

ARTÍCULOS DE REVISIÓN/REVIEW ARTICLES

■ Revisiones Básicas/Basics reviews

Biología molecular del virus sincitial respiratorio y desarrollo de estrategias profilácticas

Molecular biology of syncytial respiratory virus and development of prophylactic strategies

Homero San Juan Vergara¹, Mario Alberto Gutiérrez², Shyam S. Mohapatra³

Resumen

El virus sincitial respiratorio es uno de los patógenos con la más alta prevalencia en infecciones del tracto respiratorio superior e inferior. Este virus desencadena cuadros tan severos como bronquiolitis en los lactantes y neumonías en los ancianos. El desarrollo de vacunas se ha visto afectado por la falta de conocimiento respecto a cuál es el mecanismo inmunitario adecuado para prevenir la infección, además de la capacidad del virus para interferir con el desarrollo de la respuesta inmunitaria. El objetivo es revisar la biología molecular del virus, cómo éste puede interferir con la respuesta inmunitaria y cómo este conocimiento previo ha servido para desarrollar estrategias profilácticas tipo vacunas que aunque todavía están en escala del laboratorio lucen prometedoras. La fuente de información para esta revisión fueron los artículos publicados desde 1990 hasta la fecha en las revistas indexadas en ISI y PUBMED.

Palabras claves: Virus sincitial respiratorio, profilaxis, biología molecular, ciclo de infección / SALUD UNINORTE. Barranquilla (Col.) 2006; 22 (2): 135-153

Abstract

Respiratory syncytial virus is one of the pathogens with the highest prevalence in infections of upper and lower respiratory tracts. This virus triggers clinical phenotypes as severe as bronchiolitis in infants and pneumonia in the elderly. The development of vaccines has been hampered by the lack of knowledge regarding the adequate immune mechanism able to address the infection as well as the ability of the virus to interfere with the development of a complete immune response. The aim of this paper is to review the molecular biology aspects of the virus; how the virus is able to interfere with the immune response; and how this previous knowledge has helped us to develop prophylactic strategies as vaccines, which they look promising even though they are still at bench scale. The source for this review came from articles published from 1990 until today in journal indexed in ISI and PUBMED.

Key words: Respiratory syncytial virus, prophylaxis, molecular biology, infection cycle / SALUD UNINORTE. Barranquilla (Col.) 2006; 22 (2): 135-153

¹Departamento de Ciencias Básicas Médicas, División Salud, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia.

²Estudiante de IV semestre de Medicina, Universidad del Norte.

³Division of Allergy and Immunology, Joy McCann Culverhouse Airway Disease Research Center, University of South Florida College of Medicine and James A. Haley VA Hospital, Tampa, FL.

Address correspondence to: Homero Sanjuan Vergara, MD PhD, Departamento de Ciencias Básicas Médicas, División Salud, Universidad del Norte. Km 5 vía Puerto Colombia. Barranquilla, Colombia. Tel: (575) 3509285. hsanjuan@uninorte.edu.co

Fecha de recepción: 23 de agosto de 2006
Fecha de aceptación: 25 de septiembre de 2006

Salud uninorte
Vol. 22, N° 2, 2006
ISSN 0120-5552

INTRODUCCIÓN

El virus sincitial respiratorio (VSR) es uno de los patógenos respiratorios más importantes que afecta todos los grupos etáreos. Aproximadamente, el 90% de los niños se infecta alrededor de los 2 años de edad (1, 2). Sin embargo, lactantes (<18 meses de edad) y los ancianos son los grupos que sufren la forma más severa de la infección, como es la enfermedad del tracto respiratorio inferior (bronquiolitis y neumonía) (1).

En la mayor parte de los casos, el grado mayor de severidad se observa durante la primo-infección. Estudios previos sugirieron que los lactantes con un historial clínico de nacimiento prematuro, displasia broncopulmonar, enfermedad congénita del corazón, fibrosis quística o inmunosupresión tienen más riesgo de desarrollar los cuadros más severos de bronquiolitis o neumonía que conllevan un alto índice de muerte (1, 2). No obstante, el análisis de un estudio epidemiológico reveló que las muertes asociadas a infección por el VSR en niños norteamericanos, en el período comprendido entre 1979 y 1997, no se presentaron en el grupo de niños con el mayor riesgo de desarrollar las formas más severas de la infección (3). Lo anterior sugiere que la posibilidad de muerte asociada a infección por el VSR puede presentarse en cualquier lactante, no importa su condición previa.

La recurrencia de la infección a lo largo de la vida del individuo es común, debido a que no se desarrolla una inmunidad completa contra el VSR. Aunque la enfermedad del tracto respiratorio superior (rinitis u otitis media aguda) es la principal forma de presentación clínica de la infección en niños mayores de 2 años y adultos, ésta también puede ser la causa de hasta el 2,4% de los casos de neumonía adquirida en la comunidad que se presentan en estos grupos poblacionales (4). En ancianos, la infección por el VSR tiene un índice de mortalidad cercano al 10%. Un estudio previo mostró que el 78% de dichas muertes se presentaron en aquellos ancianos con enfermedad cardíaca y/o pulmonar (5).

La bronquiolitis secundaria a la infección por el VSR es la causa principal de hospitalización en el lactante (6). Esto se traduce en una carga severa para los servicios de salud. Es más, en el período comprendido entre 1997 y 2004, la atención médica en las salas de emergencia incurrió en costos cercanos a los 202 millones de dólares en los Estados Unidos de América (6).

En el presente no se encuentra comercializada una vacuna que proteja contra la infección por el VSR, y el tratamiento actual, Ribavirina, sólo produce una modesta mejoría de corta duración en el cuadro respiratorio (7), y su uso se ha restringido a un grupo altamente selecto de pacientes que sufren de inmunodeficiencia de células T (8). La inmunoprofilaxis pasiva que involucra la utilización de una versión humanizada de un anticuerpo monoclonal contra la proteína F del VSR (anti-VSR-F, palivizumab) protege a individuos en alto riesgo de infección. Desafortunadamente, su costo limita las oportunidades de generalizar su uso como profiláctico. El desarrollo de antivirales requiere una comprensión total de los aspectos moleculares de los eventos tempranos de la infección, incluyendo aquellos relacionados con la interacción virus-huésped necesarios para la fusión del virus con la célula y la entrada del material genómico viral. Dicha comprensión es un trabajo en progreso.

1.a. Biología y estructura del VSR

El VSR humano se encuentra clasificado como un virus que pertenece al género *Pneumovirus*, subfamilia *Pneumovirinae*, familia *Paramyxoviridae*, orden *Mononegavirales*, cuyos miembros consisten de virus ARN de cadena sencilla, no segmentada y de orientación negativa. Además del VSR humano, el género *Pneumovirus* incluye el VSR bovino, el VSR ovino y el virus pneumonia del ratón.

La subfamilia *Pneumovirinae* también incluye al género *Metapneumovirus*, el cual difiere de los pneumovirus con respecto al orden de los genes y a la ausencia de genes que se encargan de codificar las proteínas no estructurales. El género *Metapneumovirus* incluye a las especies recientemente descubiertas del pneumovirus humano y del pneumovirus de las aves.

El virión del VSR consiste de una nucleocápside contenida dentro de una envoltura lipídica. Los viriones se caracterizan por su forma esférica irregular y un rango de tamaño que varía entre 150 y 300 nm. El VSR también puede adquirir una forma filamentososa que tiene un diámetro de 60-100 nm y una longitud de hasta 10 μm (9).

La membrana plasmática de la célula huésped provee la bicapa lipídica de la envoltura del virus. Las glicoproteínas transmembranales del virus (las proteínas F, G y SH) se autoorganizan de tal manera que forman espículas (“spikes”), visibles a través del microscopio electrónico. Las proteínas de las balsas lipídicas de la célula huésped también se incorporan a la envoltura de las partículas virales maduras (10-12). La proteína de la matriz (M) del virus conecta la nucleocápside con la envoltura.

