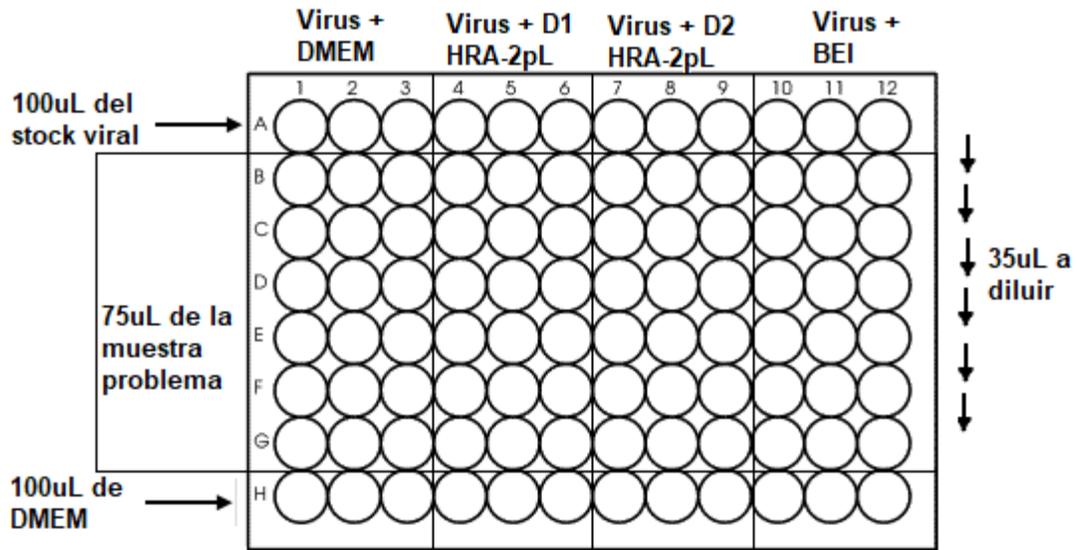
Condición	WT _{PST}	HRA _{PST}	HRA2pl	BE _I	B _{PST}
	μg/ μL				
Concentración	0.0943	0.0943	2.1x10 ⁻³	Imidazol: 20 μM	Tritón: 0.01% DIECA: 1 μM

1131

1132

1133

10 FIGURAS



1134

1135 **Fig. 4**

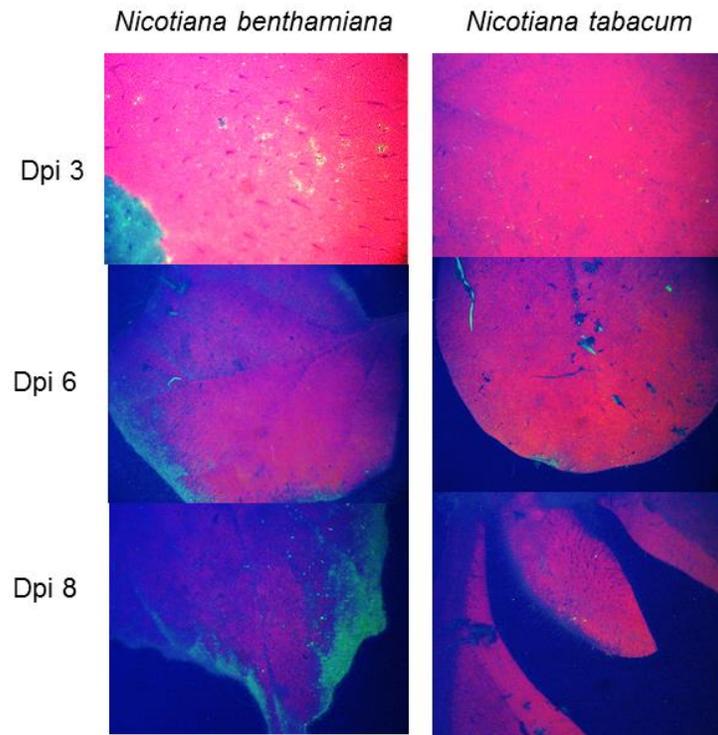
1136 Diseño de la placa del ensayo de unión.

