



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“Caracterización del papel de las gotas lipídicas  
durante el ciclo de infección del Virus Sincitial  
Respiratorio en una línea celular de epitelio pulmonar”**

**T E S I S**

Que presenta

**TANIA ALLIN VARGAS PAVÍA**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE  
BIOMEDICINA MOLECULAR**

**Directores de la Tesis:**

Dr. en C. Moises León Juárez

Dra. en C. Leticia Cedillo Barrón



El presente trabajo se realizó en la Torre de investigación del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”, en el Departamento de Inmunobioquímica bajo la asesoría del Dr. en C. Moisés León Juárez y de la Dra. en C. Leticia Cedillo Barrón, en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

## **Formó parte del proyecto:**

“Susceptibilidad de los trofoblastos de placenta humana a la infección con el Virus Sincitial Respiratorio y el posible papel de AMPK en el ciclo de infección placentario”

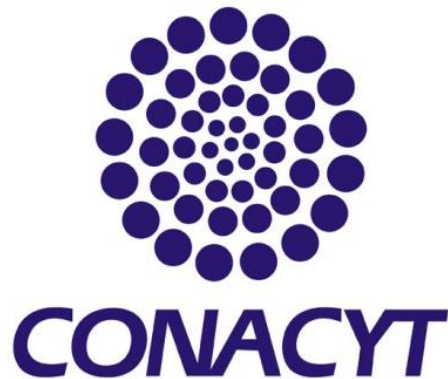
### **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**

Clave: CB-2015-01/ 00000255007

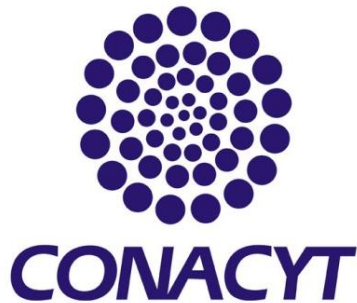
### **Fondos federales INPer**

212250-3210-21007-03-15

**Dr. en C. Moisés León Juárez**



## Agradecimientos institucionales:



**Beca de maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**

Durante el periodo: Septiembre 2017-Julio 2019

CVU-Becario: 85460

**Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav) por el apoyo en mi formación Académica.**



**Al Instituto Nacional de Perinatología (INPer) por el apoyo con fondos federales:**

212250-3210-21007-03-15

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

En primera instancia quiero a todas aquellas que de alguna forma contribuyeron a que fuera posible este escrito y que a lo largo del mismo aprendiera como persona y profesional. De forma particular agradezco a mis Tutores, el Dr. Moisés León Juárez y a la Dra. Leticia Cedillo Barrón, porque ambos, me apoyaron de manera incondicional, de ambos aprendí como profesional, pero aún más importante como persona. Dr. Moisés; gracias por seguir apoyándome y enseñándome, por darme palabras de aliento aun cuando todo parecía perdido, creó mejor que nadie, usted sabe lo difícil que fue el trayecto, nos tocó aprender muchas cosas, buenas como malas, de verdad le agradezco el apoyo y la confianza, nuevamente podemos decir, una tesis más, gracias por todo. Dra. Lety; que le puedo decir, agradezco de verdad todo el apoyo que me ha dado, tanto personal como profesional, le agradezco por todas esas charlas, de verdad no sabe todo lo que me quedo de ellas, por escucharme y enseñarme, le agradezco la paciencia y las palabras de aliento, siempre estaré agradecida por recibirme con los brazos abiertos, por enseñare que no solo somos científicos, sino humanos. A mis asesores, la Dra. Rosaura Hernández Rivas y al Dr. Nicolás Villegas, por todo su conocimiento aportado, por su buena atención, por los consejos dados durante el desarrollo de la tesis y sobre todo su tiempo, gracias por guiarme en mi formación.

A todos mis compañeros de laboratorio, porque la verdad buenas o malas he aprendido de ellos, por las disputas, pero sobre todo por los buenos. Didi, tu sabes que aunque no fue tan cercana nuestra relación durante este recorrido, siempre te agradeceré todo lo que me enseñaste. Manuel, gracias por el apoyo que en su momento recibí, por las palabras y las risas. Luisito, eres todo un personaje, gracias por recordarme nuevamente que no todo son “papers”, pero sobre todo el valor del trabajo en equipo, a la Dra. Cecy, siempre con su increíble humor. Al Dr. Macario, porque no se equivocó nunca cuando me dijo que tenía que prepararme para lo que venía. Al Dr. Julio, al cual no tengo palabras para agradecerle, por su apoyo incondicional tanto en lo profesional como en lo personal, por hacerme reír siempre, por enseñarme tantas cosas, por apoyarme y recibirme desde que entré al Cinvestav, por las palabras de aliento cuando sentía no poder más, por hacerme sentir parte del laboratorio, de verdad, muchas gracias. Le doy las gracias a Fredy, Gio, Vero y a la Dra. Ruiz, por apoyarme recién entre al laboratorio, por esos pequeños ratos de diversión, las bromas y el apoyo con mi proyecto, pero sobre todo a la Dra. Ruíz, que

no solo fue mi compañera de laboratorio, sino mi compañera en este largo camino de la maestría, porque si había alguien que me podía entender como me sentía en esos peores momentos de frustración, era ella, porque aprendimos a sonreír aun cuando todo era horrible, también quiero decirle que agradezco su compañía y las charlas tan entretenidas y sobre todo quiero decirle que agradezco y me da orgullo decir que logramos terminar lo que empezamos como equipo. También quiero agradecer a Dianita (Tumorsin), por todo lo que aprendimos el tiempo juntas en la maestría, y lo que seguimos aprendiendo, por darme la confianza sin conocerme, y por apoyarme con palabras de aliento cuando las necesitaba, por enseñarme el valor de la amistad y el coraje de luchar por tus metas, por compartir tantas comidas conmigo y ser mi amiga. A Víctor, un gran compañero y del cual aprendí muchas cosas, gracias por el apoyo, y me alegra, haber compartido el trayecto desde el inicio y ver todo lo que crecimos en esta travesía llamada maestría