La nucleocápside tiene un diámetro de 15 nm y se observa a través del microscopio electrónico como un material electro-denso en el interior de las formas redondas y filamentosas del VSR (9). Dichas nucleocápsides consisten del genoma viral y proteínas asociadas al genoma, como son la proteína N, la fosfoproteína P, la subunidad mayor de la polimerasa L y el factor anti-terminación M2-1. Tanto el genoma del virus como sus proteínas asociadas en la nucleocápside forman un complejo ribonucleoproteico muy compacto, el cual es resistente a la actividad RNasa.

1.b. El genoma

La mayoría de los viriones tienen un genoma de ARN con una longitud de 15.222 nucleótidos y con una orientación negativa. Sin embargo, existe una fracción de los viriones que incorpora el intermediario replicativo de orientación positiva, llamado ARN antígenómico. Dicho ARN antígenómico se sintetiza durante la replicación viral y sirve de plantilla para la síntesis del genoma del virus. Lo anterior indica que no hay un mecanismo que permita discriminar entre ambas formas de ARN durante el empaquetamiento del virus. Otras características adicionales de estas formas de ARN del genoma del virus son el no presentar gorra o “cap” y no tener una cola de poliadenina.

El genoma codifica para 10 ARN mensajeros. Los genes virales se ordenan con sentido 3' al 5' en la siguiente manera: NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L. El ARNm para

M2 contiene dos marcos de lectura que codifican para dos diferentes proteínas: M2-1 y M2-2. Para el evento de la transcripción, el genoma del virus contiene unas secuencias cortas que actúan en cis y que señalan las fronteras de cada gen; las secuencias de inicio del gen (GS) y de terminación del gen (GE). La enzima ARN-polimerasa, dependiente de ARN, reconoce a la secuencia GS, y así inicia la transcripción del gen vecino, mientras la secuencia GE sirve de señal para liberar el ARNm naciente y añadir la cadena de poli-A (13). Los primeros 9 genes se encuentran separados uno del otro mediante secuencias no conservadas; sin embargo, los genes M2 y L se sobrepone por 68 nucleótidos, lo cual coloca la secuencia GS del gen L dentro del gen M2. Por último, una secuencia señal adicional que actúa en cis localizada en el extremo 3' del genoma cumple funciones importantes para los eventos de transcripción y de replicación viral (13).

1.c. Proteínas del virus

La proteína G es una glicoproteína tipo II con abundantes glicosilaciones N y O. Debido a sus propiedades de mucina, media la mayor parte de la adsorción del virus a las células huésped a través de la unión con los glicosaminoglicanos altamente sulfatados presentes en la membrana plasmática (14). Las moléculas de carbohidratos asociadas a la proteína G contribuyen a la unión del virus con la célula (14). Por otro lado, la proteína G tiene un motivo que le permite unirse al receptor de la fractalkina, y tal unión se ha postulado como responsable de la depresión respiratoria en neonatos infectados con el VSR (15, 16).

La ausencia del gen que codifica para la proteína G (cepa recombinante VSR Δ G) no afecta el ensamblaje ni la propagación del virus. Por otra parte, esta cepa recombinante permitió demostrar que la proteína F contribuye parcialmente con el proceso de unión o adsorción del virus con la membrana celular (17). Sin embargo, la proteína G es necesaria para una propagación eficiente del VSR *in vivo*. Además, la proteína G contribuye en el sesgo de la respuesta inmune hacia un perfil Th-2, lo cual puede explicar el defecto en lograr una inmunidad completa y durable contra el VSR.

La glicoproteína F media la penetración del virus porque facilita la fusión entre la envoltura del virión y la membrana de la célula huésped. La proteína F forma trímeros que aparecen como espículas en forma de conos o bombones en imágenes obtenidas por microscopía electrónica. Estas espículas parecen ser formas alternas que los trímeros adquieren antes y después de desencadenar la fusión (18, 19). Estos cambios en la estructura parecen ser necesarios en llevar el péptido de fusión hacia una posición más cercana a la secuencia "ancla" de la proteína F; desencadenándose, así, la fusión del virus (y/o célula infectada) con la membrana de la célula "blanco" (18, 19). Como se comentó previamente, la proteína F también participa en la unión del virus a la membrana de la célula. Algunas moléculas de la membrana de la célula identificadas como receptores para la proteína F incluyen a las proteínas ICAM-1, Anexina II y "Toll-like receptor (TLR)-4" (20-22).

La proteína F requiere de un mecanismo de "maduración" que consiste en el corte del precursor F0 para producir el heterodímero F2-F1 unidos a través de enlace disulfuro. Dicho evento de "maduración" sucede en el compartimiento trans-Golgi

y es catalizado por una enzima serina proteasa semejante a la Furina (23, 24). Este evento post-traducciona permite la liberación del péptido de fusión que se encuentra localizado en el extremo aminoterminal de la subunidad F1. Por otro lado, la subunidad F2 parece ser determinante en la especificidad de especie del VSR humano y el VSR bovino en cuanto a la infección de células humanas y bovinas respectivamente (25).

La proteína SH es una pequeña proteína hidrofóbica cuya función no se conoce. La eliminación del gen que codifica para la proteína SH no interfiere con la propagación *in vitro* o *in vivo* del VSR. Sin embargo, la proteína SH parece fortalecer el evento de fusión debido, tal vez, a la formación de un complejo oligomérico conformado por las proteínas F, G y SH, el cual tiene mayor afinidad por los glicosaminoglicanos comparado con el mostrado por las proteínas G o F (26).

La proteína de la matriz viral (M) forma una capa que recubre la cara interna de la envoltura viral y cumple un papel esencial en el ensamblaje del virus debido a sus contactos con la membrana plasmática, la envoltura y la nucleocápside del virus (27, 28). Además, su propiedad de unirse al ARN viral contribuye al proceso de ensamblaje (27, 28). Por otro lado, la proteína M parece cumplir un papel importante en la usurpación de las actividades de la célula huésped debido a que inhibe la transcripción de la célula (29).

Las proteínas N, P, M2-1 y L, que se encuentran asociadas a la nucleocápside, cumplen papeles esenciales en diferentes estadios de los eventos de transcripción y de replicación viral. La proteína N forma un complejo fuerte con el ARN genómico o antígenómico, y este complejo es el que constituye la nucleocápside resistente a la actividad de la enzima ribonucleasa. La proteína P facilita dicha interacción al servir como chaperona a la proteína N (30). Estos oligómeros N-P también funcionan como cofactores de la enzima polimerasa viral. Para tal efecto, la proteína P debe ser fosforilada para que el complejo polimerasa sea funcional (31). La proteína L es la subunidad principal de la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN. El oligómero formado por las proteínas N, P y L es suficiente para la replicación viral; sin embargo, el factor de anti-terminación M2-1 es necesario que haga parte del complejo con el fin de obtener la máxima eficiencia en la transcripción (32, 33). La proteína M2-1 cumple este papel debido a que reduce el número de complejos de polimerasa que se separan del genoma (32, 33). De esta manera, la proteína M2-1 facilita la transcripción a través de las regiones intergénicas e incrementa la expresión de los genes que se encuentran en la región distal (32, 33).

El factor regulador M2-2 es responsable de cambiar la condición operacional del complejo de la polimerasa de un modo transcripcional a uno de replicación. Este paso es crítico para la propagación eficiente del VSR (34, 35). En este momento no se conoce cómo la proteína M2-2 facilita dicho cambio.

Las proteínas no estructurales NS1 y NS2 parecen servir de antagonistas al sistema del IFN tipo I debido a que interfieren con la actividad del factor de transcripción IRF-3. Así, la expresión de estas proteínas interfiere con la expresión de IFN- β por la célula infectada (36, 37).

1.d. Integración en el ciclo de replicación

El ciclo de replicación del VSR toma entre 16 a 20 horas en completarse (figura 1). Como se mencionó previamente, las proteínas G y F del VSR contribuyen a la unión del virus a las células. El modelo de penetración del VSR más aceptado hasta la fecha es el mecanismo de fusión a nivel de membrana plasmática. Para tal evento, un cambio en la forma de la proteína F permite que su péptido de fusión se inserte dentro de la membrana celular. Aunque la evidencia experimental indica que el VSR no utiliza de manera eficiente el sistema de endocitosis mediado por clatrina para penetrar las células, no está claro si el VSR puede utilizar otras vías endocíticas como aquellas mediadas por las balsas lipídicas o la macropinocitosis (38).