1137

1138

1139

1140

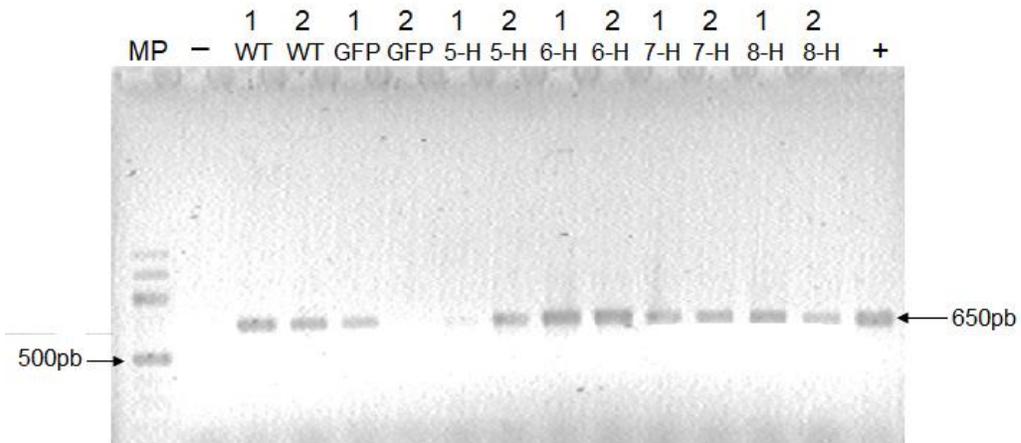


1141

1142 **Fig. 5**

1143 Expresión de GFP, usada como control positivo de la agroinfiltración. En la
1144 columna de la izquierda podemos observar hojas de *N. benthamiana* las cuales
1145 fueron sometidas al mismo proceso de agroinfiltración que las plantas de la
1146 derecha (*N. tabacum*). La expresión de GFP tiene pico máximo al octavo día post-
1147 infiltración (dpi) en *N. bethamiana*, el cual no se observa para *N. tabacum*.
1148

1149



1150

1151 **Fig. 6**

1152 PCR de actinas. MP: Marcador de peso molecular 100pb, WT: Wild type, GFP:

1153 Proteína verde fluorescente, 5-H: HRA2pl al 5dpi, 6-H: HRA2pl al 6dpi, 7-H:

1154 HRA2pl al 7dpi, 8-H:HRA2pl al 8dpi, +: control positivo de la PCR, -: control

1155 negativo de la PCR, 1: muestra uno de ADN, 2:Segunda muestra de ADN

1156

1157

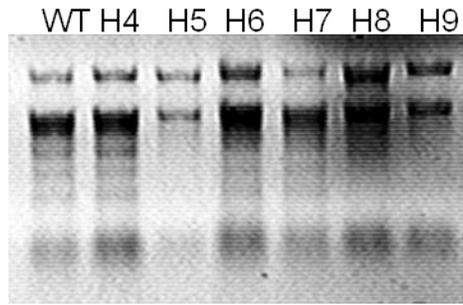
1158

1159

1160

1161

1162



1163

Fig. 7

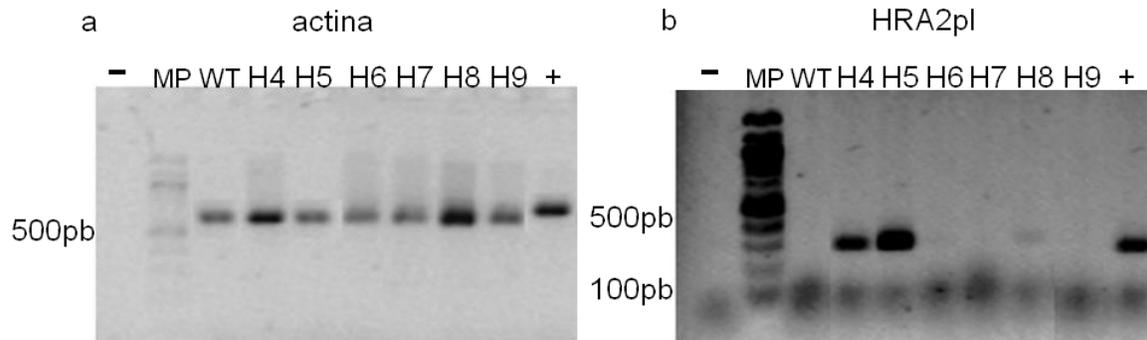
1164

Gel de calidad de ARN. WT: Wild Type, H4: HRA2pl al 4dpi, H5: HRA2pl al 5dpi, H6: HRA2pl al 6dpi, 7H: HRA2pl al 7dpi, 8H: HRA2pl al 8dpi, 9H: HRA2pl al 9dpi.

