



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Evaluación *in silico* y citotoxicidad de péptidos
vs. el Virus Sincicial Respiratorio y diseño de una
proteína antigénica multiepítopo vs. SARS-CoV-2.**

Tesis que presenta

Deyanira Judith De Anda Alejandrez

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2023



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Evaluación *in silico* y citotoxicidad de péptidos vs. el virus sincicial respiratorio y diseño de una proteína antigénica multiepítipo vs. SARS-CoV-2**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Deyanira Judith De Anda Alejandrez** y aprobada el **12 de junio del 2023** 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

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., y en el laboratorio de microbiología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la dirección del Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. de registro 1151265 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Además, recibió el apoyo del Fideicomiso CEEPAC SLP No. 18397, y utilizó la infraestructura del LANBAMA para la realización de los experimentos.

Página en Blanco que se va a utilizar para colocar la copia del acta de examen.

*A mis padres Eduardo De Anda y Judith Alejandre, que sin ellos no estaría donde estoy.
A mi abuelita Hortensia por siempre creer en que yo podía incluso cuando yo no lo hacía.
A ti mi sol por acompañarme desde lejos.*

Agradecimientos

Primeramente, me gustaría agradecer al Dr. Ángel Alpuche, quien me abrió las puertas de su laboratorio y me guio pacientemente en mis pasos como su estudiante.

A la Dra. Karen Reyes, por ser mi mamá en la ciencia y transmitirme su amor y pasión por la ciencia y los virus, por acompañarme en mis crisis y corregirme cuando era necesario.

Al Dr. Daniel Noyola, quien me permitió trabajar en su laboratorio en un proyecto que surgió a medio camino de la maestría. De igual forma al Dr. Juan Carlos, quien me ha apoyado en mis interminables dudas acerca de los protocolos.

A la Dra. Othir Galicia, quien me capacitó en el trabajo con cultivo celular y me apoyaba en cualquier duda que me surgía en el laboratorio.

A la Dra. Nadia Martínez, quien me ha acompañado y enseñado, así como también ha sufrido conmigo los resultados inesperados de los ensayos y celebrado los resultados esperados.

Al LANBAMA por las facilidades otorgadas.

A Rosy y Salvador, quienes siempre estuvieron pendientes de cualquier necesidad y duda que tuviera.

A mis compañerxs y amigxs del posgrado, principalmente a Karen Figueroa, Zeltzin Canales, Ligia Vega, María del Rosario, Luz Islas, quienes fueron apoyo emocional en esta dura y truculenta carrera a la titulación.

A Noodles, mi compañera de viaje y de noches, también a la nueva integrante de la familia: Powder, quienes me acompañaron todas las noches en la escritura de esta tesis.

Al IPICYT por aceptarme y confiar en mi potencial. Así como también al CONAHCYT por el financiamiento 1151265 sin el cual no podría haber terminado la maestría.

CONTENIDO

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Anexos	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 EL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO	2
1.1.1 <i>Epidemiología del VSR</i>	4
1.1.2 <i>La proteína F de VSR.</i>	4
1.1.3 <i>Péptidos antivirales</i>	5
1.2 EL CORONAVIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO AGUDO SEVERO 2 (SARS-CoV-2)	7
1.2.1 <i>Problemas y perspectivas en la vacunación vs. SARS-CoV-2</i>	7
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GENERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	11
2.2.1 <i>Péptidos antivirales</i>	11
2.2.2 <i>Proteína antigénica</i>	11
3 RESULTADOS	12
3.1 PÉPTIDOS ANTIVIRALES VS VSR	12
3.1.1 <i>Estructura de la proteína F en estado de prehairpin</i>	12
3.1.2 <i>Acoplamiento molecular e interacciones péptido proteína</i>	13
3.1.3 <i>Análisis de citotoxicidad</i>	22
3.1.4 <i>Construcción de una curva estándar para el cálculo de número de copias mediante RT-qPCR.</i>	23
3.1.4.4 <i>Ensayo de infección celular de VSR en células HEp-2</i>	27
3.2 PROTEÍNA ANTIGÉNICA	28
3.2.1 <i>Regiones conservadas y antigénicas para las proteínas de las distintas variantes de SARS-CoV-2</i>	28
3.2.2 <i>Diseño de la proteína química y análisis de alergenicidad in silico.</i>	30
3.2.3 <i>Modelado de la proteína in silico.</i>	31
4 DISCUSIÓN	33
4.1 PÉPTIDOS ANTIVIRALES	33
4.2 PROTEÍNA ANTIGÉNICA	35

5 MATERIALES Y MÉTODOS	37
5.1 PÉPTIDOS ANTIVIRALES	37
5.1.1 <i>Generación de una estructura prehairpin para la proteína F de VSR</i>	37
5.1.2 <i>Acoplamiento molecular</i>	38
5.1.3 <i>Interacciones péptido-proteína</i>	39
5.1.5 <i>Ensayo de citotoxicidad</i>	39
5.1.6 <i>Inhibición de la replicación</i>	41
5.2 DISEÑO DE UNA PROTEÍNA ANTIGÉNICA	46
5.2.1 <i>Análisis de regiones conservadas y antigénicas para las proteínas de las distintas variantes de SARS-CoV-2</i>	46
5.2.1.2 <i>Diseño de la proteína quimérica y análisis de alergenicidad in silico.</i>	47
5.2.1.3 <i>Modelado de la proteína en 3D in silico</i>	47
6 CONCLUSIONES	49
7 PERSPECTIVAS	50
8 BIBLIOGRAFÍA	51
9 ANEXOS	59

Lista de tablas

Tabla 1.- Valores arrojados por el servidor HDock para HRA.	13
Tabla 2.- Interacciones péptido HRA versión corta- Proteína en prefusión.	14
Tabla 3.- Interacciones péptido HRA- Proteína en prehairpin.	15
Tabla 4.- Interacciones péptido HRA- Estructura central de la proteína F.	15
Tabla 5.- Interacciones péptido HRA- Proteína en postfusión.	16
Tabla 6.- Valores arrojados por el servidor HDock para PK-2.	16
Tabla 7.- Interacciones péptido PK-2- Proteína en prefusión.	18
Tabla 8.- Interacciones péptido PK-2- Proteína en prehairpin.	19
Tabla 9.- Interacciones péptido PK-2- estructura central de proteína	20
Tabla 10.- Interacciones péptido PK-2- Proteína en postfusión.	21
Tabla 11.- Concentraciones para los plásmidos purificados.	24
Tabla 12.- Tamaño de regiones seleccionadas para la proteína multiepítipo.	30
Tabla 13.- Oligonucleótidos utilizados en la cuantificación de VSR	41
Tabla 14.- Condiciones para la PCR con oligonucleótidos de cuantificación de VSR.	43

Lista de figuras

Figura. 1. Estructura generada en estado de Pre-Hairpin.	12
Figura. 2. Modelos de acoplamiento molecular para F con HRA.	13
Figura. 3. Modelos de acoplamiento molecular para F con PK-2	17
Figura. 4. Viabilidad celular de HEp-2 a distintas concentraciones de HRA	22
Figura. 5. Viabilidad celular de HEp-2 a distintas concentraciones de PK-2.	23
Figura. 6. Gel de electroforesis al 3% con el control positivo.	25
Figura. 7. Curva estándar de qPCR a partir de la región inter-P-M	26
Figura. 8. Cuantificación de carga viral de exudado nasofaríngeo.	27
Figura. 9. Cultivo de células HEp-2 infectadas con VSR.	28
Figura. 10. Sitios antigénicos conservados.	29
Figura. 11. Esquema de la conformación de la proteína multiepítipo YANI.	31
Figura. 12. Modelo por threading realizado en ITASSER de la proteína multiepítipo.	31
Figura. 13. Péptidos diseñados en el equipo de trabajo.	39

Anexos

- A. Reactivos
- B. Equipo

59
61

Resumen

Evaluación *in silico* y citotoxicidad de péptidos vs. el Virus Sincicial

Respiratorio y diseño de una proteína antigénica multiepítipo vs. SARS-CoV-2.

Las enfermedades respiratorias causadas por virus, como el Sincicial Respiratorio (VSR) y el SARS-CoV-2, son las principales responsables de la mortalidad en niños menores de 3 años y en adultos con comorbilidades. El objetivo del presente trabajo fue analizar el potencial inhibitorio *in silico*, de dos péptidos (HRA y PK-2) contra la proteína de fusión F del VSR, mediante ensayos de acoplamiento molecular. Nuestro grupo de trabajo demostró previamente que el péptido HRA diseñado contra la proteína de fusión del metapneumovirus humano funcionó frente a otros virus, y contábamos con el péptido PK-2 diseñado vs. el tallo de la proteína S de SARS-CoV-2, por lo que se probaron contra la entrada del virus VSR a células HEp-2. Se analizaron los acoplamientos moleculares usando el software Discovery Studio para encontrar los aminoácidos que interactuaban entre la unión péptido-proteína. Posteriormente, se analizó la citotoxicidad por medio de ensayos de MTT de los péptidos a distintas concentraciones, en la línea celular HEp-2.

Por otra parte, se analizaron las secuencias de las distintas variantes de preocupación y de interés del SARS-CoV-2, en busca de regiones conservadas que al mismo tiempo tuvieran potencial inmunogénico, realizando los análisis en herramientas como MEGA y en servidores como BepiPred 2.0, con lo que se diseñó la proteína quimérica que contuviera los epítopos seleccionados unidos por espaciadores de glicina y prolina que permitieran la presentación individual de cada epítipo al complejo mayor de histocompatibilidad. También se agregó una región de balance de la respuesta inmune Th1/Th2 y un péptido potenciador de la respuesta inmunológica en tándem.

Se obtuvieron resultados prometedores *in silico* en cuanto al potencial inhibitorio de los péptidos al encontrar fuertes uniones entre ellos y las distintas conformaciones de la proteína de fusión F de VSR, y también se vio que los péptidos no causan citotoxicidad en ninguna de las concentraciones probadas en células HEp-2.

En cuando a la proteína quimérica multiepítipo, se encontraron varios sitios conservados putativamente antigénicos, y se obtuvo una proteína de un total de 385 aminoácidos, la cual está en proceso de ser expresada y purificada para probarla en ensayos de inmunización en ratones.

PALABRAS CLAVE. Péptidos antivirales, acoplamiento molecular, citotoxicidad, vacunas universales, vacunas de subunidades, regiones conservadas.

Abstract

***In silico* evaluation and cytotoxicity of peptides vs. Respiratory Syncytial Virus and design of a multiepitope antigenic protein against SARS-CoV-2.**

Respiratory diseases caused by viruses such as Respiratory Syncytial Virus (RSV) and SARS-CoV-2, are the leading cause of mortality in children under 3 years old and adults with comorbidities. The aim of this study was to perform the inhibitory potential analysis *in silico*, of two designed peptides (HRA y PK-2), against the F fusion protein of RSV through molecular docking assays. Our research group previously demonstrated that HRA peptide designed against the Metapneumovirus fusion protein, worked vs. other viruses, and we also had the PK-2 peptide, designed against the S protein of SARS-CoV-2, then we tested against the RSV entry into HEp-2 cells. The individual molecular docking assays were performed in Discovery Studio software to find the amino acids that interacted between peptide-protein binding. Subsequently, peptide cytotoxicity was analyzed at different concentrations in the HEp-2 cell line using MTT assays.

On the other hand, sequences of different variants of concern and interest of SARS-CoV-2 were analyzed, in search of conserved regions that also had immunogenic potential, conducting the analysis in tools such as MEGA and servers such as BepiPred 2.0, designing the chimeric protein to containing the selected epitopes linked by glycine and proline linkers, which allowed for the individual presentation of each epitope to the major histocompatibility complex. Also was added a Th1/Th2 immunogenic balance region and an enhancer peptide of the immune response in tandem. Promising results were obtained *in silico* analysis regarding the inhibitory potential of the peptides by finding strong bindings between them and the different conformations of the RSV F fusion protein. Also, it was found that the peptides did not cause cytotoxicity at any of the tested concentrations in HEp-2 cells.

Regarding the multi-epitope chimeric protein, several putatively antigenic conserved sites were found, resulting in a total of 385 amino acid protein which is in process of expression and purification to be tested in mice immunization assays.

KEY WORDS. Antiviral peptides, molecular docking, cytotoxicity, universal vaccines, subunit vaccines, conserved regions.

1 INTRODUCCIÓN

El Virus Sincicial Respiratorio (VSR) y el Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2 (SARS-CoV-2), son dos virus respiratorios que han generado gran preocupación debido a su impacto devastador en la salud pública mundial. La pandemia causada por el virus SARS-CoV-2 no solo ha afectado a la forma en que los seres humanos conviven, sino que también se han detectado cambios en el comportamiento de otros virus respiratorios. La enfermedad COVID-19 ha sido la predominante desde el año 2020, por lo que otros virus respiratorios como VSR causantes de enfermedades respiratorias, han dejado de detectarse en el tiempo y espacio donde se solían detectar.

VSR es un virus de RNA de cadena simple negativa que pertenece a la familia Paramyxoviridae (Collins *et al.*, 2013). Infecta el epitelio respiratorio, lo que produce una variedad de manifestaciones clínicas, como infecciones en vías respiratorias superiores, bronquiolitis y neumonía (Collins y Graham, 2007). El pico de infección de VSR en niños solía detectarse por las temporadas de otoño-invierno, pero para el año 2021 se detectaron menos casos, y lo mismo sucedió en temporada de verano (junio-julio) (Olsen *et al.*, 2021).

Por otro lado, SARS-CoV-2 es un virus de RNA de cadena simple positiva que pertenece a la familia Coronaviridae. El virus tiene un tamaño de genoma de aproximadamente 30 kb y codifica 27 proteínas, incluyendo la proteína de espícula (S), la proteína de membrana (M), la proteína de envoltura (E) y la proteína de nucleocápside (N), así como la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) (Wu *et al.*, 2020). SARS-CoV-2 infecta las vías respiratorias, lo que produce una amplia

variedad de síntomas clínicos, como fiebre, tos y dificultad para respirar (CDC, 2021A).