Los eventos de transcripción y de replicación suceden en el citoplasma. La detección temprana de las primeras moléculas de ARNm y de proteínas del VSR ocurre entre 4 a 6 horas después de la infección (39). La transcripción inicia cuando el complejo polimerasa contacta al promotor localizado en el extremo 3' del genoma. La transcripción de los diferentes genes del VSR ocurre de manera secuencial con la asistencia de la proteína M2-1, que ayuda al complejo de la polimerasa a pasar a través de las regiones intergénicas. A medida que la transcripción progresa a lo largo del genoma, algunos complejos se separan y la expresión de los genes que se encuentran distales se reduce, lo cual resulta en un gradiente de expresión desde los genes proximales a los distales. Los productos proteínicos se acumulan, y cuando el factor regulador M2-2 alcanza cierto nivel, el complejo polimerasa cambia del modo transcripcional al modo de replicación. En esta condición, el complejo de la polimerasa ignora las señales GE. En este evento, la copia antígenómica con orientación positiva se sintetiza, la cual sirve como plantilla para generar el genoma del virión (13).

La unión de la proteína N al ARN genómico o antígenómico asiste en el ensamblaje de la nucleocápside, la cual se complementa con la incorporación del resto de las proteínas asociadas a la misma. Las nucleocápsides llegan a la membrana plasmática, donde contactan a la proteína M, que se encuentra localizada en la cara citoplasmática de las balsas lipídicas (12, 27). Por otro lado, las proteínas F, G y SH también se acumulan en las balsas lipídicas (11, 40, 41). Así, las balsas lipídicas se constituyen en el sitio donde ocurre el proceso final de ensamblaje y de gemación del VSR. Dicha gemación ocurre por el lado apical de las células del epitelio bronquial (42-44). De esta manera, la infección por el VSR causa daño y pérdida del epitelio, lo cual conduce a varias anomalías fisiológicas que incluyen taponamiento de las vías aéreas por moco y aumento de la permeabilidad del epitelio. El grado de daño epitelial se correlaciona con la magnitud de la inflamación y la hiperreactividad de las vías aéreas. La molécula TLR-4 no sólo es reconocida por la proteína viral F sino que parece intervenir en el proceso inflamatorio y media parte de la respuesta antiviral. Lo anterior se deduce de la respuesta de ratones deficientes para TLR-4 ante la infección viral, en donde se observó una actividad defectuosa de las células NK y una disminución de la producción de IL-12, además de una reducción en la eliminación del VSR, cuando se compara con ratones silvestres (45). Aparte de lo anterior, la infección por el VSR conlleva a un aumento en la expresión de las moléculas TLR-4 en la membrana de las células del epitelio bronquial, lo cual las vuelve más susceptibles a iniciar procesos inflamatorios inducidos por el lipopolisacárido (46).

Consistente con el papel del TLR-4 en el proceso inflamatorio, mutaciones de esta proteína se asocian con un riesgo aumentado de bronquiolitis severa secundaria a infección por el VSR en lactantes previamente sanos (47).

2. Respuesta del huésped a la infección por el VSR

En general, el conjunto de genes relacionado con el sistema del IFN coordina los mecanismos requeridos para efectuar una respuesta inmunitaria adecuada así como un ambiente hostil hacia el virus. El sistema del IFN está dividido en tipo 1 (IFN- α , IFN- β e IFN- λ) y en tipo 2 (IFN- γ), y ambos controlan diferentes aspectos de las respuestas inmunes e inflamatorias (48, 49). Las moléculas de IFN producidas actúan de manera autocrina o paracrina uniéndose a sus respectivos receptores. Esto inicia la activación del sistema de señales intracelular dependiente de Janus cinasa – STAT (JAK-STAT), que conlleva a la transcripción de los genes estimulados por el sistema de IFN, los cuales son los directamente responsables de crear el ambiente hostil hacia el virus (49). El sistema IFN- α/β contribuye en el proceso de maduración de las células dendríticas, así como en la expansión y activación de las células NK, lo cual es crítico en el establecimiento de las respuestas inmunes innatas y adaptadas contra la infección viral (50, 51).

La expresión de los genes relacionados al sistema IFN tipo 2 está restringida a ciertas células del sistema inmune que incluyen a las células NK, células Th1 y células T CD8 (48). La producción temprana de IFN- γ por las células NK activadas influye en el proceso de diferenciación de las células T CD4 y en el reclutamiento de las células T CD8 en el sitio de la infección (48, 52-55). Así, la producción de IFN- γ crea un ambiente antiviral contra el VSR, como se ha demostrado en células humanas como en modelos experimentales de ratones. Uno de los mediadores de tal ambiente es la enzima 2'-5' oligoadenilato sintetasa (56), la cual también es regulada por la presencia de IFN- α e IFN- β . Esta enzima está encargada de la síntesis de 2'5' oligoadenilatos, los cuales activan la endoribonucleasa RNasa L que degradará de moléculas de ARN de la célula y del virus, cortando dichas moléculas al extremo 3' del motivo UpXp (57).

Sin embargo, el VSR es relativamente insensible a la acción del sistema del IFN tipo 1. Además, el VSR es un pobre inductor de la respuesta de IFN, y hay evidencia experimental que indica que el VSR es capaz de sobreponerse a la supresión de la infección mediada por el IFN en el epitelio respiratorio (58, 59). La producción de IFN en niños infectados por el VSR fue menor comparada con la producción inducida por otros virus respiratorios (60). Aun más, VSR obtenido a partir de muestras clínicas interfiere con la producción de IFN en células de origen epitelial y relacionadas con el sistema inmune (monocitos, linfocitos T y linfocitos B) (61). El mecanismo de resistencia del VSR hacia el sistema del IFN tipo 1 parece ser mediado por las proteínas NS1 y NS2. También se ha demostrado que las proteínas NS-1 y NS-2 interfieren con la vía de señalización JAK-STAT, debido a que desencadenan la degradación de la proteína STAT-2 a través de una vía dependiente de proteasoma (62, 63). Lo anterior explica la observación clínica con base en la poca utilidad de la molécula IFN-2 α en lo referente a la profilaxis y el tratamiento de la infección por el VSR (64, 65).

Las células epiteliales también participan en y regulan los eventos inflamatorios mediante la síntesis y la secreción de varias citoquinas con acción paracrina, tales como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , MIP-1 α , RANTES, en células epiteliales (66-69). Durante el estadio agudo de la infección, la secreción de dichas citoquinas inicia la respuesta inflamatoria local ya sea de manera directa o amplificando el evento inflamatorio previamente iniciado por macrófagos activados, eosinófilos o linfocitos (70-72).

3. Profilaxis

Varias estrategias diseñadas en el laboratorio se han propuesto como medidas profilácticas y terapéuticas contra la infección por el VSR (tabla 1). Estas incluyen vacunas, el uso de drogas antivirales, la administración de inmunidad pasiva y la utilización de los mecanismos de interferencia del ARN (73, 74). Aunque la evidencia clínica y experimental indica que la respuesta inmune media la resolución de la infección del VSR, no se conocen los agentes responsables. Por lo tanto, no entender cuál es el mecanismo inmune adecuado, así como el hecho de que no se desarrolla una inmunidad completa contra el VSR, ha obstaculizado el progreso en el desarrollo de vacunas (74).

3.a. Vacunas

Las diferentes estrategias empleadas en el diseño de vacunas han sido objeto de intensa investigación con respecto al VSR. Estas incluyen vacunas vivas recombinantes, atenuadas, de subunidades y de ADN (35, 75, 76). A excepción de la proteína L, todas las proteínas del VSR fueron probadas para inmunogenicidad y protección (77-79).