1165

1166

1167



1168

1169

1170

1171

1172

1173

1174

1175

1176

1177

1178

1179

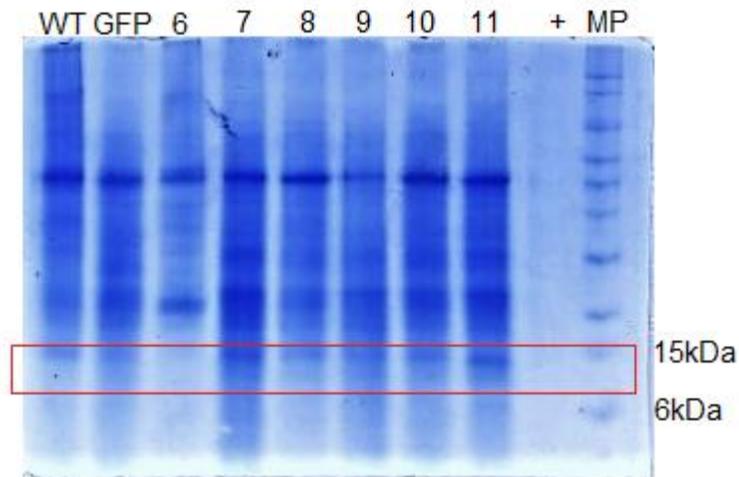
1180

1181

Fig. 8

Detección de los transcritos de actina y del gen HRA2pl. **a** PCR actina producto de amplificación de 650pb, **b** PCR HRA2pl producto de amplificación de 360pb. MP: Marcador de peso molecular 100pb, WT: Wild Type, H4: HRA2pl al 4dpi, H5: HRA2pl al 5dpi, H6: HRA2pl al 6dpi, H7: HRA2pl al 7dpi, H8: HRA2pl al 8dpi, H9: HRA2pl al 9dpi, +: control positivo de la PCR, -: control negativo de la PCR.

1182



1183

1184

Fig. 9

1185

1186

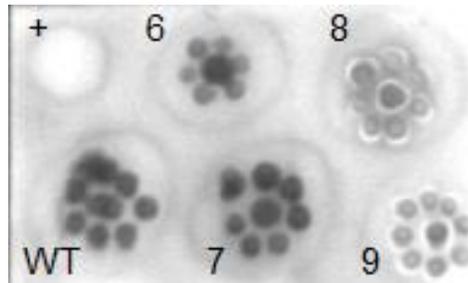
1187

1188

1189

Electroforesis de proteínas SDS-PAGE Tricina al 16%. De izquierda a derecha, WT: Extracto de proteínas sin agroinfiltrar, GFP: Extracto de proteínas de plantas agroinfiltradas con GFP, 6: Proteína Soluble Total (PST) de plantas agroinfiltradas para HRA2pl al dpi 6, 7: PST al dpi 7, 8: PST al dpi 8, 9: PST al dpi 9, 10: PST al dpi 10, 11: PST al 11 dpi, +: Control positivo PTF5, MP: Marcador de Peso. El peso aproximado del péptido antiviral HRA2pl es de 11 kDa.

1190



1191

1192

1193

1194

1195

1196

1197

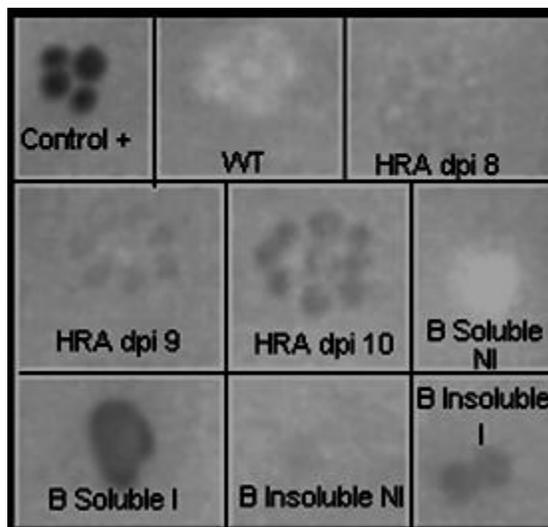
1198

1199

Fig. 10

Detección del péptido antiviral por quimioluminiscencia. De izquierda a derecha, +: Control positivo de una proteína con etiqueta de histidinas PTF5, WT: Extracto de proteínas de una planta sin agroinfiltrar, 6 PTS de plantas agroinfiltradas para HRA2pl al sexto dpi, 7: PTS al séptimo dpi, 8: PTS al octavo dpi, 9: PTS al noveno dpi.