Se ha determinado que el VSR cuenta con un mecanismo de entrada a la célula mediado por 4 conformaciones distintas de la proteína de fusión (F) en el cual las regiones heptadas repetidas (HRA y HRB) juegan un papel muy importante en la yuxtaposición de las membranas celulares del virión y de la célula diana (Zhao *et al.*, 2000). Estas distintas conformaciones son: 1) prefusión, estado en el cual la F se encuentra inactiva, 2) prehairpin, estado en el cual F sufre un cambio conformacional al ser activada dejando expuesto el HRA, quien puede ser blanco para péptidos inhibitorios, 3) después cambia la conformación F a un estado de fusión donde se forma el “core o estructura central” de a proteína conformado por tres HRA y tres HRB unidos, para luego dar paso a la última conformación 4) postfusión en el cual las membranas ya han sido unidas (McLellan *et al.*, 2013)

Por su parte, los coronavirus ingresan a la célula huésped por fusión de su bicapa lipídica con la membrana celular objetivo, paso que es catalizado por la proteína espícula trimérica S que se encuentra en la superficie del virión (Zhang *et al.*, 2021).

1.1 El Virus Sincicial Respiratorio

El VSR es un patógeno respiratorio muy importante responsable de una alta carga económica al sistema de salud mundial, especialmente entre la población de lactantes, niños pequeños y personas inmunocomprometidas (Shi *et al.*, 2015). El entender las características que tiene este virus como lo son su estructura, ciclo de replicación y el significado clínico, es esencial en el desarrollo de estrategias efectivas en su prevención y tratamiento.

El VSR pertenece a la familia Paramixoviridae, dentro del género Pneumovirus, el cual también incluye el metapneumovirus humano (hMPV). Estructuralmente, el VSR es un virus envuelto con un genoma consistente en una cadena de RNA de sentido negativo de una sola hebra. El genoma de VSR tiene aproximadamente 15.2 kb de longitud y codifica 11 proteínas, incluyendo las glicoproteínas de superficie G y F, así como la proteína de nucleocápside N, la RNA polimerasa dependiente de RNA y la proteína hidrofóbica pequeña (SH), las cuales son cruciales para la entrada viral, la adherencia y la evasión inmune (Collins y Graham, 2007; Collins *et al.*, 2013).

El ciclo de replicación del VSR comienza con la unión viral a las células huésped mediada por la proteína G, que se une a receptores específicos, como la heparina sulfato, en la superficie de las células epiteliales respiratorias. Posteriormente, la proteína F sufre un cambio conformacional, lo que conduce a la fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula huésped y la entrada viral. Una vez dentro de la célula huésped, el RNA viral se libera, sirviendo como plantilla para la síntesis y replicación de proteínas virales (Collins *et al.*, 2013; Battles y McLellan, 2019).

Para el 2019, había algunos candidatos a vacunas en desarrollo (39 vacunas de las cuales 19 se encontraban en pruebas clínicas), los cuales incluían vacunas basadas en subunidades o partículas, así como basadas en vectores virales que contienen la proteína F dentro de adenovirus (Mejias *et al.*, 2019); sin embargo, no fue sino apenas recientemente, en mayo del 2023, que se licenció la primera vacuna vs. VSR llamada Arexvy (FDA, 2023). Esto puede ser debido a que en los primeros intentos de desarrollo de una vacuna se vio una respuesta exacerbada de eosinofilia

y causó la muerte de 2 niños debido a un sesgo en la respuesta inmunogénica tipo Th2 (Chanock *et al.*, 1957). Por otro lado, existe la inmunización pasiva con palivizumab, el cual es un anticuerpo monoclonal que puede utilizarse principalmente en la población con alto riesgo ya que es costoso (Hall *et al.*, 2009).

1.1.1 Epidemiología del VSR

El VSR es una de las principales causas de infecciones agudas del tracto respiratorio inferior (ALRI, por sus siglas en inglés), en niños menores de 5 años. En el 2016 se estimó que el VSR causó de 24.8 millones de episodios de ALRI, siendo la causa de muerte en 76,600 casos cada año (Staadegaard *et al.*, 2021). Se ha determinado que las infecciones por VSR son causantes de 3.6 millones de hospitalizaciones en niños de 0 a 60 meses globalmente (Li *et al.*, 2022), lo cual se traduce, solo en Estados Unidos de América, en un costo aproximado de \$709.6 millones de dólares anuales en el tratamiento de los infantes (Bowser *et al.*, 2022). Sin embargo, también la población mayor a 65 años se ve afectada de igual manera, con datos que indican de un 3% a 7% de infecciones en la población adulta de Estados Unidos que presenta comorbilidades, lo que se traduce en 177,000 hospitalizaciones y cerca de 14,000 muertes al año (Falsey *et al.*, 2021).

Antes de la pandemia, el VSR presentaba un patrón estacional, con una mayor incidencia durante los meses de otoño e invierno en regiones templadas, mientras que en países tropicales se pueden presentar infecciones por VSR durante todo el año, con duración de incluso 5-6 meses (Obando-Pacheco *et al.*, 2018). Cuando la pandemia del COVID-19 inició, se detectó que la epidemia de VSR esperada no ocurría, lo que causó que durante el 2020 y 2021 no se encontrara el virus de VSR circulante en la población (Hamid *et al.*, 2023). Por otra parte, a medida

que se aligeraron las medidas de salud y el distanciamiento social, los casos de VSR regresaron, e incluso incrementaron fuera de temporada, en algunos países (Chuang *et al.*, 2023). Estos datos son importantes debido a que las medidas de seguridad e higiene ya han bajado en todo el mundo, lo cual puede resultar en un alza de casos positivos a VSR dentro de la población en corto tiempo.

1.1.2 La proteína F de VSR.

Para poder eliminar en la medida de lo posible las infecciones con VSR, es importante entender el papel de la proteína F en el proceso de infección. La proteína F es una glicoproteína transmembranal que se ensambla como homotrímero, la cual se encuentra en la envoltura vírica. Es responsable de mediar la yuxtaposición de las membranas virales y de la célula diana. Primero, la proteína F se encuentra en estado inactivo como un precursor F0, la cual necesita de un corte para generar las dos subunidades F1 y F2 que se encuentran unidas por un puente disulfuro, lo que da lugar a la forma madura y activa de la proteína F (McLellan, 2013). Cuando la proteína F se encuentra en la superficie de la célula diana, se activa y ocurre un cambio conformacional en el cual pasa de un estado prefusión, a un estado metaestable de prehairpin, para terminar a un estado de postfusión estable. Este cambio se desencadena por la interacción de la proteína con el receptor en el cual se llega a un estado de fusión el cual acerca ambas membranas (Magro *et al.*, 2012).

La subunidad F1 cuenta con un péptido de fusión (FP) en el extremo N terminal, así como también con dos heptadas repetidas (HRA y HRB). Estas HRA y HRB se unen para formar el haz de seis hélices (6HB por sus siglas en inglés), el cual constituye la estructura central en la conformación de postfusión. El papel de estas heptadas repetidas es formar la estructura central y de esta forma colocar las

membranas cercanas una a la otra debido a la diferencia en energía entre las conformaciones de prehairpin y postfusión (Berminham *et al.*, 2018).

Muchos de los tratamientos que se están evaluando van en dirección hacia la proteína F. Se ha demostrado que los anticuerpos dirigidos a esta proteína logran un papel importante en la neutralización del virus y en la inhibición de su replicación, impidiendo que la proteína F se una al receptor de la célula huésped y/o bloqueando los cambios conformacionales necesarios para la fusión de las membranas (Magro *et al.*, 2012). De igual manera, la proteína F ha demostrado generar una respuesta inmune protectora contra el VSR. La inducción de anticuerpos neutralizantes que se dirigen contra la proteína F es de los principales objetivos en los actuales diseños de vacunas (Ngwuta *et al.*, 2015). Recientemente, el enfoque de las vacunas ha puesto énfasis a la proteína de prefusión F, llegando a ensayos de fase II en adultos (Schmoele-Thoma *et al.*, 2022).

1.1.3 Péptidos antivirales

Con el paso del tiempo se ha logrado una mejor caracterización estructural de la proteína F, lo cual ha ayudado al desarrollo de distintas estrategias antivirales. La información estructural ha permitido que se diseñen pequeñas moléculas o inhibidores de la fusión que se dirigen específicamente a la proteína F interfiriendo con el proceso de fusión (McLellan *et al.*, 2013).

Se demostró que el péptido HRA2pl que tiene la estructura de las heptadas repetidas de hMPV, muestra una función antiviral *in vitro* con virus aislados de muestras clínicas tanto de VSR, hMPV y PIV-2, evaluando el tamaño de los sincicios y el título viral, bajando éstos en un 50% y un decremento en 4-log, respectivamente (Meza *et al.*, 2023). El mismo péptido (HRA2pl) se había probado anteriormente

contra hMPV en células HEp-2, dando como resultado la inhibición de la unión del virus a las células en el estado de fusión (Márquez-Escobar *et al.*, 2015).

Sin embargo, no son los únicos péptidos utilizados con ese fin. Se reportó el péptido “VIKI”, derivado del virus de parainfluenza humana tipo 3 (HPIV3, por sus siglas en inglés), el cual inhibió de forma efectiva *in vitro* el HPIV3 y el virus Nipah (NiV), a bajas concentraciones nanomolares. De igual forma, el péptido VIQKI de 36 AA inhibió la fusión del HPIV3, así como del VSR (Contreras *et al.*, 2021).

Por su parte, nuestro grupo de trabajo se encuentra probando distintos péptidos derivados del SARS-CoV-2, que putativamente tienen efecto inhibitorio (datos no publicados) contra el mismo virus del SARS-CoV-2, en mayor o menor medida dependiendo de la variante analizada (comunicación personal Zúñiga-Hernández, 2023).

1.2 El Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2 (SARS-CoV-2)

El virus del SARS-CoV-2 es un nuevo coronavirus que surgió en el 2019, el cual es responsable de la ya finalizada pandemia global de la enfermedad del coronavirus 19 (COVID-19). Este virus es un betacoronavirus que pertenece a la familia Coronaviridae. Contiene un genoma de una sola cadena de RNA de sentido positivo de un tamaño aproximado de 29.9 kb (Wu *et al.*, 2020). De forma estructural se caracteriza por tener la proteína de espícula (S), la cual es una glicoproteína sobresaliente de su membrana vírica. Esta proteína tiene un rol crucial en la entrada del virus a la célula huésped al ser la proteína de unión al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), el cual se encuentra presente en las células diana (Hoffman *et al.*, 2020). La interacción entre este receptor y la proteína S crean una cascada de eventos y señalizaciones como el corte proteolítico de la proteína

S, así como la fusión membranal y la liberación del material genómico del virus en la célula.

Desde su aparición en 2019, el virus se ha propagado de forma rápida a lo largo del planeta, transmitido principalmente por gotas de un individuo afectado a un individuo sano al momento de estornudar o toser, sin embargo, se ha detectado que incluso el contacto cerca de un individuo enfermo puede causar la infección (CDC, 2021 B). Hoy en día se han contabilizado un total de 766,895,075 casos de coronavirus, así como 6,935,889 muertes a lo largo del mundo (WHO, 2023). Esto ha llevado a toda la comunidad científica a la búsqueda de tratamientos tanto profilácticos como terapéuticos para controlar la enfermedad. También, gracias a las nuevas tecnologías, se ha logrado una vigilancia del genoma del virus, lo que permite detectar y rastrear las mutaciones que generan las nuevas variantes del virus que pueden afectar tanto la eficacia de las vacunas como la transmisibilidad del virus (Zhang *et al.*, 2021). La generación en tiempo récord de vacunas contra el virus ha ayudado a bajar los picos de muertes e infección en la población, confiriendo algunas vacunas un 95% de protección contra la variante Wuhan (Polack *et al.*, 2020); sin embargo, las mutaciones de los virus siguen siendo de preocupación, ya las vacunas actuales se basan en la proteína S del virus original, creando la necesidad de vacunas actualizadas y universales.

1.2.1 Problemas y perspectivas en la vacunación vs. SARS-CoV-2

Las distintas variantes del SARS-CoV-2 han aparecido durante toda la pandemia por las mutaciones encontradas a lo largo de su genoma. Varios estudios se han realizado analizando el genoma del virus, encontrando que la tasa de mutación del virus va de un 10^{-5} a 10^{-3} sustituciones por nucleótido (Abavisani *et al.*,

2022); sin embargo, la proteína S ha sido de las más analizadas por su potencial impacto en el escape inmunológico apoyado principalmente por una mayor afinidad de la proteína S al receptor ACE2, así como otros mecanismos (Hirabara *et al.*, 2022).

Las vacunas se han centrado principalmente en generar anticuerpos contra la proteína S del virus, pero se ha detectado que muchas de las mutaciones importantes de las variantes son encontradas en esa proteína, generando un cambio conformacional de la misma, lo que causa una menor eficacia de las vacunas que tienen la proteína S de la cepa de referencia (Wuhan) (Malik *et al.*, 2022). Un ejemplo son las vacunas ChAdOx1 nCoV-19 y BNT162b2, quienes en vacunación completa homóloga tienen una eficacia contra la variante delta de 82.8% y 95%, respectivamente. Mientras que con las mismas vacunas en contra de la variante Omicron para el caso de ChAdOx1 nCoV-19 casi no se encontró efecto protector durante las 20 a 24 semanas, y para el caso de BNT162b2 el efecto protector fue de un 65.5% en las primeras 4 semanas y cayó hasta un 15.4% en las semanas 15-19 (Andrews *et al.*, 2022).

Las principales vacunas que se han distribuido en el mundo provienen ya sea de virus inactivados, virus atenuados, subunidades de la proteína S o la proteína S entregada por un vector viral (Nagy y Alhatlani, 2021) plataformas que son clásicas y bien estudiadas. Sin embargo, en esta pandemia se han visto surgidas nuevas plataformas que prometen mejorar la protección a un menor costo. Un claro ejemplo son las vacunas de mRNA, las cuales pueden ser adaptadas fácilmente al emerger una nueva variante (Van Riel y de Wit, 2020), mismas que pueden ser cargadas con

epítopos que se presenten fácilmente al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés).

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo general*

Análisis del potencial inhibitorio de péptidos de diseño contra la replicación de Virus Sincicial Respiratorio y el desarrollo de una proteína antigénica multiepítipo contra variantes de SARS-CoV-2.

2.2 *Objetivos específicos:*

2.2.1 Péptidos antivirales

- Modelar *in silico* la conformación de pre-hairpin para la proteína F de VSR.
- Identificar mediante ensayos de acoplamiento molecular las regiones de interacción entre los péptidos PK-2 y HRA versión corta, con las distintas conformaciones de la proteína de fusión de VSR.
- Determinar si existe citotoxicidad de los péptidos antivirales PK-2 y HRA versión corta en la línea celular HEp-2.
- Optimizar una curva estándar para la cuantificación de carga viral de VSR por RT-qPCR.
- Verificar la infección viral de cultivos de HEp-2 con el VSR.