El primer intento de una vacuna consistió de un virus inactivo tratado con formalina, mezclado con hidróxido de aluminio y administrado vía intramuscular. Desafortunadamente, el uso de esta vacuna se asoció con una enfermedad más severa en niños infectados con la cepa circulante. Varios mecanismos se han propuesto como responsables de este fenómeno, entre ellos, inmuno-potenciación de la infección y un desequilibrio de la relación Th1/Th2 con un sesgo hacia el perfil Th2 (80-83). Por lo anterior, la estrategia de construir vacunas inactivas se ha abandonado, y en la actualidad se prefiere experimentar con vacunas construidas a partir de virus vivos atenuados. Varias cepas mutantes obtenidas a través de virus replicados a temperaturas bajas y sensibles a temperaturas (por su sigla en inglés, cpts) se han evaluado; entre ellas, cpts 530/1009, cpts248/955 y cpts248/404 (los números que siguen al acrónimo cpts significan la posición de los nucleótidos que han mutado) (84, 85). En estudios clínicos de fase I, cpts530/1009 y cpts248/404 resultaron ser seguras cuando se administraron en niños y adultos seropositivos para el VSR (84, 85). Sin embargo, cpts248/404 resultó ser más inmunogénico (84). Desafortunadamente, la utilidad clínica de la formulación cpts248/404 está en entredicho, debido al hecho de que esta formulación produjo abundantes secreciones que obstruyeron la nariz de los lactantes de 1-2 meses de edad, los cuales son los más necesitados de protección (84, 86).

La estrategia llamada genética reversa, que consiste en hacer las mutaciones directas sobre la secuencia del ARN genómico, ha ayudado en el desarrollo de una vacuna efectiva y segura. Así, las cepas mutantes rA2cp248/404 Δ SH y rA2cp248/404/1030 Δ SH se diseñaron tomando como marco referencial la cepa cpts248/404 (el símbolo Δ SH indica que el gen que codifica para la proteína SH se ha eliminado del genoma viral) (87). Ambas cepas resultaron estar lo suficientemente atenuadas en niños seropositivos, aunque la cepa rA2cp248/404/1030 Δ SH mostró ser más atenuada en niños seronegativos. Esta misma cepa resultó lo suficientemente inmunogénica para ser considerada como prometedor, y es la única, hasta el momento, que no produce obstrucción nasal en los lactantes (87).

Otros candidatos potenciales incluyen las cepas mutantes cuyas secuencias codificadoras para las proteínas NS-1 y NS-2 fueron eliminadas del genoma viral (88-90). Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* indican que estas cepas mutantes están lo suficientemente atenuadas (88-90). Además, las células infectadas con estas cepas mutantes liberan más IFN, lo cual indica que son muy inmunogénicas. Además, estas mutantes no inducen tanta producción de aquellas quimiocinas involucradas en la patogénesis de la infección por el VSR (88, 91). Se espera que estas nuevas cepas entren prontamente en ensayos clínicos.

También se han desarrollado vacunas basadas en subunidades. Varios estudios en fase I y II mostraron que la vacuna BBG2Na basada en la subunidad G resultó ser prometedor en cuanto a seguridad e inmunogenicidad (92). Se está en espera de los resultados de un estudio de fase III.

3.b. Antivirales

Aunque la evidencia experimental indica que la droga Ribavirina interfiere de manera eficiente con la transcripción y la replicación viral, los resultados clínicos son desfavorables y su utilidad se ha dirigido para tratar la infección en un grupo especial de individuos inmunodeficientes y durante los primeros días de un curso severo de la enfermedad (8, 73, 86, 93).

Sin embargo, el campo de investigación en antivirales ha presentado interesantes propuestas. La formulación RFI-641 previene la unión y la fusión del virus con la membrana celular (94-96). La inhalación de RFI-641 significativamente reduce la carga viral en el tracto respiratorio inferior de los monos verdes africanos. Sin embargo, la droga falló en mostrar una reducción consistente en el tracto respiratorio superior (96). Lo anterior parece indicar que la droga RFI-641 tiene potencial en proteger contra la forma severa de la infección.

3.c. Inmunoprofilaxis pasiva

La administración de una versión humanizada de un anticuerpo monoclonal contra la proteína F del VSR (Palivizumab) protege individuos en alto riesgo de desarrollar infección contra el VSR (8, 73, 86, 97, 98). Desafortunadamente, su utilización es costosa y existe preocupación sobre la aparición de nuevas cepas virales resistentes debido a la naturaleza cuasiespecie de los virus tipo ARN. Esta preocupación tomó

fuerza cuando virus resistentes al palivizumab fueron generados *in vitro* y mostraron resistencia a la profilaxis por esta formulación en un modelo animal (99). Afortunadamente, se han ingeniado mediante mutagénesis iterativa nuevas variantes de Fab y de anticuerpos IgG, los cuales muestran una mejoría en cuanto a su capacidad de neutralizar el VSR en un orden que va desde 44 hasta 1.500 veces sobre el Palivizumab (100). Lo anterior parece resolver el problema sobre el desarrollo de resistencia mediante estrategias que involucren usar cada variante de anticuerpo de manera independiente o en combinación.

3.d. Profilaxis usando plásmidos

La administración profiláctica de un plásmido que contenía el gen que codifica para IFN- γ en un modelo animal resultó en una disminución de la replicación viral e indujo un perfil de respuesta Th1 contra el VSR (53, 101, 102). El hecho que la infección natural por el VSR es resuelta por una elevada producción de IFN- γ , sugiere que los resultados de este modelo animal podrían tener aplicación en el cuadro humano.

Otra estrategia involucra la administración vía nasal de varios plásmidos que codifican todas las proteínas del VSR, a excepción de la proteína L, en una formulación de nanoesferas asociadas con quitosán. Dicha administración profiláctica en un modelo animal resultó en una reducción significativa de los títulos virales después de la infección por VSR (102). Además, los ratones que recibieron dicha formulación no tuvieron cambios significativos en la reactividad de las vías aéreas y no desarrollaron cambios inflamatorios en el pulmón. También se aumentaron los niveles de IgG específica contra el VSR; y en el mismo sentido, los niveles de IgA nasal, linfocitos T citotóxicos e IFN- γ en los pulmones. En conjunto, estos resultados indican el potencial de esta formulación contra el VSR.

Otra estrategia involucra la utilización de oligodeoxinucleótidos (ODN) que contienen el motivo CpG como adyuvante de vacunas de subunidades contra el VSR. Esta formulación se probó en un modelo animal. La administración simultánea de la proteína F adsorbida con hidróxido de aluminio y ODN-CpG resultó en un incremento significativo en los títulos de neutralización del suero, en la generación de precursores de células asesinas y una eliminación acelerada de los virus presentes en los pulmones. También, esto se correlacionó con un aumento en los niveles de IFN- γ y de los títulos de IgG2a contra la proteína F.

Otra estrategia consiste en aprovechar el mecanismo de interferencia contra el ARN. Dicho mecanismo es desencadenado por la presencia de ARN de doble cadena, que es degradado en fragmentos de 21 a 25 nucleótidos (siRNAs) con extremos 5' y 3' característicos por la acción de una enzima parecida a la RNasa III, llamada "Dicer" (103, 104). Estas moléculas siRNAs actúan como guías para una asociación de múltiples proteínas, que incluyen a la proteína Argonauta-2, la cual corta el ARNm (105). Estos mecanismos que silencian los genes son altamente específicos e inducen la inhibición de la expresión de los genes a lo largo del organismo. Este fenómeno bien caracterizado ha probado ser efectivo en silenciar genes de diferente virus (106-108).

En el caso del VSR, siRNAs contra los ARNm de las proteínas P y NS-1 resultaron ser eficientes como profilácticos en estudios celulares y en modelos animales (109, 110). La administración profiláctica vía nasal a un modelo animal de una formulación siRNA contra el ARNm de la proteína P del VSR redujo de manera significativa la carga viral y los parámetros de enfermedad asociados a la infección por el VSR (109). No se necesitó un adyuvante, además de utilizarse una muy baja dosis. Tampoco se detectaron virus resistentes contra esta formulación (109).

Otra manera de aportar los siRNAs es a través de plásmidos que transcriben ARN de doble cadena dentro de la célula. El promotor U6 conduce la transcripción del ARN de doble cadena, que es específico contra el ARNm de la proteína NS-1 (110). Como se mencionó previamente, NS-1 es capaz de interferir con la respuesta antiviral mediada por el IFN tipo 1 (36, 111). El silenciamiento del gen NS-1 atenuó la replicación del VSR y fortaleció la respuesta inmune a través de un incremento en la producción de IFN- β (110). Además, la vía de señales derivada del IFN- β aumentó su actividad después de eliminar la proteína NS-1. La administración profiláctica de esta formulación combinada con quitosán a un modelo animal vía nasal redujo significativamente la carga viral y alivió la patología pulmonar en ratones infectados con el VSR (110). Las células dendríticas promovieron una respuesta Th-1 y los ratones tratados con esta formulación fueron protegidos contra reinfecciones por el VSR (110). En conjunto, el silenciar la expresión del gen NS-1 mediante el uso de siRNAs indujo la transcripción de genes antivirales y suprimió la replicación del VSR.