1200



1201

1202

1203

1204

1205

1206

1207

1208

1209

1210

1211

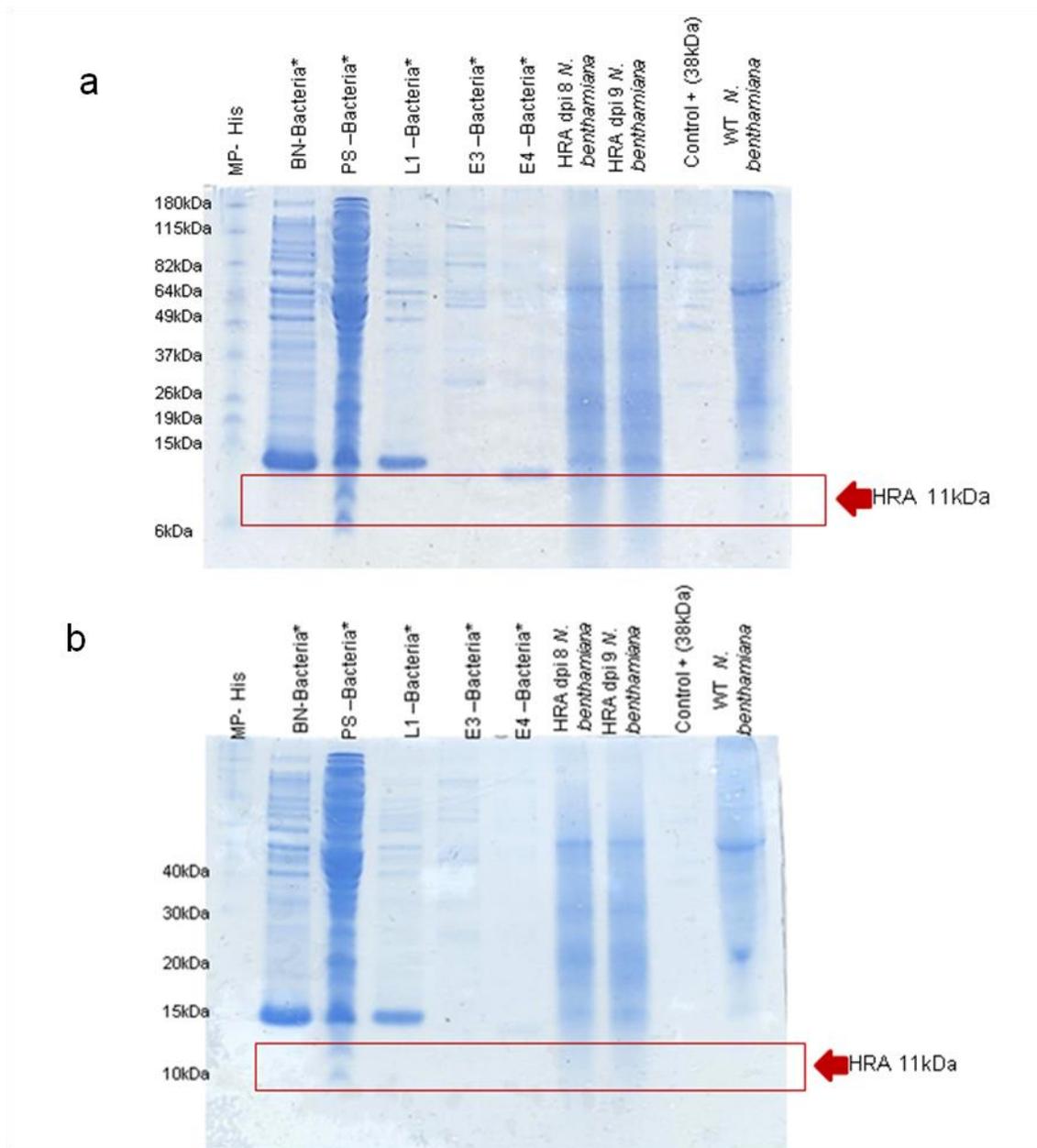
1212

1213

1214

Fig. 11

Inducción y extracción de proteínas producidas en *E. coli* BL21. De izquierda a derecha, +: Control positivo para etiqueta de histidinas PTF5, WT: Extracto de proteínas de plantas sin agroinfiltrar, HRA dpi 8: Extracto de proteínas de plantas para HRA2pl al dpi 8, HRA dpi 9: Extracto de proteínas de plantas para HRA2pl al dpi 9, HRA dpi 10: Extracto de proteínas de plantas para HRA2pl al dpi 10, B Soluble NI: Extracto soluble de proteínas de bacterias BL21 no inducidas, B Soluble I: Extracto soluble de proteínas de bacterias BL21 inducidas, B Insoluble NI: Extracto insoluble de proteínas de bacterias BL21 no inducidas, B Insoluble I: Extracto insoluble de proteínas de bacterias BL21 inducidas



1215

1216

1217

1218

1219

1220

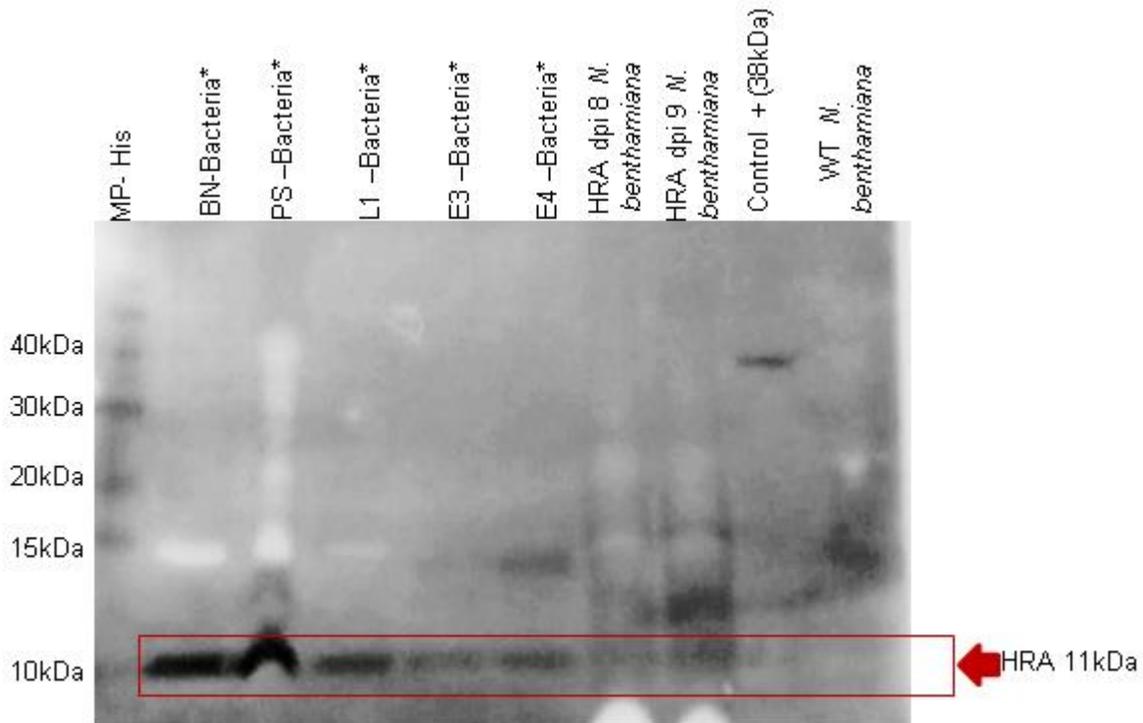
1221

1222

1223

Fig. 12

Electroforesis de proteínas purificadas por columna de níquel y transferidas a la membrana de PVDF. Geles SDS-PAGE Tricina al 16%, **a** Gel sin transferir, **b** Gel transferido a PVDF. De izquierda a derecha, MP-His: Marcador de peso con etiqueta de Histidinas, BN-Bacteria: Fracción del Buffer Nativo que pasó por la columna, PS-Bacteria: Extracto de proteínas obtenidas con el buffer nativo sin pasar por la columna, L1-Bacteria: Lavado a 50mM de Imidazol, E3-Bacteria: Elución a 200 mM de Imidazol, E4-Bacteria: Elución a 500mM de Imidazol: HRA dpi 8 *N. benthamiana*: Extracto de proteínas de plantas agroinfiltradas para HRA2pl al dpi 8, HRA dpi 9 *N. benthamiana*: Extracto de proteínas de plantas agroinfiltradas para HRA2pl al dpi 9, Control +: Control positivo para etiqueta de histidinas PTF5, WT *N. benthamiana*: Extracto de proteínas sin agroinfiltrar.