2.2.2 Proteína antigénica

- Diseñar una proteína antigénica con epítomos relevantes de las variantes de SARS-CoV-2 que pueda funcionar como una vacuna universal.

3 RESULTADOS

3.1 Péptidos antivirales vs VSR

3.1.1 Estructura de la proteína F en estado de prehairpin

El modelado por comparación realizado en el servidor Robetta (Fig. 1) de la secuencia de la proteína F de VSR contra la estructura de prehairpin del virus de parainfluenza humana (SV-5) arrojó un modelo que al, ser comparado en ChimeraX con el modelo base, arrojó un puntaje de alineamiento de secuencia de 484.6, así como también un valor de RMSD entre 146 átomos de 1.015 Å. La proteína F de SV5 ya ha sido utilizada anteriormente como modelo base para la proteína F de VSR.

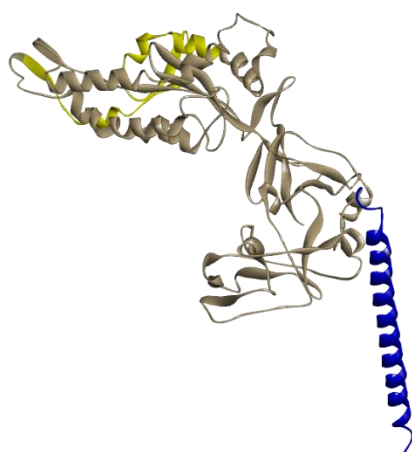


Fig. 1.- Estructura generada en estado de Pre-Hairpin. Método: modelado por homología. En amarillo se muestra la región de HRA, en azul se muestra la región HRB y en café el remanente de la proteína.

3.1.2 Acoplamientos moleculares e interacciones péptido proteína

3.1.2.1 Péptido HRA versión corta

Se obtuvieron 4 modelos de acoplamiento molecular (Fig. 2) para el péptido HRA versión corta.

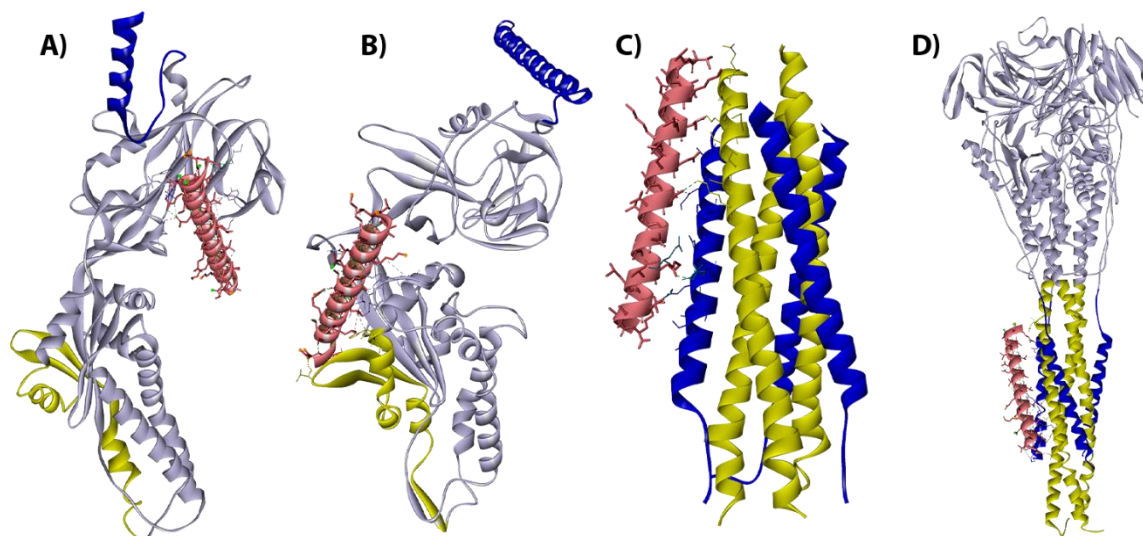


Fig. 2.- Modelos de acoplamiento molecular para F. En amarillo se muestra la región HRA, en azul la región HRB y en rosa el péptido HRA versión corta. A) Modelo de prefusión y HRA versión corta. B) Modelo de acoplamiento para prehairpin con HRA. C) Modelo de acoplamiento para la estructura central y HRA. D) Modelo de acoplamiento para la conformación en postfusión y HRA.

Los valores arrojados por el servidor HDock se muestran en la Tabla 1. Los modelos obtenidos se visualizaron en Discovery Studio y se analizaron los residuos que hacen interacción entre el péptido y la proteína.

Tabla 1.- Valores arrojados por el servidor HDock para HRA. Se muestran los valores de puntaje de acoplamiento y el nivel de confianza.

Métricas HRA	Pre-fusión	Pre hairpin	Central	Post fusión
Puntaje	-217.46	-215.46	-225.77	-367.79
Confianza	0.794	0.7874	0.819	0.987

De la Tabla 1 se puede concluir que los modelos tienen alta posibilidad de unirse, y que el que mejor muestra predisposición a la unión es el modelo de

postfusión. Los valores de puntaje se basan en una función iterativa basada en el conocimiento, a la cual le llaman ITScore-pp, en la cual mientras el valor sea más negativo indica interacciones de unión más fuertes. En cuanto a los valores de confianza, todos presentan valores aceptables por encima del 0.7, lo cual indica que las dos moléculas son muy probables de unirse.

En cuanto a las interacciones obtenidas con el péptido de HRA versión corta y el estado de pre-fusión de la proteína F se obtuvieron un total de 12 interacciones, las cuales se observan en la Tabla 2.

Tabla 2.- Interacciones péptido HRA versión corta- Proteína en prefusión.

HRA-Prefusión									
Puentes de hidrógeno clásicos		Puentes de hidrógeno no clásicos		Puente salino		Unión por carga electrostática		Interacciones hidrofóbicas	
HRA	Proteína F	HRA	Proteína F	HRA	Proteína F	HRA	Proteína F	HRA	Proteína F
Arg 30	Ser 376	Thr 27	Phe110	Arg 23	Glu 329	Arg 23	Glu 329	Val 15	Ile 380
Arg 30	Ser 377							Val 22	Tyr 430
Thr 27	Arg 312								
Arg 23	Arg 312								
Arg 23	Pro 326								
Ser 16	Asn 433								
Asn 12	Lys 434								

Para el estado de prehairpin se encontraron un total de 15 interacciones las cuales se listan en la siguiente tabla:

Tabla 3.- Interacciones péptido HRA- Proteína en prehairpin.

HRA-Prehairpin									
Puentes de hidrógeno clásicos		Puentes de hidrógeno no clásicos		Puente salino		Unión por carga electrostática		Interacciones hidrofóbicas	
HRA	Proteína F	HRA	Proteína F	HRA	Proteína F	HRA	Proteína F	HRA	Proteína F
Thr 11	Leu 86	Thr 11	Gly 87	Glu 13	Lys 104	-	-	Lys 10	Leu 89
Arg 30	Ser 134	Lys 10	Lys 104					Ala 14	Lys 104
Arg 30	Val 133	Ser 16	Tyr 19					Leu 18	His 107
		Gly 21	Thr 29					Leu 18	Leu 108
								Val 24	Tyr 28
								Val 135	Val 29

En cuanto a la conformación central formada por las HRA y HRB de la proteína F se encontraron un total de 6 interacciones con el péptido, los cuales podemos observar en la siguiente tabla:

Tabla 4.- Interacciones péptido HRA- Estructura central de la proteína F.

HRA- Estructura central									
Puentes de hidrógeno clásicos		Puentes de hidrógeno no clásicos		Puente salino		Unión por carga electrostática		Interacciones hidrofóbicas	
HRA	Proteína F	HRA	Proteína F	HRA	Proteína F	HRA	Proteína F	HRA	Proteína F
Ser 16	Lys 176	Arg 30	Ser 493	-	-	Val 1	Glu 161	Val 15	Lys 508
Thr 27	Glu 497					Arg 30	Glu 497		

Y para finalizar, se analizaron las interacciones del péptido con el estado de post fusión, para el cual se encontraron un total de 18 interacciones (Tabla 5).

Tabla 5.- Interacciones péptido HRA- Proteína en postfusión.

HRA-Post fusion									
Puentes de hidrógeno clásicos		Puentes de hidrógeno no clásicos (carbon)		Puente salino		Unión por carga electrostática		Interacciones hidrofóbicas	
HRA	Proteína F	HRA	Proteína F	HRA	Proteína F	HRA	Proteína F	HRA	Proteína F
Lys 5	Gly 514	Lys 5	Asp 510	Arg 30	Asp 486	Lys 5	glu 511	Ile 4	Lys 176
Thr 11	Asn 183	Asn 12	Asn 500	Arg 30	Asp 489	Arg 30	Asp 200	Lys 5	Arg 507
Ser 16	Asn 500	Arg 30	Asp 486			Arg 30	Asp 486	Leu 8	Arg 507
								Leu 8	Ile 506
								Leu 8	Val 179
								Ala 7	Val 179
								Val 22	Leu 193

3.1.2.2 Péptido PK-2

Los modelos de acoplamiento molecular para el péptido PK-2 arrojaron los resultados mostrados en la Tabla 6 en el servidor de HDOCK. Para estos modelos se analizaron las regiones a las cuales se une el péptido en las 4 conformaciones distintas (Fig. 3), después en Discovery Studio se analizaron las interacciones entre péptido y proteína.

Tabla 6.- Valores arrojados por el servidor HDOCK para PK-2. Se muestran los valores de puntaje de acoplamiento y nivel de confianza.

Métricas PK-2	Pre fusion	Pre hairpin	Estructura central	Post fusión
Puntaje	-211.28	-239.7	-235.02	-193.67
Confianza	0.773	0.8574	0.8456	0.6971

Analizando los valores obtenidos por el servidor, se puede observar que todos excepto el modelo de postfusión, cuentan con puntajes de predicción buenos por encima del -200, haciendo una comparación únicamente entre ellos, ya que para tener una mejor visión de acoplamientos moleculares *in silico* y valores experimentales es necesario hacer la comparación con péptidos probados anteriormente contra el virus, datos con los cuales no se cuenta en el momento. Por su parte, en cuanto a la confianza de la unión entre las dos moléculas el modelo de postfusión se encuentra que es posible que se unan. Para los demás modelos, por su nivel de confianza obtenido es muy probable la unión.

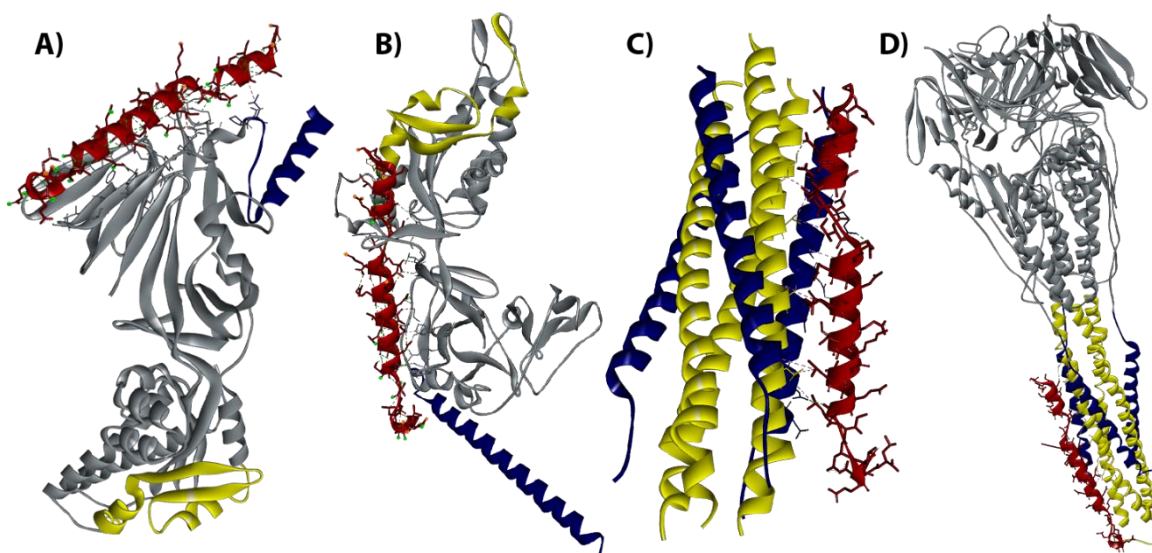


Fig. 3.- Modelos de acoplamiento molecular para las distintas conformaciones de F. En amarillo se muestra la región HRA, en azul la región HRB y en rojo el péptido PK-2. A) Modelo de prefusión y PK-2. B) Modelo de acoplamiento para prehairpin con PK-2. C) Modelo de acoplamiento para la estructura central y PK-2. D) Modelo de acoplamiento para la conformación en postfusión y PK-2.

Se obtuvo una tabla de interacciones separado por el tipo de interacción por cada acoplamiento molecular realizado.

Para las interacciones del péptido PK-2 con la proteína en estado de pre-fusión se obtuvieron un total de 14 interacciones, las que se observan en la siguiente tabla:

Tabla 7.- Interacciones péptido PK-2- Proteína en prefusión.

PK2-Prefusion									
Puentes de hidrógeno clásicos		Puentes de hidrógeno no clásicos		Puente salino		Unión por carga electrostática		Interacciones hidrofóbicas	
PK2	Proteína F	PK2	Proteína F	PK2	Proteína F	PK 2	Proteína F	PK2	Proteína F
Asn 12	Asp 452	Asn 28	Tyr 441	Glu 36	Lys 418	Asp 33	Lys 418	Leu 31	Lys 406
Val 11	Asn 298			Glu 29	Lys 443			Val 11	Lys 300
Glu 16	Thr 297			Glu 10	Lys 300			Ala 8	Leu 454
Asn 21	Glu 445								
Ile 24	Ser 409								
Asn 28	Asp 413								

En cuanto a las interacciones entre el péptido PK-2 y la proteína F en estado de prehairpin se encontraron un total de 22 interacciones, las que se pueden observar en la Tabla 8. Este estado es el que se debe de secuestrar para que se evite la unión de la proteína F con el receptor de la célula diana. Hay más interacciones en este estado que en el precursor inactivado (prefusión).

Tabla 8.- Interacciones péptido PK-2- Proteína en prehairpin.