4. Conclusiones

El virus sincital respiratorio tiene un impacto a nivel de salud pública debido a su capacidad de infectar, no importa la edad del individuo. Su propia dinámica en el ciclo de infección y la modulación de la respuesta inmunitaria que se monta para resolverla refleja la propiedad de algunas de sus proteínas como las NS-1 y NS-2 en cuanto a que bloquean el desarrollo de la respuesta tipo IFN, y así interfieren con la obtención de una inmunidad total en el individuo. Lo anterior parcialmente explica el hecho de que nos infectemos nuevamente con el VSR. El conocimiento obtenido, así como tecnologías derivadas de biología molecular como la genética reversa, ha permitido el desarrollo de candidatos a vacunas lo suficientemente atenuadas e inmunogénicas. Por último, la aplicación de los mecanismos de interferencia al ARN en el diseño de vacunas y de estrategias profilácticas puede dar origen a nuevas formulaciones que resuelvan o prevengan la acción de las proteínas NS-1 y NS-2.

Tabla 1
Estrategias de profilaxis contra la infección por el virus sincitial respiratorio

Estrategia profiláctica	Tipo	Candidato	Experimental	Usados o en estudio de fase clínica	Referencias	
Vacunas	Inactivo			Probado-Descartado	76-79	
	Cepa mutante por paso de replicación a temperatura baja	cpts530/1009		Fase I-Segura	80-81	
		cpts248/404		Fase I-Segura e Inmunogenética-Defecto: Obstrucción nasal	80-82	
	Producida por genética reversa	rA2cp248/404 SH		Fase I-Segura e Inmunogenética en niños seropositivos	83	
		rA2cp248/404/1030 SH		Fase I-Segura e Inmunogenética en niños seronegativos. Ventaja: No produce obstrucción nasal	83	
		NS1/ NS2	Atenuantes e Inmunogenéticas		84-87	
	Subunidades	BBG2Na-Proteína G		Fase II-Segura e inmunogenética	88	
	Plásmicos y Oligo	Nanopartículas de quitosán "Cocktail" plásmicos codificando para todas las proteínas del virus, excepto L	En ratones: Reducción de títulos virales y desarrollo de inmunidad específica			98
		Oligodeoxinucleótidos portando CpG asociado a vacunas de subunidades	En ratones: Incremento significativo en títulos de neutralización y desarrollos de inmunidad celular específica			
		Interferencias contra el ARNm de proteínas P y NS-1	En ratones: Reducción de carga viral, sirve de adyuvante, incrementa inmunidad celular y humoral			105-107
Antivirales	Inhibidor Transcripción y Replicación Viral	Ribavina		Sólo en individuos inmunodeficientes o enfermedad severa	8, 69, 82, 89	
	Inhibidor de la fusión viral	RFI-641	Redujo significativamente la carga viral en el tracto respiratorio inferior de los monos verdes africanos		92	
Inmunopprofilaxis pasiva	Inhibe la unión del virus y la fusión con la célula	Palivizumab(anticuerpo monoclonal contra la proteína F)		Protege a individuos en alto riesgo de infectarse con el VSR	69, 82, 93, 94	

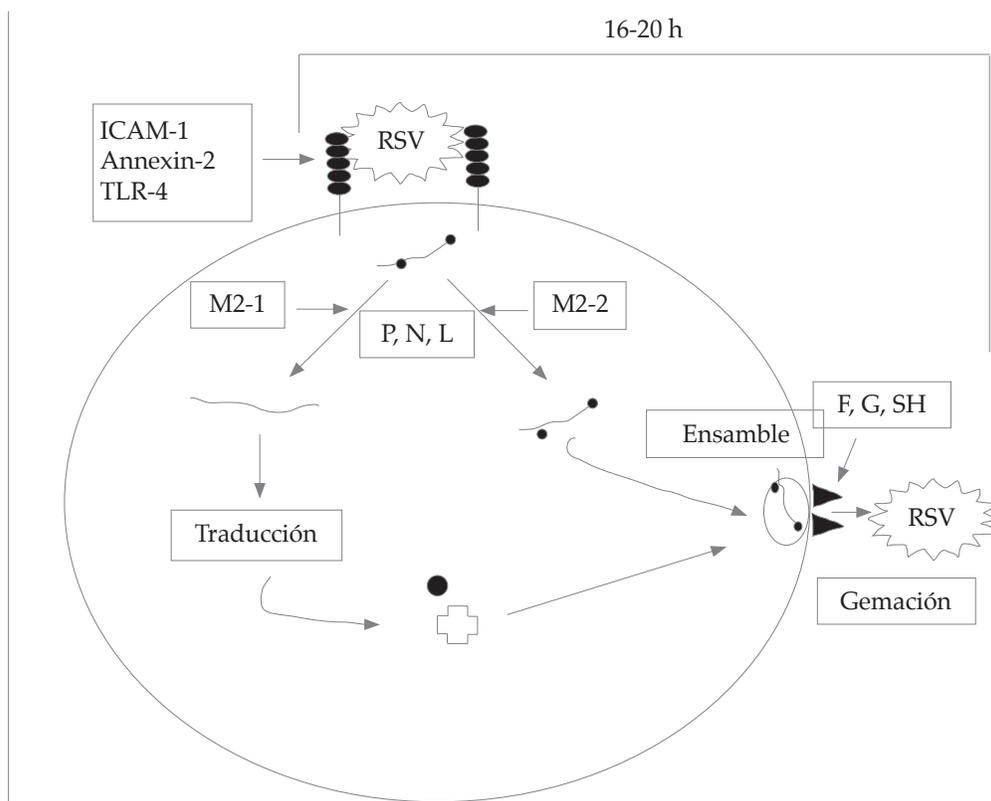


Figura 1. Ciclo de replicación del virus sincitial respiratorio. El ciclo de replicación toma entre 16 a 20 horas. Este comienza con la unión del virus a algunos receptores que se han candidatizado, incluyendo ICAM-1, TLR-4 y Anexina-2. Una vez las ribonucleoproteínas entran al citoplasma, inicia la transcripción y transducción de los diferentes genes con la consecuente producción de las proteínas del virus. La acumulación de la proteína viral M2-2 cambia el modo operacional del sistema de la polimerasa hacia la replicación. Según el sitio final en la estructura del virus, las proteínas de la envoltura F, G y SH tienden a ubicarse en las balsas lipídicas. La proteína M se localiza en la cara interna de las balsas lipídicas, donde interactúa con las proteínas de la envoltura y dirige el empaquetamiento del VSR.

Financiación: Colaboración de la Universidad del Norte.

Conflicto de intereses: Ninguno.

Referencias

1. Simoes, E. A. Respiratory syncytial virus infection. *Lancet* 1999; 354:847.
2. Respiratory syncytial virus activity—United States, 1999-2000 season. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000; 49:1091.
3. Shay, D. K., R. C. Holman, G. E. Roosevelt, M. J. Clarke, and L. J. Anderson. Bronchiolitis-associated mortality and estimates of respiratory syncytial virus-associated deaths among US children, 1979-1997. *J Infect Dis* 2001; 183:16.