1225

1226

1227

1228

1229

1230

1231

1232

1233

1234

1235

1236

1237

1238

1239

1240

1241

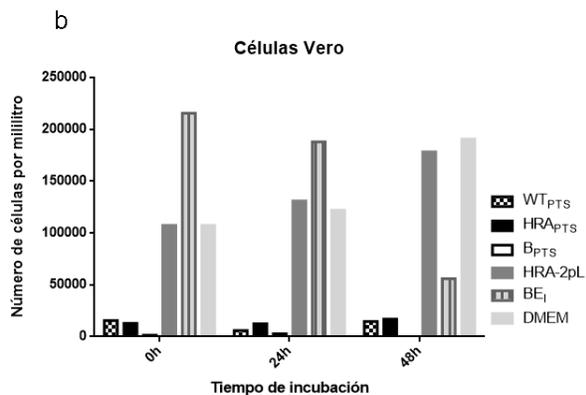
1242

Fig. 13.

Membrana Western blot de las proteínas inducidas y purificadas a partir de *E. coli* BL21. Membrana de PVDF donde se transfirió el gel de la Fig.12a. De izquierda a derecha, MP-His: Marcado de peso con etiqueta de histidinas, BN-Bacteria: Fracción del Buffer Nativo que pasó por la columna, PS-Bacteria: Extracto de proteínas obtenidas con el buffer nativo sin pasar por la columna, L1-Bacteria: Lavado a 50mM de Imidazol, E3-Bacteria: Elución a 200 mM de Imidazol, E4-Bacteria: Elución a 500 mM de Imidazol, HRA dpi 8 *N. benthamiana*: Extracto de proteínas de plantas agroinfiltradas para HRA2pl al dpi 8, HRA dpi 9 *N. benthamiana*: Extracto de proteínas de plantas agroinfiltradas para HRA2pl al dpi 9, Control +: Control positivo para cola de Histidinas PTF5, WT *N. benthamiana*: Extracto de proteínas sin agroinfiltrar, *: Pasó por la resina de níquel, se observa señal positiva en el peso aproximado de HRA2pl (11 kDa), excepto en la planta WT.

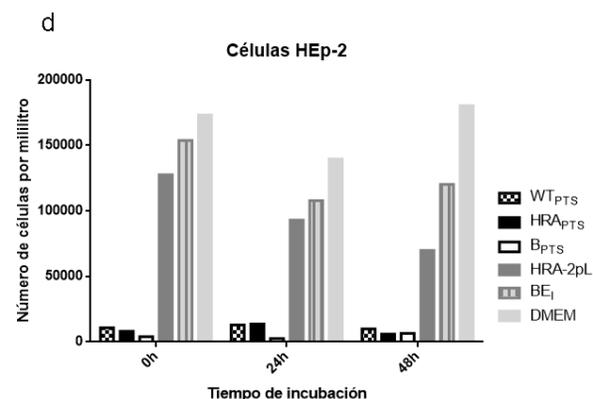
a

Viabilidad Celular (Vero)						
Tiempo	WT _{PTS} Cel/mL	HRA _{PTS} Cel/mL	B _{PTS} Cel/mL	HRA-2pL Cel/mL	BE _i Cel/mL	DMEM Cel/mL
0h	15 556	12 857	1 285	107 228	215 357	107 228
24h	5 787	12 450	2 571	130 849	187 824	121 889
48h	14 560	16 800	0	178 200	56 000	190 400



c

Viabilidad Celular (Hep-2)						
Tiempo	WT _{PTS} Cel/mL	HRA _{PTS} Cel/mL	B _{PTS} Cel/mL	HRA-2pL Cel/mL	BE _i Cel/mL	DMEM Cel/mL
0h	10 826	8 026	3 840	127 680	153 720	173 226
24h	12 880	13 619	2 571	92 960	107 889	139 626
48h	9 856	5 936	6 400	69 809	120 320	180 320