Pk2-Prehairpin									
Puentes de hidrógeno clásicos		Puentes de hidrógeno no clásicos		Puente salino		Unión por carga electrostática		Interacciones hidrofóbicas	
PK2	Proteína F	PK2	Proteína F	PK2	Proteína F	PK2	Proteína F	PK2	Proteína F
Gly 1	Ser 134	Asn 7	His 107	-	-	Glu 29	Arg 287	Ile 3	His 107
Ser 4	Val 135	Glu 14	Ser 10					Ala 8	Trp 27
Asn 12	Trp 27							Val 11	Lys 104
Asn 12	Leu 20							Ile 13	Tyr 19
Gln 14	Gly 18							Lys 25	Pro 252
Gln 14	Gln 9								
Gln 14	Thr 11								
Glu 10	Lys 104								
Lys 25	Arg 287								
Asn 28	Ser 320								
Asn 28	Tyr 254								
Asn 28	Ser 296								
Glu 29	Asn 293								

Para el estado conformacional de la estructura central y la unión del péptido se contabilizaron un total de 18 interacciones. Estas están especificadas en la siguiente Tabla 9.

Tabla 9.- Interacciones péptido PK-2- estructura central de proteína

Pk2-Estructura central									
Puentes de hidrógeno clásicos		Puentes de hidrógeno no clásicos		Puente salino		Unión por carga electrostática		Interacciones hidrofóbicas	
PK2	Proteína F	PK2	Proteína F	PK2	Proteína F	PK2	Proteína F	PK2	Proteína F
Ser 30	Asp 489	Ser 4	His 14	-	-	Glu 10	Lys 176	Ala 8	His 514
Asn 28	Ser 493	Ile 17	Asn 500					Val 11	Lys 176
Asn 21	Asn 500	Leu 31	Asp 486					Val 11	Val 179
Gln 14	Arg 507							Ile 13	Val 179
Asn 7	Lys 176							Ile 17	Leu 503
								Leu 20	Leu 499
								Leu 27	Ile 492
								Leu 27	Leu 193
								Leu 31	Ala 490

Para terminar con las interacciones para el péptido PK-2 se encontraron un total de 10 interacciones con la proteína F en estado de post fusión, las cuales se pueden observar en la siguiente tabla.

Tabla 10.- Interacciones péptido PK-2- Proteína en postfusión.

Pk2-Post fusion									
Puentes de hidrógeno clásicos		Puentes de hidrógeno no clásicos		Puente salino		Unión por carga electrostática		Interacciones hidrofóbicas	
PK2	Proteína F	PK2	Proteína F	PK2	Proteína F	PK2	Proteína F	PK2	Proteína F
Asn 28	Ser 169	Glu 16	Arg 507	-	-	Glu 16	Arg 507	Val 11	Ile 499
Ser 4	Asn 197							Ile 17	Val 179
								Ile 24	Lys 176
								Ile 24	Leu 172
								Leu 27	Leu 172

3.1.3 Análisis de citotoxicidad

3.1.3.1 Citotoxicidad para péptido HRA versión corta

El ensayo de citotoxicidad realizado en células HEp-2 en placas de 96 pozos mostró que el péptido HRA no es citotóxico en ninguna de las concentraciones utilizadas. Como se puede observar en la Fig. 4, el único punto donde bajó al 90% la viabilidad celular fue en la concentración más alta de 100 μ M.

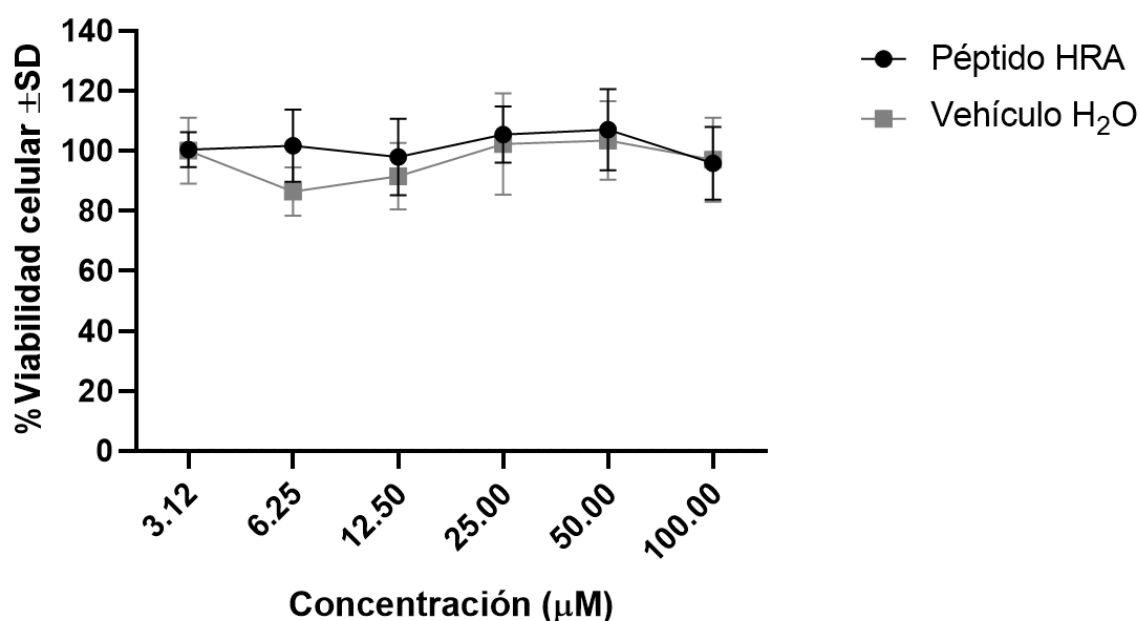


Fig. 4.- Viabilidad celular de HEp-2 a distintas concentraciones del péptido HRA versión corta.

3.1.3.2 Citotoxicidad para PK-2

En el caso de la citotoxicidad del péptido PK-2 se observa la misma tendencia que tiene el péptido de HRA versión corta, en la cual la viabilidad celular únicamente se ve afectada en las concentraciones de 12.50 μ M y la máxima de 100 μ M (Fig. 5).

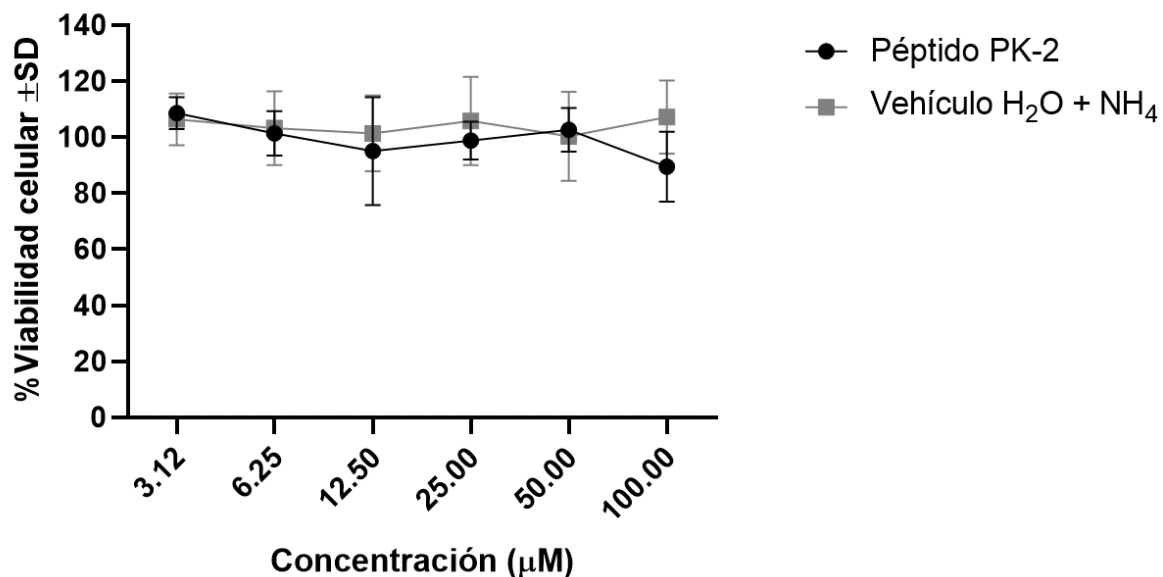


Fig. 5.- Viabilidad celular de HEP-2 a distintas concentraciones del péptido PK-2.

3.1.4 Construcción de una curva estándar para el cálculo de número de copias mediante RT-qPCR.

3.1.4.1 Reproducción de un plásmido con región inter-P-M

Se obtuvieron un total de 10 viales de plásmido purificado los cuales fueron analizados por densidad óptica en el Nanodrop. Se puede observar en la Tabla 11 las características de cada uno de los viales obtenidos.

Tabla 11.- Concentraciones para los plásmidos purificados. Se muestran además los valores de Abs a 260/280 y 260/230 nm.

ID de vial	ng/ μ L	260/280	260/230
1A	1556	1.97	2.16
2A	2135	1.92	1.98
3A	1334	2.01	2.18
4A	1810	1.97	2.06
5A	1768	1.98	2.16
1B	2102	1.97	2.19
2B	1052	1.94	2.11
3B	1327	1.97	2.09
4B	1831	1.96	2.15
5B	1567	1.99	2.17

El análisis por secuenciación confirmó la presencia del inserto que contiene la región intergénica de VSR en el plásmido en la purificación en las 4 muestras mandadas a secuenciar (2A, 5A, 1B y 5B).

3.1.4.2 Detección del amplicón por PCR punto final positivo de plásmido

pUCIDT-MCV

La estandarización de las condiciones para la PCR con los oligonucleótidos de detección fue establecida con el plásmido pUCIDT-MCV como control positivo el cual fue donado por el Dr. Noyola de la UASLP. Una cantidad de 50 ng de plásmido es suficiente para una correcta visualización de la banda en el gel de electroforesis

al 3% (Fig. 6) (TBE 1X), utilizando oligonucleótidos [0.5 μ M] MCV-F y MCV-R, con $MgCl_2$ 2 mM y 1 U de Taq DNA Polimerasa.

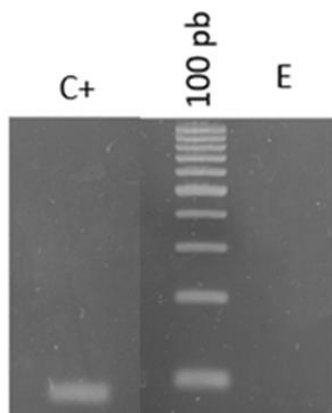


Fig. 6.- Detección del amplicón del gen de la región inter-P-M del VSR. Se observa el amplicón esperado de 89 pb. Gel de agarosa al 3% con el control positivo. C+: Se utilizaron 50 ng del plásmido pUCIDT-MCV como control positivo; 100 pb: marcador de peso molecular; E: control de reactivos (NTC).

3.1.4.3 Curva estándar de plásmido pUCIDT-MCV

Se logró realizar una curva estándar (Fig. 7) a partir de 7 puntos por triplicado de diluciones seriadas 1:10 del plásmido con el fragmento Inter-P-M con una R² de 0.971 y una eficiencia de 91.014%.

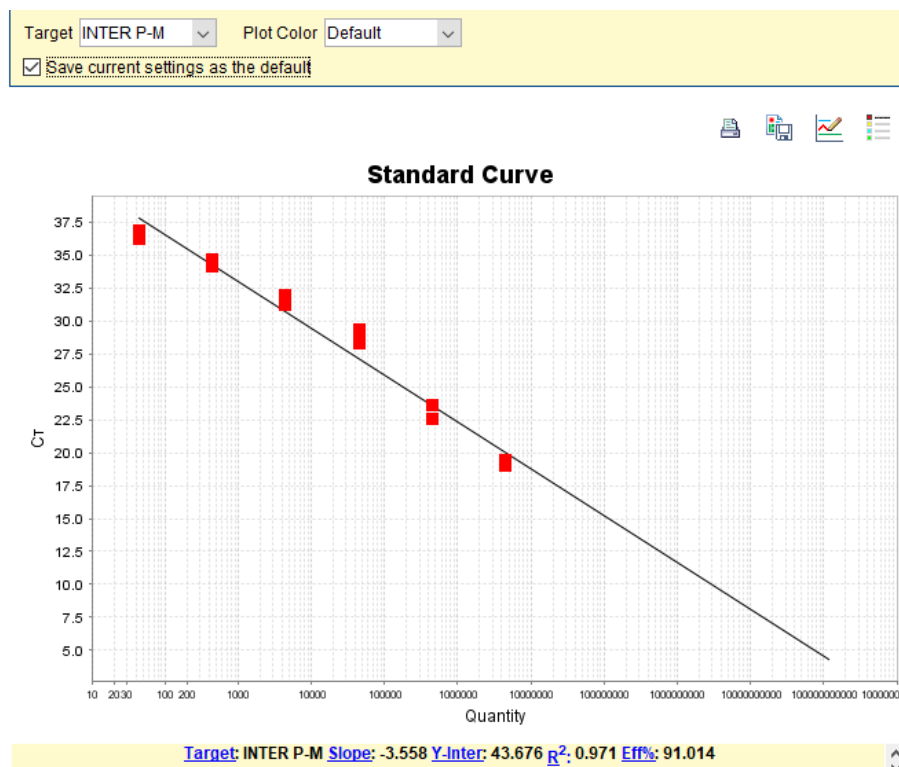


Fig. 7.- Curva estándar de qPCR obtenida a partir de un plásmido con la región inter-P-M del VSR. Se realizaron 7 puntos por triplicado en diluciones 1:10. R² de 0.971 y una eficiencia de 91.014%.

El valor de Ct se obtiene con el número de copias presentes en una muestra y está dado por la ecuación

$$Ct = -3.558 \times \log(\text{copias}) + 43.676.$$

Por otro lado, se puede obtener el número de copias de una muestra al despejarlo de la ecuación e interpolar valores de Cts dentro del rango de la curva estándar, lo cual se logró hacer con una muestra positiva proporcionada por la

UASLP de exudado nasofaríngeo en una reacción de RT-qPCR obteniéndose 5.81×10^5 número de copias (Fig. 8).