4. Dowell, S. F., L. J. Anderson, H. E. Gary, Jr., D. D. Erdman, J. F. Plouffe, T. M. File, Jr., B. J. Marston, and R. F. Breiman. Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. *J Infect Dis* 1996; 174:456.
5. Thompson, W. W., D. K. Shay, E. Weintraub, L. Brammer, N. Cox, L. J. Anderson, and K. Fukuda. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *Jama* 2003; 289:179.
6. Leader, S., and K. Kohlhase. Recent trends in severe respiratory syncytial virus (RSV) among US infants, 1997 to 2000. *J Pediatr* 2003; 143:S127.
7. Falsey, A. R., C. K. Cunningham, W. H. Barker, R. W. Kouides, J. B. Yuen, M. Menegus, L. B. Weiner, C. A. Bonville, and R. F. Betts. Respiratory syncytial virus and influenza A infections in the hospitalized elderly. *J Infect Dis* 1995; 172:389.
8. Kimpen, J. L. Prevention and treatment of respiratory syncytial virus bronchiolitis and postbronchiolitic wheezing. *Respir Res* 2002; 3:S40.
9. Bachi, T., and C. Howe. Morphogenesis and ultrastructure of respiratory syncytial virus. *J Virol* 1973; 12:1173.
10. Brown, G., C. E. Jeffree, T. McDonald, H. W. Rixon, J. D. Aitken, and R. J. Sugrue. Analysis of the interaction between respiratory syncytial virus and lipid-rafts in Hep2 cells during infection. *Virology* 2004; 327:175.
11. Brown, G., H. W. Rixon, and R. J. Sugrue. Respiratory syncytial virus assembly occurs in GM1-rich regions of the host-cell membrane and alters the cellular distribution of tyrosine phosphorylated caveolin-1. *J Gen Virol* 2002; 83:1841.
12. Brown, G., J. Aitken, H. W. Rixon, and R. J. Sugrue. Caveolin-1 is incorporated into mature respiratory syncytial virus particles during virus assembly on the surface of virus-infected cells. *J Gen Virol* 2002; 83:611.
13. Fearn, R., M. E. Peeples, and P. L. Collins. Mapping the transcription and replication promoters of respiratory syncytial virus. *J Virol* 2002; 76:1663.
14. Bourgeois, C., J. B. Bour, K. Lidholt, C. Gauthray, and P. Pothier. Heparin-like structures on respiratory syncytial virus are involved in its infectivity in vitro. *J Virol* 1998; 72:7221.
15. Tripp, R. A., A. Dakhama, L. P. Jones, A. Barskey, E. W. Gelfand, and L. J. Anderson. The G glycoprotein of respiratory syncytial virus depresses respiratory rates through the CX3C motif and substance P. *J Virol* 2003; 77:6580.
16. Tripp, R. A., L. P. Jones, L. M. Haynes, H. Zheng, P. M. Murphy, and L. J. Anderson. CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat Immunol* 2001; 2:732.
17. Techaarpornkul, S., P. L. Collins, and M. E. Peeples. Respiratory syncytial virus with the fusion protein as its only viral glycoprotein is less dependent on cellular glycosaminoglycans for attachment than complete virus. *Virology* 2002; 294:296.
18. Calder, L. J., L. Gonzalez-Reyes, B. Garcia-Barreno, S. A. Wharton, J. J. Skehel, D. C. Wiley, and J. A. Melero. Electron microscopy of the human respiratory syncytial virus fusion protein and complexes that it forms with monoclonal antibodies. *Virology* 2000; 271:122.
19. Morton, C. J., R. Cameron, L. J. Lawrence, B. Lin, M. Lowe, A. Luttick, A. Mason, J. McKimm-Breschkin, M. W. Parker, J. Ryan, M. Smout, J. Sullivan, S. P. Tucker, and P. R. Young. Structural characterization of respiratory syncytial virus fusion inhibitor escape mutants: homology model of the F protein and a syncytium formation assay. *Virology* 2003; 311:275.
20. Malhotra, R., M. Ward, H. Bright, R. Priest, M. R. Foster, M. Hurle, E. Blair, and M. Bird. Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells. *Microbes Infect* 2003; 5:123.
21. Kurt-Jones, E. A., L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson, and R. W. Finberg. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 2000; 1:398.

22. Behera, A. K., H. Matsuse, M. Kumar, X. Kong, R. F. Lockey, and S. S. Mohapatra. Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280:188.
23. Gonzalez-Reyes, L., M. B. Ruiz-Arguello, B. Garcia-Barreno, L. Calder, J. A. Lopez, J. P. Albar, J. J. Skehel, D. C. Wiley, and J. A. Melero. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:9859.
24. Sugrue, R. J., C. Brown, G. Brown, J. Aitken, and L. R. H. W. Mc. Furin cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is not a requirement for its transport to the surface of virus-infected cells. *J Gen Virol* 2001; 82:1375.
25. Schlender, J., G. Zimmer, G. Herrler, and K. K. Conzelmann. Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. *J Virol* 2003; 77:4609.
26. Feldman, S. A., R. L. Crim, S. A. Audet, and J. A. Beeler. Human respiratory syncytial virus surface glycoproteins F, G and SH form an oligomeric complex. *Arch Virol* 2001; 146:2369.
27. Marty, A., J. Meanger, J. Mills, B. Shields, and R. Ghildyal. Association of matrix protein of respiratory syncytial virus with the host cell membrane of infected cells. *Arch Virol* 2004; 149:199.
28. Rodriguez, L., I. Cuesta, A. Asenjo, and N. Villanueva. Human respiratory syncytial virus matrix protein is an RNA-binding protein: binding properties, location and identity of the RNA contact residues. *J Gen Virol* 2004; 85:709.
29. Ghildyal, R., C. Baulch-Brown, J. Mills, and J. Meanger. The matrix protein of Human respiratory syncytial virus localises to the nucleus of infected cells and inhibits transcription. *Arch Virol* 2003; 148:1419.
30. Castagne, N., A. Barbier, J. Bernard, H. Rezaei, J. C. Huet, C. Henry, B. Da Costa, and J. F. Eleouet. Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain. *J Gen Virol* 2004; 85:1643.
31. Dupuy, L. C., S. Dobson, V. Bitko, and S. Barik. Casein kinase 2-mediated phosphorylation of respiratory syncytial virus phosphoprotein P is essential for the transcription elongation activity of the viral polymerase; phosphorylation by casein kinase 1 occurs mainly at Ser(215) and is without effect. *J Virol* 1999; 73:8384.
32. Fearn, R., and P. L. Collins. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol* 1999; 73:5852.
33. Mason, S. W., E. Aberg, C. Lawetz, R. DeLong, P. Whitehead, and M. Liuzzi. Interaction between human respiratory syncytial virus (RSV) M2-1 and P proteins is required for reconstitution of M2-1-dependent RSV minigenome activity. *J Virol* 2003; 77:10670.
34. Bermingham, A., and P. L. Collins. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:11259.
35. Teng, M. N., S. S. Whitehead, A. Bermingham, M. St Claire, W. R. Elkins, B. R. Murphy, and P. L. Collins. Recombinant respiratory syncytial virus that does not express the NS1 or M2-2 protein is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees. *J Virol* 2000; 74:9317.
36. Spann, K. M., K. C. Tran, B. Chi, R. L. Rabin, and P. L. Collins. Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]. *J Virol* 2004; 78:4363.
37. Bossert, B., and K. K. Conzelmann. Respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural (NS) proteins as host range determinants: a chimeric bovine RSV with NS genes from human RSV is attenuated in interferon-competent bovine cells. *J Virol* 2002; 76:4287.
38. Srinivasakumar, N., P. L. Ogra, and T. D. Flanagan. Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEp-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay. *J Virol* 1991; 65:4063.