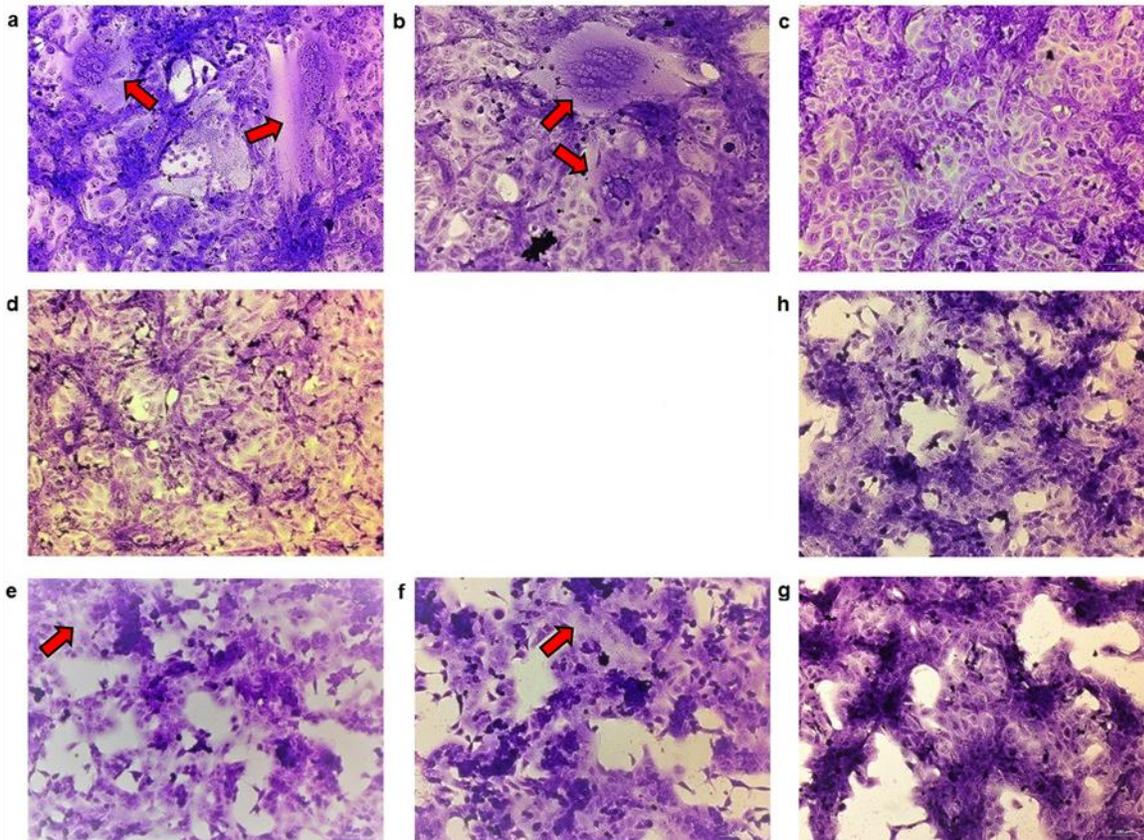


1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251
1252
1253

Fig. 14

Viabilidad Celular. **a** Número de células Vero vivas por mL, **b** Gráfica de viabilidad celular con respecto al control positivo de viabilidad (DMEM) para las células Vero, **c** Número de células HEp-2 vivas por mL, **d** Gráfica de viabilidad celular con respecto al control positivo de viabilidad (DMEM) para las células HEp-2.