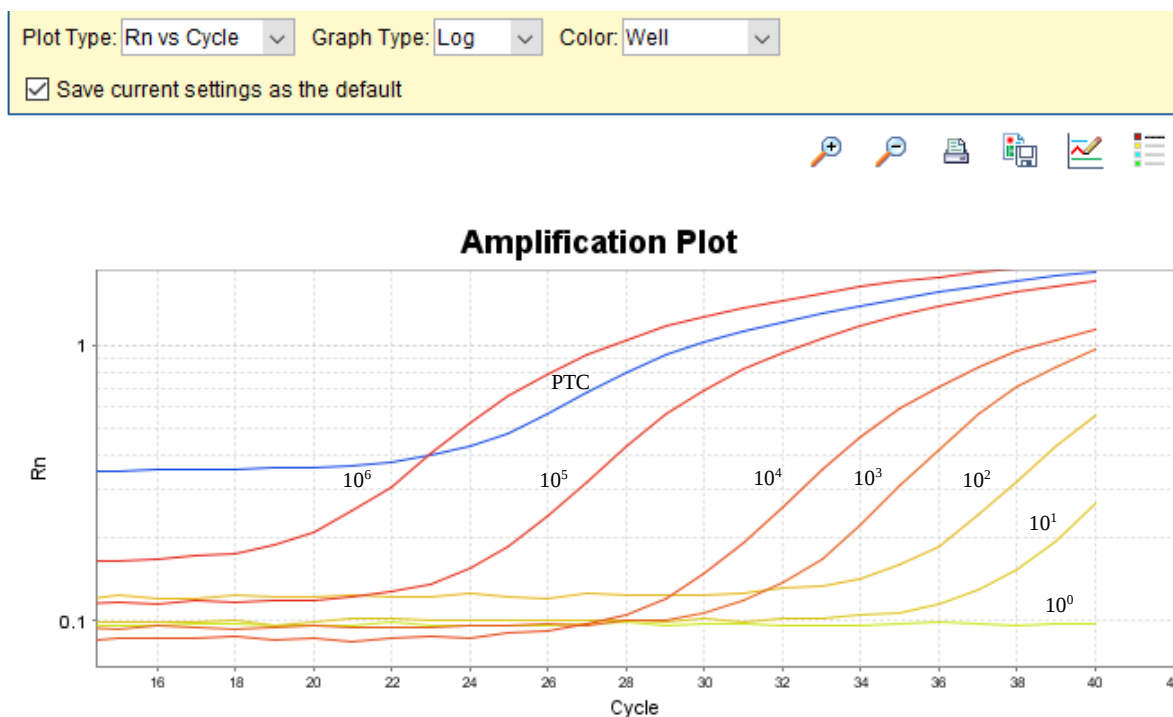


Fig. 8.- Cuantificación de carga viral de exudado nasofaríngeo. Con la curva estándar se logró cuantificar la carga viral de muestras clínicas (curva azul PTC). Rango de detección de 1×10^1 a 1×10^6 copias.

3.1.4.4 Ensayo de infección celular de VSR en células HEp-2

Para lograr detectar la infección de células se decidió utilizar la multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) de 0.1 y de 1. La MOI se refiere a la cantidad de agentes infecciosos entre el número de células, por lo que en el caso de MOI 1 habrá una partícula viral por cada célula, y para la MOI 0.1 habrá una partícula viral por cada 10 células.

Con el ensayo de infección celular se logró observar al microscopio el daño típico creado por VSR en ambas MOI (0.1 y 1) al tiempo de 48h post infección (hpi), como se observa en la Fig. 9.

En los pozos con MOI 1 se pueden observar un mayor número de sincicios formados que en la MOI 0.1 al paso de las 48 h, así como más células con forma redondeada, distinta a la forma típica de las células HEp-2 (forma de huso).

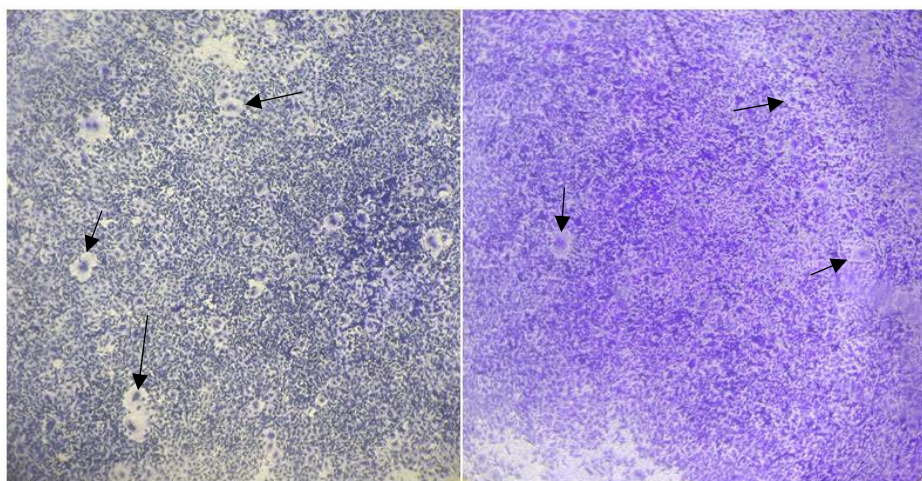


Fig. 9.- Cultivo de células HEp-2 infectadas con VSR. A) Monocapa infectada con MOI 1. B) Monocapa infectada con MOI 0.1. Los sincicios se muestran como agrupaciones de células, ejemplificadas con las flechas negras.

Se continúa trabajando en la estandarización de cuantificación de carga viral de cultivos celulares por medio de RT-qPCR.

3.2 Proteína antigénica

3.2.1 Regiones conservadas y antigénicas para las proteínas de las distintas variantes de SARS-CoV-2

Del análisis bioinformático se obtuvieron en total de 27 regiones conservadas (+ 9 aminoácidos) en la proteína S. Para la proteína N se encontraron 12 regiones altamente conservadas, para la proteína M se encontraron 4 regiones conservadas,

para la proteína E se encontró 1 región conservada. Para la poliproteína ORF1ab se analizó únicamente la región de interés del aminoácido (AA) 1 al 2,380 y se encontraron un total de 14 regiones conservadas. Para RdRp no se pudo hacer el alineamiento de secuencia debido a que no había secuencias reportadas para las distintas variantes.

Las regiones conservadas analizadas en Bepipred 2.0 redujeron el número de regiones candidatas a un total de 15 secuencias (9 AAs conservados y además antigénicos) en la proteína S, 9 regiones para N, 3 para M, 1 para E, mientras que para ORF1ab se redujo a 6 y para RdRp de una sola secuencia se obtuvieron 14 secuencias antigénicas.

Para la selección de los epítopos expuestos de las proteínas S y RdRp, las regiones conservadas y antigénicas se visualizaron en ChimeraX (Fig. 10). Para las otras proteínas no se encontró estructura cristalizada con la cual hacer la visualización, por lo que este criterio no se aplicó a ellas.

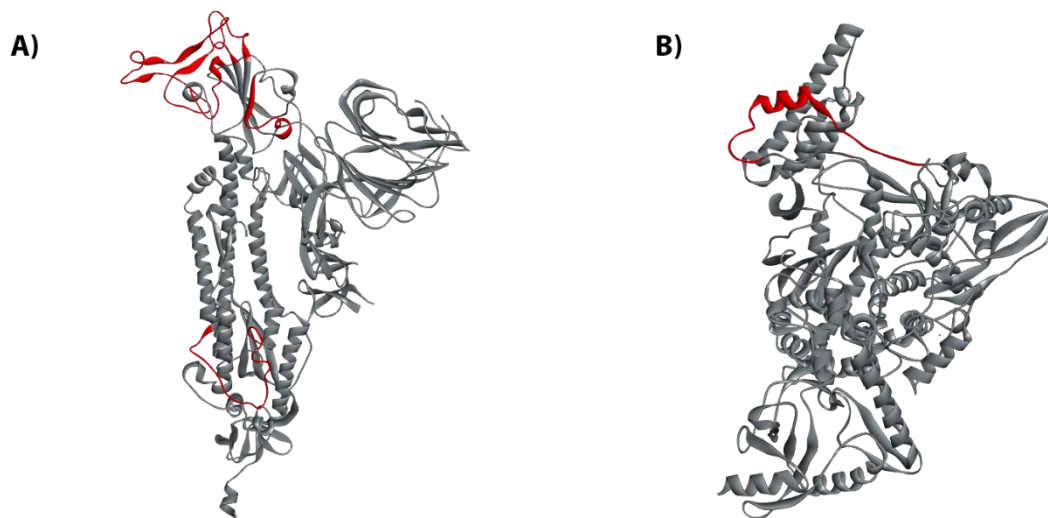


Fig. 10.- Sitios antigénicos conservados de las proteínas S y RdRp visualizados por ChimeraX. A) Proteína S de SARS-CoV-2 con los sitios antigénicos seleccionados en rojo. B) Enzima RdRp. En rojo se muestra el sitio antigénico seleccionado.

Los tamaños de las regiones finalmente seleccionadas se muestran en la Tabla 12. Por cuestiones de una posible patente no se indican de qué AA a qué AA fueron seleccionadas.

Tabla 12.- Tamaño de regiones seleccionadas para la proteína multiepítipo.

Proteína	Tamaño (AA)
S	72
S	33
S	15
S	15
N	31
M	14
E	15
ORF1ab	42
RdRp	31

3.2.2 Diseño de la proteína quimérica y análisis de alergenicidad *in silico*.

La estructura de la proteína quimérica (Fig. 11) contiene un total de 385 aminoácidos, integrados por: 4 epítopos distintos de la proteína S, 1 epítipo de N, 1 epítipo de M, 1 epítipo de E, 1 epítipo de ORF1ab y 1 epítipo de RdRp. Los epítopos seleccionados son conservados entre las 10 variantes analizadas, exceptuando a RdRp del cual solo se analizó una secuencia, y se presentan al MHC I basándonos en los resultados arrojados por el servidor de Bepipred 2.0. Se puede observar en la Figura 11 el diseño de la proteína multiepítipo, así como la unión de los epítopos por espaciadores y la localización del sitio de corte de proteasas (PSP), la etiqueta de histidinas (HIS) y el doble codón de paro (STOP).

Estructura proteína antigénica

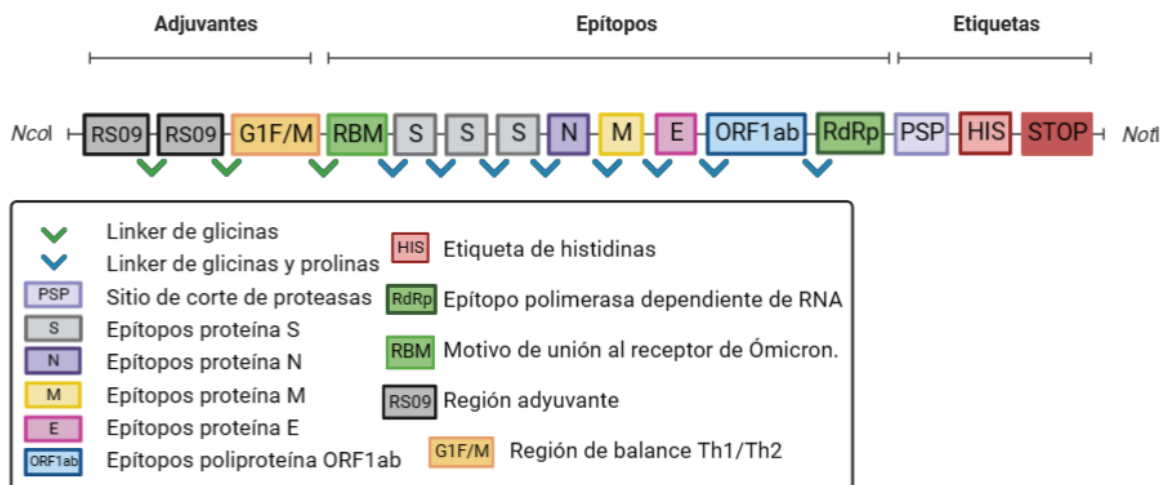


Fig. 11.- Esquema de la conformación de la proteína multiepítipo YANI.

3.2.3 Modelado de la proteína *in silico*.

El modelo generado (Fig. 12) por *threading* muestra la conformación casi lineal de la proteína, con 5 giros de alfa hélices repartidos a lo largo de toda la estructura. Por su parte, la etiqueta de histidinas se encuentra expuesta hacia la superficie, lo que facilitaría la detección y purificación de la proteína recombinante.



Fig. 12.- Modelo por *threading* realizado en ITASSER de la proteína multiepítipo generada. Los valores arrojados para el modelo son de C-Score: 1.14, TM estimado de 0.57 ± 0.15 , RMSD estimado en 9.3 ± 4.6 Å

El análisis de alergenidad *in silico* arrojó resultados negativos en ambos servidores, con un resultado de “probablemente no alergénico” en AllerTOP v2.0, mientras que en AlgPred se arrojó el resultado de “la secuencia de proteína no contiene epítomos para IgE experimentalmente probados” para el análisis por medio de mapeo de epítomos de IgE.

4 DISCUSIÓN

Las infecciones causadas por distintos virus como el VSR y el SARS-CoV-2 han sido responsables de un número considerable de muertes durante los últimos años. El VSR ha tenido, antes de la pandemia de SARS-CoV-2, y sigue teniendo un impacto importante en los infantes y personas adultas con comorbilidades. Por su parte, El SARS-CoV-2 viene de una familia de coronavirus que han causado brotes de epidemias en épocas anteriores (2003 de SARS-CoV-1 y MERS-CoV en 2012), lo cual denota la importancia de continuar en las investigaciones de estos virus para lograr inmunidad ante posibles nuevos coronavirus y el mantener una inmunidad ante coronavirus ya conocidos.

4.1 Péptidos antivirales

Se ha descrito extensivamente el rol de la proteína F a través de las regiones de heptadas HR en la entrada de los virus pertenecientes a la familia Paramixoviridae, motivo por el cual en el equipo de trabajo se decidió trabajar con péptidos que asemejen los HR de la proteína F del hMPV, ya que ésta, a pesar de compartir únicamente el 33% de identidad en su secuencia de aminoácidos, comparte cada una de las características típicas de las proteínas de fusión viral tipo 1, siendo similares estructuralmente (Schowalter *et al.*, 2006).

La estructura trimérica central de la proteína F del SV5 de parainfluenza fue la primera en descubrirse y cristalizarse, además ha servido en distintas ocasiones como la base para modelar la proteína F del VSR (Zhao *et al.*, 2000), por lo que el modelado de la estructura en estado “prehairpin” utilizando como base la estructura metaestable cristalizada del SV5 (Yin *et al.*, 2006) es una buena aproximación a la conformación real de la proteína del VSR.

En los modelos de acoplamiento para la conformación de la estructura central y postfusión contra el péptido HRA versión corta se puede observar una interacción directa del péptido con las regiones de HRA y HRB de la proteína F de VSR (Fig. 2). Para la conformación de prehairpin sí hay interacción de HRA y la proteína F, mientras que para la conformación de prefusión no se observa contacto entre el péptido y las regiones de interés.