39. Levine, S., and R. Hamilton. Kinetics of the respiratory syncytial virus growth cycle in HeLa cells. *Arch Gesamte Virusforsch* 1969; 28:122.
40. Rixon, H. W., G. Brown, J. Aitken, T. McDonald, S. Graham, and R. J. Sugrue. The small hydrophobic(SH) protein accumulates within lipid-raft structures of the Golgi complex during respiratory syncytial virus infection. *J Gen Virol* 2004; 85:1153.
41. McCurdy, L. H., and B. S. Graham. Role of plasma membrane lipid microdomains in respiratory syncytial virus filament formation. *J Virol* 2003; 77:1747.
42. Brock, S. C., J. R. Goldenring, and J. E. Crowe, Jr. Apical recycling systems regulate directional budding of respiratory syncytial virus from polarized epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:15143.
43. Roberts, S. R., R. W. Compans, and G. W. Wertz. Respiratory syncytial virus matures at the apical surfaces of polarized epithelial cells. *J Virol* 1995; 69:2667.
44. Zhang, L., M. E. Peeples, R. C. Boucher, P. L. Collins, and R. J. Pickles. Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology. *J Virol* 2002; 76:5654.
45. Haynes, L. M., D. D. Moore, E. A. Kurt-Jones, R. W. Finberg, L. J. Anderson, and R. A. Tripp. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol* 2001; 75:10730.
46. Monick, M. M., T. O. Yarovinsky, L. S. Powers, N. S. Butler, A. B. Carter, G. Gudmundsson, and G. W. Hunninghake. Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin. *J Biol Chem* 2003; 278:53035.
47. Tal, G., A. Mandelberg, I. Dalal, K. Cesar, E. Somekh, A. Tal, A. Oron, S. Itskovich, A. Ballin, S. Houria, A. Beigelman, O. Lider, G. Rechavi, and N. Amariglio. Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *J Infect Dis* 2004; 189:2057.
48. Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J. C. Howard. Cellular responses to interferon-gamma. *Annual Review of Immunology* 1997; 15:749.
49. Doly, J., A. Civas, S. Navarro, and G. Uze. Type I interferons: expression and signalization. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1998; 54:1109.
50. Mohty, M., A. Vialle-Castellano, J. A. Nunes, D. Isnardon, D. Olive, and W. Gaugler. IFN-alpha skews monocyte differentiation into toll-like receptor 7-expressing dendritic cells with potent functional activities. *Journal of Immunology* 2003; 171:3385.
51. Honda, K., S. Sakaguchi, C. Nakajima, A. Watanabe, H. Yanai, M. Matsumoto, T. Ohteki, T. Kaisho, A. Takaoka, S. Akira, T. Seya, and T. Taniguchi. Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *PNAS* 2003; 100:10872.
52. Biron, C. A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens, and T. P. Salazar-Mather. Natural killer cells in antiviral defense: Function and regulation by innate cytokines. *Annual Review of Immunology* 1999; 17:189.
53. Bukreyev, A., S. S. Whitehead, N. Bukreyeva, B. R. Murphy, and P. L. Collins. Interferon gamma expressed by a recombinant respiratory syncytial virus attenuates virus replication in mice without compromising immunogenicity. *PNAS* 1999; 96:2367.
54. Hermans, I. F., J. D. Silk, U. Gileadi, M. Salio, B. Mathew, G. Ritter, R. Schmidt, A. L. Harris, L. Old, and V. Cerundolo. NKT cells enhance CD4(+) and CD8(+) T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells. *Journal of Immunology* 2003; 171:5140.
55. Katze, M. G., Y. P. He, and M. Gale. Viruses and interferon: A fight for supremacy. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2:675.
56. Behera, A. K., M. Kumar, R. F. Lockey, and S. S. Mohapatra. 2'-5' oligoadenylate synthetase plays a critical role in interferon-7 inhibition of respiratory syncytial virus infection of human epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277:25601.
57. Samuel, C. E. 2001. Antiviral Actions of Interferons 10.1128/CMR.14.4.778-809. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; 14:778.
58. Gotoh, B., T. Komatsu, K. Takeuchi, and J. Yokoo. Paramyxovirus the interferon strategies for evading response. *Reviews in Medical Virology* 2002; 12:337.

59. Chonmaitree, T., N. J. Roberts, R. G. Douglas, C. B. Hall, and R. L. Simons. Interferon-Production by Human Mononuclear Leukocytes - Differences between Respiratory Syncytial Virus and Influenza-Viruses. *Infection and Immunity* 1981; 32:300.
60. Joshi, P., A. Shaw, A. Kakakios, and D. Isaacs. Interferon-gamma levels in nasopharyngeal secretions of infants with respiratory syncytial virus and other respiratory viral infections. *Clinical and Experimental Immunology* 2003; 131:143.
61. Schlender, J., V. Hornung, S. Finke, M. Gunthner-Biller, S. Marozin, K. Brzozka, S. Moghim, S. Endres, G. Hartmann, and K. K. Conzelmann. Inhibition of toll-like receptor 7- and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus. *J Virol* 2005; 79:5507.
62. Ramaswamy, M., L. Shi, M. M. Monick, G. W. Hunninghake, and D. C. Look. Specific inhibition of type I interferon signal transduction by respiratory syncytial virus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30:893.
63. Lo, M. S., R. M. Brazas, and M. J. Holtzman. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness. *J Virol* 2005; 79:9315.
64. Atreya, P. L., and S. Kulkarni. Respiratory syncytial virus strain A2 is resistant to the antiviral effects of type I interferons and human MxA. *Virology* 1999; 261:227.
65. Loveys, D. A., S. Kulkarni, and P. L. Atreya. Role of type I IFNs in the in vitro attenuation of live, temperature-sensitive vaccine strains of human respiratory syncytial virus. *Virology* 2000; 271:390.
66. Thomas, L. H., J. S. Friedland, M. Sharland, and S. Becker. Respiratory syncytial virus-induced RANTES production from human bronchial epithelial cells is dependent on nuclear factor-kappa B nuclear binding and is inhibited by adenovirus-mediated expression of inhibitor of kappa B alpha. *Journal of Immunology* 1998; 161:1007.
67. Elias, J. A., T. Zheng, O. Einarsson, M. Landry, T. Trow, N. Rebert, and J. Panuska. Epithelial Interleukin-11 - Regulation by Cytokines, Respiratory Syncytial Virus, and Retinoic Acid. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269:22261.
68. Arnold, R., F. Werner, B. Humbert, H. Werchau, and W. Konig. Effect of Respiratory Syncytial Virus-Antibody Complexes on Cytokine (Il-8, Il-6, Tnf-Alpha) Release and Respiratory Burst in Human Granulocytes. *Immunology* 1994; 82:184.
69. Arnold, R., B. Humbert, H. Werchau, H. Gallati, and W. Konig. Interleukin-8, Interleukin-6, and Soluble Tumor-Necrosis-Factor Receptor-Type-I Release from a Human Pulmonary Epithelial-Cell Line (A549) Exposed to Respiratory Syncytial Virus. *Immunology* 1994; 82:126.
70. Harris, J., and D. Werling. Binding and entry of respiratory syncytial virus into host cells and initiation of the innate immune response. *Cell Microbiol* 2003; 5:671.
71. Johnson, T. R., S. M. Hong, L. Van Kaer, Y. Koezuka, and B. S. Graham. NK T cells contribute to expansion of CD8(+) T cells and amplification of antiviral immune responses to respiratory syncytial virus. *Journal of Virology* 2002; 76:4294.
72. Graham, B. S., T. R. Johnson, and R. S. Peebles. Immune-mediated disease pathogenesis in respiratory syncytial virus infection. *Immunopharmacology* 2000; 48:237.
73. Maggon, K., and S. Barik. New drugs and treatment for respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* 2004; 14:149.
74. Huang, D. B., J. J. Wu, and S. K. Tying. A review of licensed viral vaccines, some of their safety concerns, and the advances in the development of investigational viral vaccines. *J Infect* 2004; 49:179.
75. Schmidt, A. C., D. R. Wenzke, J. M. McAuliffe, M. St Claire, W. R. Elkins, B. R. Murphy, and P. L. Collins. Mucosal immunization of rhesus monkeys against respiratory syncytial virus subgroups A and B and human parainfluenza virus type 3 by using a live cDNA-derived vaccine based on a host range-attenuated bovine parainfluenza virus type 3 vector backbone. *Journal of Virology* 2002; 76:1089.
76. Teng, M. N., and P. L. Collins. Altered growth characteristics of recombinant respiratory syncytial viruses which do not produce NS2 protein. *Journal of Virology* 1999; 73:466.