1254



1255

1256

1257

1258

1259

1260

1261

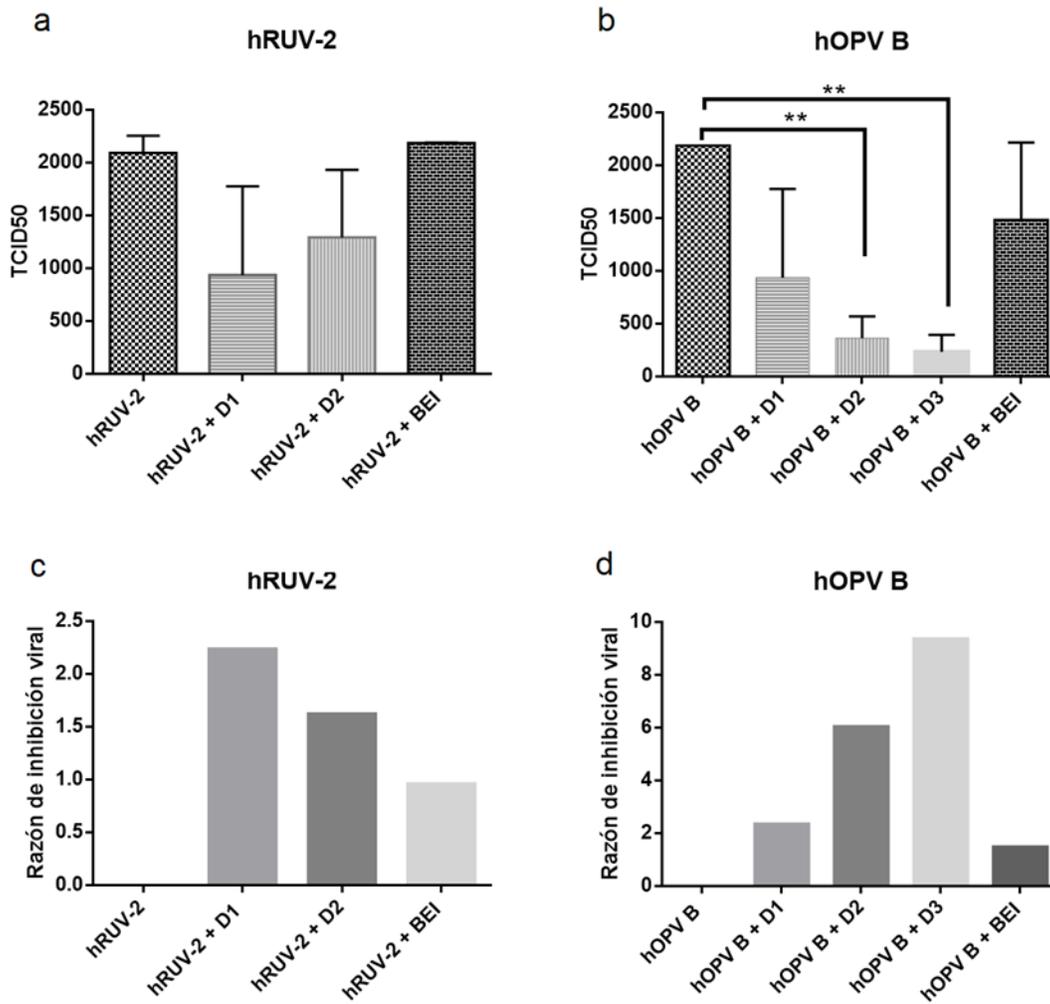
1262

1263

Fig. 15

Evaluación del efecto citopático. Microscopía de campo claro (las flechas rojas indican el sincicio). **a** Control positivo de la infección (hRUV-2 en DMEM) de hRUV-2, **b** hRUV-2 con BE_I, **c** Control negativo de la infección (medio DMEM sin hRUV-2), **d** hRUV-2 con HRA2pl, **e** Control positivo de la infección (hOPV B en DMEM) de hOPV, **f** hOPV B con BE_I, **g** Control negativo de la infección (medio DMEM sin hOPV B), **h** hOPV B con HRA2pl.

1272



1273

1274

1275

Fig. 17

1276

1277

1278

1279

Inhibición viral. **a** Promedio de las réplicas del TCID₅₀ para hRUV, **b** Promedio de las réplicas del TCID₅₀ para hOPV, **c** Razón de inhibición de las condiciones con respecto al control positivo de la infección para hRUV, **d** Razón de inhibición de las condiciones con respecto al control positivo de la infección para hOPV

1280

11 MATERIAL SUPLEMENTARIO1281 **Tabla 4**

1282 Tabla de cepas y plásmidos

Cepa/plásmidos	Descripción y/o genotipo dominante	Referencia
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	C58, Rif ^R , Km ^R , Nopalina, Ti pMP90	Donado por el Dr. Korban de la Universidad de Illinois
<i>Escherichia coli</i> BL21	F ⁻ <i>ompT gal</i>	Colección de laboratorio
pICH4851	Act2, RdRp (Polimerasa dependiente de ARN), MP (proteína de Movimiento), AttP, Nos-T	Donado por Icon Genetics, Halle, Alemania
pICH11599	AttB, ATG, Int (Intrón), Gen de interés (HRA2pl o GFP), 3'NTR (Región no traducida), Nos-T	Donado por Icon Genetics, Halle, Alemania
pICH10881	Act2, Integrasa, Nos-T	Donado por Icon Genetics, Halle, Alemania
pET-28b	T7, SMC, lacl, His tag, T7 term	Colección del laboratorio

1283