En cuanto a los modelos de acoplamiento para el péptido PK-2 se puede observar en la Figura 3 que el péptido tiene contacto con HRA y HRB en las conformaciones de la estructura central, post-fusión y de prehairpin. Para el modelo de prefusión no hay contactos entre el péptido y las regiones de interés; sin embargo, con las tablas de interacciones obtenidas se puede observar una buena unión entre el péptido y las distintas conformaciones de la proteína, haciendo énfasis en las interacciones entre Asp489 de la proteína F reportadas por Khonmeko y colaboradores (Khonmeko *et al.*, 2023). Ha de notarse que, entre las interacciones encontradas, en el modelo de prehairpin y PK-2 fue donde se observaron el mayor número de interacciones positivas, mientras que para HRA el mayor número de interacciones se encontró en el estado de postfusión, seguido por el estado de prehairpin.

Por otro lado, los ensayos de citotoxicidad realizados con los péptidos HRA y PK-2 mostraron resultados prometedores al no afectar la viabilidad de las células HEp-2 en ninguna de sus concentraciones, utilizando la misma metodología con la que se demostró que el péptido extendido HRA2PL no causa citotoxicidad en células HEp-2 (Meza *et al.*, 2023) con la diferencia que en este caso se utilizó MTT como indicador de viabilidad celular. Esto en contraste con otras moléculas

analizadas para inhibir las infecciones de VSR que sí son citotóxicas, en las cuales se ha reportado una baja de hasta el 30% de viabilidad celular en las líneas A549 y HEp-2 (Lai *et al.*, 2008).

La curva estándar obtenida con el plásmido sugiere una buena forma de medir la carga viral, ya comprobado con muestras clínicas de las cuales fue posible medir el nivel de partículas virales presentes dando 5.81×10^5 número de copias.

Se ha demostrado anteriormente que la línea celular HEp-2 es una línea que permite un mayor crecimiento del título viral de VSR en comparación a otras células (Wright *et al.*, 2005) incluso con bajas MOI a un tiempo de 48 hpi (Rajan *et al.*, 2022). Esto permite un buen aislamiento viral como parte del diagnóstico (Ávila y Castellanos, 2015) siendo el cultivo celular de HEp-2 de las primeras pruebas que se realizan para la detección de VSR en muestras de pacientes, esperando primeramente observar el efecto citopático (OPS/OMS, 2003). Los resultados obtenidos en las infecciones con MOI de 0.1 y 1 son comparables a los estudios antes mencionados, ya que los sincitios fueron posibles de observar desde el tiempo de 48 hpi.

4.2 Proteína antigénica

Dentro de las ventajas de las nuevas tecnologías de secuenciación y análisis bioinformático, se encuentra la posibilidad de rastrear sitios que se mantienen conservados entre las distintas variantes del SARS-CoV-2. Esto permitió hacer un análisis de posibles epítomos conservados e inmunogénicos; de los cuales, se seleccionaron un total de 8 epítomos conservados e inmunogénicos, no solo de la proteína S, de la cual se encuentran actualmente muchos estudios para vacunas, sino que también se tomaron en cuenta los sitios conservados de las otras proteínas

estructurales y no estructurales del virus. Esto es importante pues recientemente varios grupos de investigación se están enfocando en considerar otras proteínas para el desarrollo de vacunas. También ya se han reportado anticuerpos neutralizantes creados por epítomos conservados (Zhao *et al.*, 2022).

El problema con las vacunas de subunidades recae en la pobre activación de células linfocitos Th (Punt, 2020), lo que hace necesario el uso de adyuvantes que potencialicen la respuesta inmune, como es el caso del adyuvante agregado en el diseño de la vacuna del presente trabajo (YANI). La región RS09 es un péptido sintético que mimetiza los lipopolisacáridos presentes en bacterias Gram negativas con potencial adyuvante (Shanmugam *et al.*, 2012).

Por otra parte, se ha demostrado la importancia de una correcta activación de las vías Th1 y Th2 en el proceso infeccioso del SARS-CoV-2 para evitar una infección aguda, ya que en casos de un sesgo hacia las vías Th2, se observó hospitalización de pacientes, en contraste con pacientes que no la requirieron donde el perfil demostraba una respuesta robusta de Th1 (Gil-Etayo *et al.*, 2022). Por lo cual se decidió agregar en la formulación de la vacuna el péptido G1F/M que en teoría genera un balance inmunológico Th1/Th2 (Zeng *et al.*, 2006).

Los epítomos seleccionados muestran capacidad inmunogénica por sí mismos *in silico*, por lo que el uso de espaciadores de glicinas y prolinas aportarían en la presentación individual de cada epítomo, evitando así epítomos conformacionales (Livingston *et al.*, 2002; Saadi *et al.*, 2017).

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Péptidos antivirales

5.1.1 Generación de una estructura prehairpin para la proteína F de VSR

Para la estructura en conformación de prehairpin de F0 de VSR se realizó el modelado de la secuencia de la proteína de VSR con base en la estructura en estado de prefusión metaestable de la proteína de fusión del virus de parainfluenza 5 (SV5) (PDB: 2B9B) en el servidor de Robetta (<https://rosetta.bakerlab.org/submit.php>) por medio de la herramienta de modelamiento por comparación. Se decidió utilizar SV5 como base del modelamiento ya que ha sido anteriormente utilizado como base para análisis de la estructura central de la proteína F de VSR (Zhao *et al.*, 2000). Una vez obtenido el modelo en 3D de la proteína de VSR, se comparó en ChimeraX 1.3 con la estructura base por medio de la herramienta Matchmaker utilizando la opción del mejor alineamiento de las cadenas entre la referencia y la estructura a comparar. Esta estructura se utilizó para realizar los posteriores acoplamientos moleculares.

Las estructuras conformacionales restantes de la proteína F0 de VSR se obtuvieron de la base de datos Protein Data Bank. Para la conformación de la estructura previo al encuentro con la célula diana (prefusión) se utilizó el cristal con PDB ID: 5C69, el cual fue obtenido mediante difracción de rayos X con una resolución de 2.3 Å. La conformación de la estructura central de la proteína formado por 3 HRA y 3 HRB se obtuvo del PDB id: 1G2C obtenido por difracción de rayos X con una resolución de 2.3 Å. La proteína en estado de postfusión se utilizó el PDB ID: 3RRR obtenido por difracción de rayos X con una resolución de 2.82 Å.

5.1.2 Acoplamiento molecular

Para el acoplamiento molecular se utilizaron dos péptidos (Fig. 13) con los que se contaba en el grupo de trabajo, de los cuales uno de ellos fue diseñado por la Dra. Karen Reyes y el Dr. Edgar Páez (PK-2) basándose en el tallo de la espícula de SARS-CoV-2 y posteriormente realizando un mejoramiento de afinidad contra la misma proteína S. Este péptido fue mandado a sintetizar. En cuanto al segundo péptido utilizado (HRA versión corta) se basa en el diseño de Márquez Escobar y colaboradores (2015), el cual inicialmente fue expresado en plantas en su versión completa; sin embargo, al momento de mandar a sintetizar el mismo péptido la compañía encargada de hacerlo advirtió que sería muy difícil obtener el péptido completo, por lo que se decidió a únicamente sintetizar la parte funcional y de más similitud con el HRA de hMNV.

Con estos péptidos se hicieron ensayos de acoplamiento molecular con las cuatro conformaciones de la proteína F de VSR (PDB: 1G2C, 5C69, 3RRR y el generado por Robetta) utilizando el servidor HDock (<http://hdock.phys.hust.edu.cn>), cargando por separado los cuatro modelos de la proteína F de VSR y los péptidos HRA y PK-2 con el protocolo preestablecido híbrido de acoplamiento libre y modelamiento basado en las plantillas.

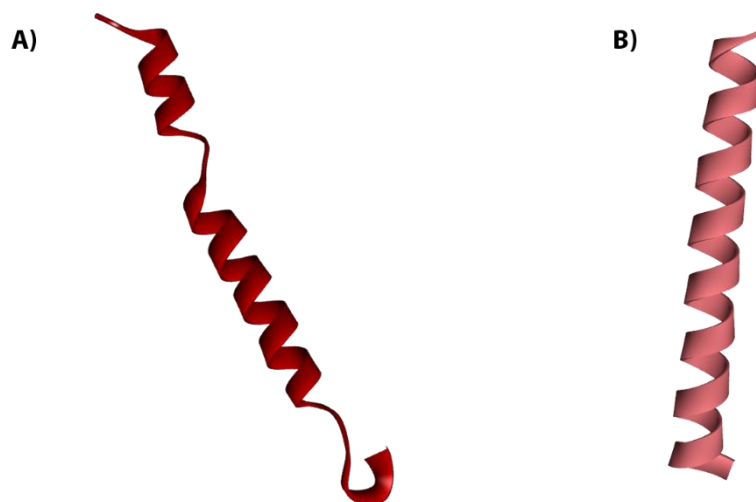


Fig. 13.- Péptidos diseñados en el equipo de trabajo. A) Péptido PK-2. B) Péptido HRA versión corta.

5.1.3 Interacciones péptido-proteína

Posterior a obtener los mejores resultados de los acoplamientos moleculares se descargaron los modelos con mejores resultados en cuanto a Docking Score y se realizó en Discovery Studio el análisis de interacciones por tipo (puentes de hidrógeno clásicos y no clásicos, puentes salinos, unión por carga electrostática e interacciones hidrofóbicas) para cada uno de los acoplamientos moleculares.

5.1.5 Ensayo de citotoxicidad

5.1.5.1 Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas se obtuvieron del cepario del Dr. Noyola y se realizaron pases para acondicionar las células HEP-2 con suero fetal bovino al 5% con penicilina/estreptomicina al 1% en medio DMEM (medio de crecimiento).

Una vez acondicionadas las células se sembraron en una placa de 96 pozos a una concentración de 10,000 células por pozo y se dejaron llegar a confluencia en 72 horas a 37 °C con 5 % de CO₂.

Pasadas las 72 horas, se realizaron las diluciones seriadas 1:2 de los péptidos, así como de los vehículos a utilizar (HRA versión corta y PK-2) para obtener concentraciones de 100 µM a 1.56 µM en medio de crecimiento.

Las diluciones se pasaron a los pozos con células a las cuales previamente se les retiró el medio y se dejaron incubar durante 48 h a 37 °C con 5 % de CO₂.

5.1.5.2 Ensayo colorimétrico del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT (tetrazolio)

Pasado el periodo de incubación se procedió a realizar la determinación de la viabilidad celular utilizando el reactivo MTT. El ensayo de MTT que sirve para medir la actividad metabólica celular de manera colorimétrica. Las enzimas oxidorreductasas celulares dependientes de NAD(P)-H pueden, mediante ciertas condiciones, reflejar el número de células viables presentes. Estas enzimas son capaces de reducir el tinte de tetrazolio MTT a su forma insoluble formazán, que posee un color púrpura. Cuando la célula no es viable no se produce la coloración.

El reactivo de MTT se preparó según las indicaciones a una concentración de 5 mg/mL en PBS y se filtró para eliminar partículas no disueltas. Del stock de MTT (5 mg/mL) se agregaron 10 µL a cada pozo con las células y los péptidos (concentración final 0.5 mg/mL). La placa se tapó y se volvió a la incubadora durante 2 h, pasado el tiempo se agregaron 150 µL de la solución de solubilización (DMSO) a cada pozo y se dejó en movimiento orbital durante 20 min para disolver los

cristales de formazán. Pasados los 20 min se procedió a leer la placa por absorbancia en el equipo Cytation 3 a una longitud de onda de 570 nm.

5.1.5.3 Análisis de datos

De acuerdo con los valores de absorbancia obtenidos se realizó la siguiente operación para obtener la citotoxicidad de los péptidos:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{(100 * (\text{Control} - \text{Muestra}))}{\text{Control}}$$

5.1.6 Inhibición de la replicación

5.1.6.1 Construcción de una curva estándar para cuantificar carga viral por RT-qPCR.

La secuencia de los oligonucleótidos proporcionados por el grupo del Dr. Noyola de la UASLP para realizar la cuantificación de VSR en distintas muestras se observan en la Tabla 13. Se procedió a estandarizar los protocolos de PCR convencional y cuantitativo para la realización de la curva estándar.

Tabla 13.- Oligonucleótidos utilizados en la cuantificación de VSR

Gen/región	Tamaño del amplicón	ID primer	Secuencia de oligonucleótidos
Inter P-M	87 nt	MCV-F	GGCAAATATGGAAACATACGTGAA
		MCV-R	TCTTTTCTAGGACATTGTAYTGAACA

5.1.6.1.1 Propagación de un plásmido con región inter-P-M

Dos viales (A [8.0 ng/ μ L] y B [6.6 ng/ μ L]) de plásmido pUCIDT M.CV (datos sin publicar) que contienen la región inter-P-M usado para la cuantificación del VSR, fueron proporcionado por el Dr. Daniel Noyola de la UASLP y clonados por choque térmico en *E. coli* calcio competentes. Esta región fue seleccionada por el Dr. Juan Carlos Muñoz ya que son específicas de VSR. Las colonias seleccionadas se prepararon para la obtención de plásmidos por lisis alcalina mediante el protocolo de mini-prep de Birnboim 1979 y se dejaron incubar a 37 °C por 18 h. La calidad de plásmido obtenido en la mini-prep fue analizada por medio de un gel de calidad de agarosa al 1%. Posteriormente, se cuantificaron los plásmidos por un espectrofotómetro nanodrop. Estos plásmidos fueron utilizados como control positivo para la PCR con oligonucleótidos de cuantificación (MCV-F, MCV-R) proporcionados por el grupo de la UASLP. Cuatro muestras distintas de plásmido obtenido (2 por cada vial) se mandaron a secuenciar a LANBAMA con oligonucleótidos universales (M13) para confirmar la correcta reproducción del plásmido.

5.1.6.1.2 PCR punto final con oligonucleótidos de cuantificación (MCV-F/MCV-R) para el control positivo de plásmido pUCIDT-MCV

Los oligonucleótidos de cuantificación (MCV-F y MCV-R) proporcionados por la UASLP fueron probados en una PCR punto final (Tabla 14) utilizando como control positivo 50 ng del plásmido pUCIDT-MCV. Como muestra problema se utilizó el cDNA generado del RNA viral de una muestra de exudado nasal de un paciente confirmado de infección con VSR, así como cDNA generado en LANBAMA de un

sobrenadante de cultivo celular infectado con VSR y un cDNA proporcionado por la UASLP.