77. Brandenburg, A. H., H. J. Neijens, and A. Osterhaus. Pathogenesis of RSV lower respiratory tract infection: implications for vaccine development. *Vaccine* 2001; 19:2769.
78. Cherrie, A. H., K. Anderson, G. W. Wertz, and P. J. M. Openshaw. Human Cytotoxic T-Cells Stimulated by Antigen on Dendritic Cells Recognize the N, Sh, F, M, 22k, and 1b Proteins of Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Virology* 1992; 66:2102.
79. Connors, M., P. L. Collins, C. Y. Firestone, and B. R. Murphy. Respiratory Syncytial Virus (Rsv) F-Protein, G-Protein, M2-Protein (22k), and N-Proteins Each Induce Resistance to Rsv Challenge, but Resistance Induced by M2-Proteins and N-Proteins Is Relatively Short-Lived. *Journal of Virology* 1991; 65:1634.
80. Openshaw, P. J. M., F. J. Culley, and W. Olszewska. Immunopathogenesis of vaccine-enhanced RSV disease. *Vaccine* 2001; 20:S27.
81. Plotnicky, H., C. A. Siegrist, J. P. Aubry, J. Y. Bonnefroy, N. Corvaia, T. N. Nguyen, and U. F. Power. Enhanced pulmonary immunopathology following neonatal priming with formalin-inactivated respiratory syncytial virus but not with the BBG2NA vaccine candidate. *Vaccine* 2003; 21:2651.
82. Haynes, L. M., L. P. Jones, A. Barskey, L. J. Anderson, and R. A. Tripp. Enhanced disease and pulmonary eosinophilia associated with formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccination are linked to G glycoprotein CX3C-CX3CR1 interaction and expression of substance P. *Journal of Virology* 2003; 77:9831.
83. Kalina, W. V., A. R. Wollums, R. D. Berghaus, and L. J. Gershwin. Formalin-inactivated bovine RSV vaccine enhances a Th2 mediated immune response in infected cattle. *Vaccine* 2004; 22:1465.
84. Wright, P. F., R. A. Karron, R. B. Belshe, J. Thompson, J. E. Crowe, T. G. Boyce, L. L. Halburnt, G. W. Reed, S. S. Whitehead, E. L. Anderson, A. E. Wittek, R. Casey, M. Eichelberger, B. Thumar, V. B. Randolph, S. A. Udem, R. M. Chanock, and B. R. Murphy. Evaluation of a live, cold-passaged, temperature-sensitive, respiratory syncytial virus vaccine candidate in infancy. *Journal of Infectious Diseases* 2000; 182:1331.
85. Karron, R. A., P. F. Wright, J. E. Crowe, M. L. ClementsMann, J. Thompson, M. Makhene, R. Casey, and B. R. Murphy. Evaluation of two live, cold-passaged, temperature-sensitive respiratory syncytial virus vaccines in chimpanzees and in human adults, infants, and children. *Journal of Infectious Diseases* 1997; 176:1428.
86. Schmidt, A. C., T. R. Johnson, P. J. Openshaw, T. J. Braciale, A. R. Falsey, L. J. Anderson, G. W. Wertz, J. R. Groothuis, G. A. Prince, J. A. Melero, and B. S. Graham. Respiratory syncytial virus and other pneumoviruses: a review of the international symposium-RSV 2003. *Virus Res* 2004; 106:1.
87. Karron, R. A., P. F. Wright, R. B. Belshe, B. Thumar, R. Casey, F. Newman, F. P. Polack, V. B. Randolph, A. Deatly, J. Hackell, W. Gruber, B. R. Murphy, and P. L. Collins. Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. *Journal of Infectious Diseases* 2005; 191:1093.
88. Schlender, J., B. Bossert, U. Buchholz, and K. K. Conzelmann. Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2000; 74:8234.
89. Jin, H., X. Cheng, V. L. Traina-Dorge, H. J. Park, H. Zhou, K. Soike, and G. Kemble. Evaluation of recombinant respiratory syncytial virus gene deletion mutants in African green monkeys for their potential as live attenuated vaccine candidates. *Vaccine* 2003; 21:3647.
90. Jin, H., H. Zhou, X. Cheng, R. Tang, M. Munoz, and N. Nguyen. Recombinant respiratory syncytial viruses with deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 genes are attenuated in vitro and in vivo. *Virology* 2000; 273:210.
91. Spann, K. M., K. C. Tran, and P. L. Collins. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines. *J Virol* 2005; 79:5353.
92. de Waal, L., U. F. Power, S. Yuksel, G. van Amerongen, T. N. Nguyen, H. G. Niesters, R. L. de Swart, and A. D. Osterhaus. Evaluation of BBG2Na in infant macaques: specific immune responses after vaccination and RSV challenge. *Vaccine* 2004; 22:915.

93. Waugh, S. M. L., D. Pillay, D. Carrington, and W. F. Carman. Antiviral prophylaxis and treatment (excluding HIV therapy). *Journal of Clinical Virology* 2002; 25:241.
94. Huntley, C. C., W. J. Weiss, A. Gazumyan, A. Buklan, B. Feld, W. Hu, T. R. Jones, T. Murphy, A. A. Nikitenko, B. O'Hara, G. Prince, S. Quartuccio, Y. E. Raifeld, P. Wyde, and J. F. O'Connell. RFI-641, a potent respiratory syncytial virus inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 46:841.
95. Razinkov, V., A. Gazumyan, A. Nikitenko, G. Ellestad, and G. Krishnamurthy. RFI-641 inhibits entry of respiratory syncytial virus via interactions with fusion protein. *Chem Biol* 2001; 8:645.
96. Weiss, W. J., T. Murphy, M. E. Lynch, J. Frye, A. Buklan, B. Gray, E. Lenoy, S. Mitelman, J. O'Connell, S. Quartuccio, and C. Huntley. Inhalation efficacy of RFI-641 in an African green monkey model of RSV infection. *Journal of Medical Primatology* 2003; 32:82.
97. Kneyber, M. C., H. A. Moll, and R. de Groot. Treatment and prevention of respiratory syncytial virus infection. *Eur J Pediatr* 2000; 159:399.
98. Torrence, P. F., and L. D. Powell. The quest for an efficacious antiviral for respiratory syncytial virus. *Antivir Chem Chemother* 2002; 13:325.
99. Zhao, X., F. P. Chen, and W. M. Sullender. Respiratory syncytial virus escape mutant derived in vitro resists palivizumab prophylaxis in cotton rats. *Virology* 2004; 318:608.
100. Wu, H., D. S. Pfarr, Y. Tang, L. L. An, N. K. Patel, J. D. Watkins, W. D. Huse, P. A. Kiener, and J. F. Young. Ultra-potent antibodies against respiratory syncytial virus: Effects of binding kinetics and binding valence on viral neutralization. *Journal of Molecular Biology* 2005; 350:126.
101. Durbin, J. E., T. R. Johnson, R. K. Durbin, S. E. Mertz, R. A. Morotti, R. S. Peebles, and B. S. Graham. The role of IFN in respiratory syncytial virus pathogenesis. *Journal of Immunology* 2002; 168:2944.
102. Kumar, M., A. K. Behera, H. Matsuse, R. F. Lockey, and S. S. Mohapatra. Intranasal IFN-gamma gene transfer protects BALB/c mice against respiratory syncytial virus infection. *Vaccine* 1999; 18:558.
103. Provost, P., R. A. Silverstein, D. Dishart, J. Walfridsson, I. Djupedal, B. Kniola, A. Wright, B. Samuelsson, O. Radmark, and K. Ekwall. Dicer is required for chromosome segregation and gene silencing in fission yeast cells. *PNAS* 2002; 99:16648.
104. Provost, P., D. Dishart, J. Doucet, D. Fren Dewey, B. Samuelsson, and O. Radmark. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *Embo Journal* 2002; 21:5864.
105. Hammond, S. M., S. Boettcher, A. A. Caudy, R. Kobayashi, and G. J. Hannon. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 2001; 293:1146.
106. Ahlquist, P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* 2002; 296:1270.
107. Tabara, H., M. Sarkissian, W. G. Kelly, J. Fleenor, A. Grishok, L. Timmons, A. Fire, and C. C. Mello. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in C-elegans. *Cell* 1999; 99:123.
108. Fire, A. RNA-triggered gene silencing. *Trends in Genetics* 1999; 15:358.
109. Bitko, V., A. Musiyenko, O. Shulyayeva, and S. Barik. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* 2005; 11:50.
110. Zhang, W. D., H. Yang, X. Y. Kong, S. Mohapatra, H. San Juan-Vergara, G. Hellermann, S. Behera, R. Singam, R. F. Lockey, and S. S. Mohapatra. Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nature Medicine* 2005; 11:56.
111. Bossert, B., S. Marozin, and K. K. Conzelmann. Nonstructural proteins NS1 and NS2 of bovine respiratory syncytial virus block activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* 2003; 77:8661.