Tabla 14.- Condiciones para la PCR con oligonucleótidos de cuantificación de VSR.

Región	Tamaño	Oligonucleótidos	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
	amplificación		1 ciclo	40 ciclos			1 ciclo
Inter P-M	87 pb	MCV-F/MCV-R	94°C 3 min	94 °C 30 s	58°C 45 s	72 °C 30 s	72 °C 7 min

La mezcla maestra (25 µL) para la reacción de cuantificación contiene 2.5 µL buffer 10X de Invitrogen, 0.5 µL de mezcla dNTPs [10 mM cada dNTP], 0.5 µL de oligo MCV-F [10 µM], 0.5 µL del oligonucleótido MCV-R [10 µM], 2 µL de MgCl₂ [25 mM], 0.2 µL de Taq polimerasa [5U/ µL] 3 µL de cDNA y 15.8 µL de agua miliQ DEPC. Los productos de amplificación fueron visualizados por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 3% (TBE 1X) con un programa de 110 V durante 1 hora, los cuales se tiñeron durante 4 min en bromuro de etidio (0.01%) y visualizados en el fotodocumentador ChemiDoc imaging system (Biorad).

5.1.6.1.3 Cálculos molares

Después de la extracción del plásmido se procedió a calcular el número de moléculas presentes que es la base de la curva estándar. Primero se calculó por medio de densidad óptica la concentración en nanogramos presentes en un microlitro de plásmido extraído de uno de los viales obtenidos (ID vial 5B) obteniendo un total de 1567 ng/μL.

Posteriormente se calculó el peso molecular (PM) como la suma de los pesos moleculares del plásmido más el inserto por el peso promedio de cada par de bases (650 Da):

$$PM = (500 \text{ pb inserto} + 2752 \text{ pb plásmido}) * 650 \text{ Da} = 3252 \text{ pm} * 650 \text{ Da}$$

$$PM = 2,113,800 \text{ g/mol.}$$

Después se utilizó el número de Avogadro para relacionar el número de moléculas en 1 mol:

$$1 \text{ mol de plásmido} = 6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas(copias)} = PM / \text{No. Avogadro} = \text{gr/copias}$$

$$2,113,800 / 6.023 \times 10^{23} = 3.51 \times 10^{-18} \text{ g/copias.}$$

Haciendo regla de 3 se tiene que si por cada 3.51×10^{-18} g se tiene 1 copia, en un gramo se tienen un total de 2.85×10^{17} copias.

Si en un gramo (10×10^9 ng) se tienen 2.85×10^{17} copias y en 1 μL del plásmido hay 1.567×10^{-6} ng del vial 5B, por cada μL del vial se tiene un total de 4.46×10^{11} copias.

5.1.6.1.4 Curva estándar

Se realizaron diluciones seriadas del vial 5B para obtener una curva estándar que amplificara desde 4.46×10^0 copias hasta 4.46×10^6 copias (curva estándar de 7 puntos). Esto genera una recta que logra correlacionar el valor del Ct obtenido con el número de copias presentes en una muestra dada.

5.1.6.2 Ensayo de infección a línea celular HEp-2

Se prepararon las células a infectar sembrando 10,000 células por pozo (4 pozos en total) en una placa de 96 pozos con 100 μ L de medio de crecimiento y se dejaron llegar a confluencia de 40,000 células incubando durante 72 h a 37 °C 5% de CO₂. Una vez llegadas a confluencia se les retiró el medio y se lavó dos veces la monocapa con 150 μ L de PBS.

Se obtuvieron suspensiones virales de la cepa de VSR A circulante en el estado de San Luis Potosí, las cuales se prepararon a una MOI de 0.1 y 1. Una vez retirado el PBS de la monocapa se agregaron 100 μ L de la suspensión viral y se dejaron incubando durante 2 h a 37°C y 5% de CO₂, sacando la placa para agitar suavemente cada 15 min durante el tiempo de infección. Pasado las 2 h de infección se procedió a eliminar la suspensión viral de la monocapa y lavar 2 veces con 150 μ L de PBS la monocapa. Se agregaron 100 μ L de medio de infección (DMEM + 1% SFB + penicilina/estreptomicina al 1%) y se dejó la placa incubando durante 48 h a 37°C y 5% CO₂.

5.1.6.2.1 Tinción de la monocapa

Pasado el tiempo de infección a cada pozo se procedió a inactivar el virus. A cada pozo se les agregó 100 μ L de formaldehído (FA) al 10% y se dejó incubar a

4°C durante toda la noche. Pasado el tiempo de inactivación del virus se eliminó el FA y se lava la monocapa con PBS, luego se agregan 100 µL de FA y se dejó incubando a temperatura ambiente (TA) durante 30 min, para luego descartarlo y adicionar 200 µL de cristal violeta. Se dejó incubar el cristal violeta durante 15 min a TA y pasado el tiempo se realizaron lavados con agua corriente hasta que el agua saliera transparente. Se retiró el exceso de agua y se dejó secar 12 h para posteriormente tomar fotografías al microscopio y observar los sincicios en un microscopio invertido marca Leica.

5.2 Diseño de una proteína antigénica

5.2.1 Análisis de regiones conservadas y antigénicas para las proteínas de las distintas variantes de SARS-CoV-2

Para el análisis de regiones conservadas se tomaron en cuenta las proteínas virales: Espícula (S), Membrana (M), Envoltura (E), Nucleocápside (N), ORF1ab y RdRP de las variantes de preocupación (VOC) y Variantes de Interés (VOI) circulantes hasta junio 2022 del virus SARS-CoV-2 (Pango linaje: Wuhan, B.1.351, B.1.1.7, P1, B.1.617.2, BA.1.1, P2, C.37, B.1.429). Se descargaron del repositorio de NCBI virus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi>) las secuencias completas de aminoácidos reportadas para cada una, en total fueron analizadas 10 secuencias de cada proteína. Después, las secuencias se analizaron con el programa MEGA 11 (<http://www.megasoftware.net/>) con el algoritmo ClustalW.

A las secuencias conservadas relevantes de cada proteína se les realizó un análisis de antigenicidad a partir del servidor de Bepipred 2.0 ([BepiPred - 2.0 - Services - DTU Health Tech](#)). Las secuencias conservadas y antigénicas de la proteína S y RdRp se visualizaron en el programa ChimeraX 1.3

(<https://www.cgl.ucsf.edu/chimerax/>) para seleccionar las secuencias que se encontraran más expuestas en la superficie de las proteínas.

5.2.1.2 Diseño de la proteína quimérica y análisis de alergenicidad *in silico*.

Las secuencias que cumplieran con las características de mantenerse conservadas entre las variantes, ser epítomos antigénicos y encontrarse en regiones expuestas de las proteínas, fueron seleccionadas para la construcción de la proteína antigénica.

Posteriormente, los epítomos seleccionados fueron unidos entre sí por medio de espaciadores, además de agregar un adyuvante potenciador y un adyuvante de balance R09 para mejorar la respuesta inmune a la proteína quimérica (Shanmugam *et al.*, 2012), así como también se agregó un sitio de corte de proteasas procedido de una cola de histidinas al extremo carboxilo de la proteína para su purificación. Al inicio de la construcción se agregó el sitio de restricción *NcoI* y al final de la construcción se agregaron dos codones de paro y después el sitio de restricción *NotI*.

La construcción final fue analizada en el servidor AllerTOP 2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/index.html>) y en el sitio de Algpred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/algpred/index.html>) para detectar epítomos alergénicos y evitarlos.

5.2.1.3 Modelado de la proteína en 3D *in silico*

La construcción total de 385 AA se modeló en el servidor de I-tasser (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) en la herramienta de predicción de estructura,

obteniendo la estructura secundaria y terciaria. El archivo fue descargado y visualizado en Discovery Studio.

6 CONCLUSIONES

- 1.- Se puede realizar un modelado de la estructura en prehairpin basándose en la proteína F de SV5 para la realización de acoplamientos moleculares.
- 2.- Los péptidos HRA versión corta y PK-2 muestran interacciones *in silico* con las distintas conformaciones que toma la proteína F.
- 3.- Los péptidos HRA y PK-2 no son citotóxicos a la línea celular HEp-2 en ninguna de las concentraciones evaluadas.
- 4.- Es posible cuantificar la carga viral en muestras clínicas a partir de la curva estándar generada con el vector pUCIDT-MCV que contiene regiones del VSR.
- 5.- Las células HEp-2 se pueden infectar con VSR y es posible detectar los sincitios mediante microscopio invertido a las 48 h con MOI 1 y 0.1.
- 6.- Hay regiones conservadas entre las distintas variantes del virus que podrían servir como blanco para la realización de una vacuna universal.
- 7.- Dentro de las regiones conservadas para las distintas variantes del SARS-CoV-2 se encuentran regiones que son antigénicas.
- 8.- La construcción realizada para la proteína multiepítipo contiene regiones que putativamente generan epítomos lineales con un balance antigénico Th1/Th2 y no cuentan con regiones alergénicas.

7 PERSPECTIVAS

- 1.- Estandarizar la cuantificación de carga viral a partir de cultivos celulares de la línea HEp-2 por medio de RT-qPCR.
- 2.- Evaluar la capacidad inhibitoria de los péptidos HRA versión corta y PK-2 en la línea celular HEp-2.
- 3.- Determinar la capacidad inhibitoria al 50% de los péptidos, así como el índice de selectividad de los péptidos.
- 4.- Expresar y purificar la proteína recombinante YANI en *E. coli*.
- 5.- Realizar ensayos de inmunización en ratones BALB/c para la detección de inmunoglobulinas.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Abavisani, M., Rahimian, K., Mahdavi, B., Tokhanbigli, S., Mollapour Siasakht, M., Farhadi, A., Kodori, M., Mahmanzar, M., y Meshkat, Z. (2022). Mutations in SARS-CoV-2 structural proteins: a global analysis. *Virology Journal*, 19:220. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01951-7>
- Andrews, N., Stowe, J., Kirsebom, F., Toffa, S., Rickeard, T., Gallagher, E., Gower, C., Kall, M., Groves, N., O'Connell, A.-M., Simons, D., Blomquist, P. B., Zaidi, A., Nash, S., Iwani Binti Abdul Aziz, N., Thelwall, S., Dabrera, G., Myers, R., Amirthalingam, G., ... Lopez Bernal, J. (2022). Covid-19 vaccine effectiveness against the Omicron (B.1.1.529) variant. *New England Journal of Medicine*, 386(16), 1532–1546. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2119451>
- Ávila Adarme, L. V., y Castellanos, J. E. (2015). Diagnóstico virológico de la infección por virus sincicial respiratorio. *Revista Salud Bosque*, 3 (1), 23. <https://doi.org/10.18270/rsb.v3i1.48>
- Battles, M.B., y McLellan, J.S. (2019) Respiratory syncytial virus entry and how to block it. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 233–245. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0149-x>
- Bermingham, I. M., Chappell, K. J., Watterson, D., y Young, P. R. (2018). The heptad repeat C domain of the Respiratory Syncytial Virus Fusion protein plays a key role in membrane fusion. *Journal of Virology*, 92(4). <https://doi.org/10.1128/jvi.01323-17>
- Birnboim, HC, Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 7(6), 1513-23. doi: 10.1093/nar/7.6.1513.
- Bowser, D. M., Rowlands, K. R., Hariharan, D., Gervasio, R. M., Buckley, L., Halasa-Rappel, Y., Glaser, E. L., Nelson, C. B., y Shepard, D. S. (2022). Cost of Respiratory Syncytial Virus infections in US infants: systematic literature review and analysis. *The Journal of Infectious Diseases*, 226 (2), S225–S235. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac172>
- CDC (2021A) Scientific brief: SARS-CoV-2 transmission. Obtenido de <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/sars-cov-2-transmission.html>

- CDC (2021 B) How covid spreads. Obtenido de: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/how-covid-spreads.html>
- Chanock, R., Roizman, B., y Myers R. (1957). Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties, and characterization. *American Journal of Epidemiology*, 66(3), 281-290.
- Chuang, Y.-C., Lin, K.-P., Wang, L.-A., Yeh, T.-K., y Liu, P.-Y. (2023). The impact of the COVID-19 pandemic on Respiratory Syncytial Virus infection: a narrative review. *Infection and Drug Resistance*, 16, 661–675. <https://doi.org/10.2147/idr.s396434>
- Collins, P.L., Fearn, R., y Graham, B.S. (2013). Respiratory Syncytial Virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 372, 3-38. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1_1
- Collins PL., y Graham, BS. (2008) Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *Journal of Virology* 82(5), 2040-55. doi: 10.1128/JVI.01625-07.
- Contreras, E. M., Monreal, I. A., Ruvalcaba, M., Ortega, V., y Aguilar, H. C. (2021). Antivirals targeting paramyxovirus membrane fusion. *Current Opinion in Virology*, 51, 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.09.003>.
- Falsey, A. R., Walsh, E. E., Scott, D. A., Gurtman, A., Zareba, A., Jansen, K. U., Gruber, W. C., Dormitzer, P. R., Swanson, K. A., Jiang, Q., Gomme, E., Cooper, D., y Schmoele-Thoma, B. (2021). Phase 1/2 randomized study of the immunogenicity, safety, and tolerability of a respiratory syncytial virus prefusion F vaccine in adults with concomitant inactivated influenza vaccine. *The Journal of Infectious Diseases*. 225(12), 2056–2066. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab611>
- FDA (2023) FDA Approves First Respiratory Syncytial Virus (RSV) Vaccine. Obtenido de <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-respiratory-syncytial-virus-rsv-vaccine>
- Gil-Etayo, F. J., Garcinuño, S., Utrero-Rico, A., Cabrera-Marante, O., Arroyo-Sanchez, D., Mancebo, E., Pleguezuelo, D. E., Rodríguez-Frías, E., Allende, L. M., Morales-Pérez, P., Castro-Panete, M. J., Lalueza, A., Lumbreras, C., Paz-Artal, E., y Serrano, A. (2022). An early Th1 response is a key factor for a favorable COVID-19 evolution. *Biomedicine*, 10(2), 296. <https://doi.org/10.3390/biomedicine10020296>
- Hall, C.B., Weinberg, G.A., Iwane, M.K., Blumkin, A.K., Edwards, K.M., Staat, M.A., Auinger, P., Griffin, M.R., Poehling, K.A., Erdman, D., Grijalva, C.G., Zhu Y., y

- Szilagyi P. (2009) The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *New England Journal of Medicine*, 360(6), 588-98. doi: 10.1056/NEJMoa0804877.
- Hamid, S., Winn, A., Parikh, R., Jones, J. M., McMorrow, M., Prill, M. M., Silk, B. J., Scobie, H. M., y Hall, A. J. (2023). Seasonality of Respiratory Syncytial Virus — United States, 2017–2023. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. 72, (14), 355–361. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7214a1>
 - Hirabara, S. M., Serdan, T. D. A., Gorjao, R., Masi, L. N., Pithon-Curi, T. C., Covas, D. T., Curi, R., y Durigon, E. L. (2022). SARS-COV-2 variants: differences and potential of immune evasion. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 11, 781429. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.781429>.
 - Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N.-H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., y Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 cell entry depends on ace2 and tmprss2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. 181(2), 271-280. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
 - Khomenko, T. M., Shtro, A. A., Galochkina, A. V., Nikolaeva, Y. V., Garshinina, A. V., Borisevich, S. S., Korchagina, D. V., Volcho, K. P., y Salakhutdinov, N. F. (2023). New inhibitors of Respiratory Syncytial Virus (RSV) replication based on monoterpene-substituted arylcoumarins. *Molecules*. 28(6), 2673. <https://doi.org/10.3390/molecules28062673>
 - Lai, S.-H., Stein, D. A., Guerrero-Plata, A., Liao, S.-L., Ivanciuc, T., Hong, C., Iversen, P. L., Casola, A., y Garofalo, R. P. (2008). Inhibition of Respiratory Syncytial Virus infections with morpholino oligomers in cell cultures and in mice. *Molecular Therapy*. 16(6), 1120–1128. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.81>
 - Li, Y., Wang, X., Blau, D. M., Caballero, M. T., Feikin, D. R., Gill, C. J., Madhi, S. A., Omer, S. B., Simões, E. A. F., Campbell, H., Pariente, A. B., Bardach, D., Bassat, Q., Casalegno, J.-S., Chakhunashvili, G., Crawford, N., Danilenko, D., Do, L. A. H., Echavarria, M., ... Walker, G. (2022). Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 399(10340), 047–2064. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(22\)00478-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)00478-0)

- Livingston, B., Crimi, C., Newman, M., Higashimoto, Y., Appella, E., Sidney, J., y Sette, A. (2002). A rational strategy to design multiepitope immunogens based on multiple th lymphocyte epitopes. *The Journal of Immunology*. 168(11), 5499-5506. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.11.5499>
- Magro, M., Mas, V., Chappell, K., Vázquez, M., Cano, O., Luque, D., Terrón, M. C., Melero, J. A., y Palomo, C. (2012). Neutralizing antibodies against the preactive form of respiratory syncytial virus fusion protein offer unique possibilities for clinical intervention. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(8), 3089–3094. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115941109>
- Malik, J. A., Ahmed, S., Mir, A., Shinde, M., Bender, O., Alshammari, F., Ansari, M., y Anwar, S. (2022). The SARS-CoV-2 mutations versus vaccine effectiveness: new opportunities to new challenges. *Journal of Infection and Public Health*. 15(2), 228–240. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.12.014>
- Márquez-Escobar, V. A., Tirado-Mendoza, R., Noyola, D. E., Gutiérrez-Ortega, A., y Alpuche-Solís, Á. G. (2015). HRA2pl peptide: a fusion inhibitor for human metapneumovirus produced in tobacco plants by transient transformation. *Planta*. 242(1), 69–76. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2277-5>
- McLellan, J. S., Ray, W. C. y Peeples, M. E. (2013). Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 83-104. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1_4
- McLellan, J. S., Chen, M., Leung, S., Graepel, K. W., Du, X., Yang, Y., Zhou, T., Baxa, U., Yasuda, E., Beaumont, T., Kumar, A., Modjarrad, K., Zheng, Z., Zhao, M., Xia, N., Kwong, P. D., y Graham, B. S. (2013). Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. *Science*. 340(6136) 1113–1117). <https://doi.org/10.1126/science.1234914>
- Mejias, A., Rodriguez-Fernandez, R., Peeples, M.E., y Ramilo, O. (2019) Respiratory Syncytial Virus vaccines: are we making Progress? *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 38(10), e266-e269. doi: 10.1097/INF.0000000000002404.
- Meza, U. C., Lara, N. P., Gómez, L. C., Rodríguez, M. S., Hernández, J. R. A., y Mendoza, R. T. (2023). The HRA2pl fusion peptide exerts in vitro antiviral activity against human respiratory paramyxoviruses and pneumoviruses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1125135>

- Nagy, A., y Alhatlani, B. (2021). An overview of current COVID-19 vaccine platforms. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 19:2508–2517. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.04.061>
- Ngwuta, J. O., Chen, M., Modjarrad, K., Joyce, M. G., Kanekiyo, M., Kumar, A., Yassine, H. M., Moin, S. M., Killikelly, A. M., Chuang, G.-Y., Druz, A., Georgiev, I. S., Rundlet, E. J., Sastry, M., Stewart-Jones, G. B. E., Yang, Y., Zhang, B., Nason, M. C., Capella, C., ... Graham, B. S. (2015). Prefusion F–specific antibodies determine the magnitude of RSV neutralizing activity in human sera. *Science Translational Medicine*. 7(309). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac4241>
- Obando-Pacheco, P., Justicia-Grande, A. J., Rivero-Calle, I., Rodríguez-Tenreiro, C., Sly, P., Ramilo, O., Mejías, A., Baraldi, E., Papadopoulos, N. G., Nair, H., Nunes, M. C., Kragten-Tabatabaie, L., Heikkinen, T., Greenough, A., Stein, R. T., Manzoni, P., Bont, L., y Martín-Torres, F. (2018). Respiratory Syncytial Virus seasonality: a global overview. *The Journal of Infectious Diseases*. 217(9), 1356–1364. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy056>
- Olsen, S. J., Winn, A. K., Budd, A. P., Prill, M. M., Steel, J., Midgley, C. M., Kniss, K., Burns, E., Rowe, T., Foust, A., Jasso, G., Merced-Morales, A., Davis, C. T., Jang, Y., Jones, J., Daly, P., Gubareva, L., Barnes, J., Kondor, R., . . . Silk, B. J. (2021). Changes in influenza and other respiratory virus activity during the COVID-19 pandemic — United States, 2020–2021. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 70(29), 1013-1019. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7029a1>
- OPS/OMS. (2003). Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de las infecciones respiratorias agudas de etiología viral. *Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”*. Recuperado de <https://www.paho.org/es/documentos/manual-procedimientos-para-diagnostico-laboratorio-infecciones-respiratorias-agudas-0>
- Polack, F. P., Thomas, S. J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Perez, J. L., Pérez Marc, G., Moreira, E. D., Zerbini, C., Bailey, R., Swanson, K. A., Roychoudhury, S., Koury, K., Li, P., Kalina, W. V., Cooper, D., Frenck, R. W., Jr., Hammitt, L. L., ... Gruber, W. C. (2020). Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *New England Journal of Medicine*. 383(27), 2603–2615. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2034577>
- Punt, J. (2020). Kuby Inmunología. (8 th ed.). McGraw-Hill.

- Rajan, A., Piedra, F.-A., Aideyan, L., McBride, T., Robertson, M., Johnson, H. L., Aloisio, G. M., Henke, D., Coarfa, C., Stossi, F., Menon, V. K., Doddapaneni, H., Muzny, D. M., Javornik Cregeen, S. J., Hoffman, K. L., Petrosino, J., Gibbs, R. A., Avadhanula, V., y Piedra, P. A. (2022). Multiple Respiratory Syncytial Virus (RSV) strains infecting HEP-2 and A549 cells reveal cell line-dependent differences in resistance to RSV infection. *Journal of Virology*. 96(7). <https://doi.org/10.1128/jvi.01904-21>
- Saadi, M., Karkhah, A. y Nouri, H. R. (2017). Development of a multi-epitope peptide vaccine inducing robust T cell responses against brucellosis using immunoinformatics based approaches. *Infection, Genetics and Evolution*. 51, 227-234. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.04.009>
- Schmoele-Thoma, B., Zareba, A. M., Jiang, Q., Maddur, M. S., Danaf, R., Mann, A., Eze, K., Fok-Seang, J., Kabir, G., Catchpole, A., Scott, D. A., Gurtman, A. C., Jansen, K. U., Gruber, W. C., Dormitzer, P. R., y Swanson, K. A. (2022). Vaccine efficacy in adults in a Respiratory Syncytial Virus challenge study. *New England Journal of Medicine*. 386(25), 2377–2386. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2116154>
- Schowalter, R. M., Smith, S. E., y Dutch, R. E. (2006). Characterization of human metapneumovirus F protein-promoted membrane fusion: critical roles for proteolytic processing and low pH. *Journal of Virology*. 80(22), 10931–10941. <https://doi.org/10.1128/jvi.01287-06>
- Shanmugam, A., Rajoria, S., George, A. L., Mittelman, A., Suriano, R. y Tiwari, R. K. (2012). Synthetic Toll Like Receptor-4 (TLR-4) agonist peptides as a novel class of adjuvants. *PLoS ONE*, 7(2), e30839. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030839>
- Shi, T., Balsells, E., Wastnedge, E., Singleton, R., Rasmussen, Z.A., Zar, H.J., Rath, B.A., Madhi, S.A., Campbell, S., Vaccari, L.C., Bulkow, L.R., Thomas, E.D., Barnett, W., Hoppe, C., Campbell, H., y Nair H. (2015). Risk factors for respiratory syncytial virus associated with acute lower respiratory infection in children under five years: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Global Health*. 5(2), 020416. doi: 10.7189/jogh.05.020416. PMID: 26682048; PMCID: PMC4676580.
- Staadegaard, L., Caini, S., Wangchuk, S., Thapa, B., de Almeida, W. A. F., de Carvalho, F. C., Njoum, R., Fasce, R. A., Bustos, P., Kyncl, J., Novakova, L., Caicedo, A. B., de Mora Coloma, D. J., Meijer, A., Hooiveld, M., Huang, S., Wood, T., Guiomar, R., Rodrigues, A. P., ... Paget, J. (2021). The global epidemiology of RSV in community

- and hospitalized care: findings from 15 countries. *Open Forum Infectious Diseases*. 8(7). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab159>
- Van Riel, D., y de Wit, E. (2020). Next-generation vaccine platforms for COVID-19. *Nature Materials*. 19(8), 810–812. <https://doi.org/10.1038/s41563-020-0746-0>
 - WHO (2023) WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard obtenido de <https://covid19.who.int>
 - Wright, P. F., Ikizler, M. R., Gonzales, R. A., Carroll, K. N., Johnson, J. E., y Werkhaven, J. A. (2005). Growth of Respiratory Syncytial Virus in primary epithelial cells from the human respiratory tract. *Journal of Virology*. 79(13), 8651–8654. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.13.8651-8654.2005>
 - Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.-M., Wang, W., Song, Z.-G., Hu, Y., Tao, Z.-W., Tian, J.-H., Pei, Y.-Y., Yuan, M.-L., Zhang, Y.-L., Dai, F.-H., Liu, Y., Wang, Q.-M., Zheng, J.-J., Xu, L., Holmes, E. C., y Zhang, Y.-Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 579(7798), 265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
 - Yin, H.-S., Wen, X., Paterson, R. G., Lamb, R. A., y Jardetzky, T. S. (2006). Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. *Nature*. 439(7072), 38–44. <https://doi.org/10.1038/nature04322>
 - Zeng, R. H., Gong, W., Fan, C. F., Wang, Y. F. y Mei, X. G. (2006). Induction of balanced immunity in BALB/c mice by vaccination with a recombinant fusion protein containing a respiratory syncytial virus G protein fragment and a CTL epitope. *Vaccine*, 24(7), 941-947. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.064>
 - Zhang, J., Xiao, T., Cai, Y., y Chen, B. (2021). Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Current Opinion in Virology*, 50, 173-182. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.08.010>
 - Zhao, F., Zai, X., Zhang, Z., Xu, J., y Chen, W. (2022). Challenges and developments in universal vaccine design against SARS-CoV-2 variants. *Vaccines*. 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00597-4>
 - Zhao, X., Singh, M., Malashkevich, V. N. y Kim, P. S. (2000). Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26), 14172-14177. <https://doi.org/10.1073/pnas.260499197>

9 ANEXOS

A) Reactivos

Reactivo	Proveedor
Acetato de sodio	CTR Scientific.
Ácido acético	Golden bell.
Agar grado bacteriológico	BD Dixon.
Bromuro de etidio	Promega.
Cloroformo	Industrial Kem de León S.A. de C.V.
Cloruro de calcio	Riedel de Haen.
Cloruro de potasio	Karal Reactivos Analíticos.
Cloruro de sodio	J.T. Baker.
Desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Promega.
Dulbeco's Modification of Eagle's Medium (DMEM)	Corning.
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	USB.

EDTA	Phyto Technology Lab.
Etanol 96%	Industrial Kem de León S.A. de C.V.
Extracto de levadura	Fluka.
Fenol	Invitrogen.
Glicerol	USB.
Glicina	Riedel de Haen.
Hidróxido de sodio	Industrial Kem de León S.A. de C.V.
Hipoclorito de sodio	Cloralex.
Isopropanol	Industrial Kem de León S.A. de C.V.
Marcador de ADN de 1 kb	Invitrogen.
Marcador de ADN de 100 pb	Invitrogen.
Oligonucleótidos	Invitroen.
Triptona	Phytotechnology Laboratories,
Tryple express	gibco

B) Equipo

- Autoclave eléctrica Sterilmatic modelo STM-E tipo C
- Balanza analítica eléctrica Scientech modelo SA210D
- Balanza granataria Ohaus modelo 1400
- Baño María digital Fisher Scientific modelo Isotemp 1025
- Cámara de electroforesis horizontal BIO-RAD modelo minisub-cell GT
- Campana de extracción de humos Fischer Alder modelo CS línea 2000
- Campana de flujo laminar Lumistell modelo L-120
- Centrifuga Sorvall modelo RC 5C Plus
- Fuente de poder Termo EC modelo EC105
- Horno de microondas LG modelo MS-217XQE
- Microcentrífuga Eppendorf modelo mini Spin
- Micropipetas Gilson
- Potenciómetro Orion 3 Star Termo Electro Corporation
- Termociclador Techne modelo Touchene Gradient
- Ultracongelador Nuaire modelo UN-6613A35
- Vórtex Fisher Scientific modelo Genie-2