Pero en especial y sobre todas las cosas, quiero agradecer a mi familia, de quién me siento orgullosa y agradecida infinitamente: Alfredo, Margarita, Cintia y Cesar. A ellos les dedico esta tesis y todos mis logros, porque gracias a ellos son quién soy y he llegado hasta donde estoy, gracias de verdad por darme las palabras precisas cuando las necesitaba, gracias por aguantar mis desplantes en esos momentos tan difíciles, gracias por enseñarme el valor del trabajo, la responsabilidad y la dedicación, gracias porque aun sabiendo que la trayectoria que he decidido tomar me llevara mucho tiempo, han decidido emprenderla conmigo, gracias por apoyarme siempre que los necesitó, no tengo palabras para agradecerles todo el apoyo, pero sobre todo su amor, gracias por impulsar todos mis sueños y enseñarme a trabajar duro, valorar las cosas y a las personas; a creer en mí y darme ánimos cuando sentía que ya no podía con la frustración. Gracias por siempre escucharme y estar para mí, por enseñarme día a día con el ejemplo. Sabemos que ha sido difícil, y que hemos tenido muchos tropiezos, pero juntos hemos logrado salir adelante, de nuevo gracias por todo.

Finalmente quiero agradecer a mi abuelita Hilda, mi segunda mamá, gracias por estar conmigo desde chica y enseñarme el valor de la vida y el amor de una abuelita, recuerda mucho que te quiero y escribo esto para que si un día olvidas lo agradecida que estoy contigo y cuanto te quiero, lo puedas leer y lo recuerdes. A mi tía Lulú y mis primos Pepé y Natalia, por enseñarme el valor del esfuerzo, el ímpetu y sobre todo la honestidad, gracias a ustedes, porque cuando más lo hemos necesita han estado para nosotros sin dudar, gracias por ser mi familia y por todo lo que a la fecha me siguen enseñando.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Características generales del VSR .....	2
1.2 Genoma viral .....	3
1.3 Características funcionales y estructurales de las proteínas del VSR .....	5
1.3.1 Glicoproteína (G) .....	5
1.3.2 Proteína de fusión (F) .....	6
1.3.3 Fosfoproteína (P).....	7
1.3.4 Proteína SH .....	8
1.3.5 Proteína Matriz (M).....	9
1.3.6 Nucleoproteína (N) .....	10
1.3.7 Polimerasa viral o proteína L .....	10
1.3.8 Proteína M2 (M2-1/ M2-2) .....	11
1.3.9 Proteínas No estructurales: NS1 y NS2.....	12
1.4 Ciclo de replicación viral .....	13
1.5 Papel de los lípidos en el ciclo de infección viral.....	17
1.6 Gotas lipídicas (GL).....	20
1.7 Proteínas de las gotas lipídicas .....	21
1.8 Función de las gotas lipídicas en la célula.....	21
1.9 Biogénesis y regulación de las gotas lipídicas .....	23
1.9.1 Paso 1. Síntesis de triacilglicerol dentro del REL.....	24
1.9.2 Paso 2. Formación de “oil lens” en la membrana del retículo endoplásmico .....	24
1.9.3 Paso 3. Gemación y formación de gotas lipídicas nacientes .....	24
1.9.4 Paso 4. Crecimiento y expansión de las gotas lipídicas .....	25
2. ANTECEDENTES DIRECTOS .....	26
3. JUSTIFICACIÓN .....	29

4. HIPÓTESIS .....	30
5. OBJETIVOS .....	30
5.1 Objetivo general: .....	30
5.2 Objetivos particulares: .....	30
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	31
7. METODOLOGÍA .....	32
7.1 Material biológico .....	32
7.2 Propagación celular .....	32
7.3 Producción de un “stock” viral del VSR .....	33
7.4 Titulación del abasto viral .....	34
7.5 Análisis de la expresión y distribución celular de FASN durante la infección con VSR .....	35
7.6 Cinética de infección de células A549 con el VSR .....	36
7.7 Detección de antígenos virales y localización subcelular de proteínas asociadas a gotas lipídicas (PLIN-2), así como lípidos neutros en células A549 infectadas con VSR .....	37
7.8 Viabilidad celular por el método colorimétrico de MTT .....	38
7.9 Determinación del efecto que produce el estímulo de las gotas lipídicas en la infección con VSR .....	38
8. RESULTADOS .....	40
8.1 Efecto de la infección por VSR en la enzima FASN en células HEp-2 .....	40
8.2 Efecto de la infección por VSR en las GL .....	40
8.3 Efecto del estímulo de las GL con Ácido oleico (A.O.) sobre la infección del VSR en células A549 .....	46
9. DISCUSIÓN .....	50
10. CONCLUSIONES .....	56
11. PROSPECTIVAS .....	56
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57



## **ABREVIATURAS**

VSR: Virus Sincitial Respiratorio.

FASN: Sintasa de ácidos grasos.

GL: Gotas lipídicas.

PLIN-2: Perilipina 2

PFU: Unidades Formadoras de Placas

HMGCR: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa.

MOCK: Virus inactivado por calor.

MOI: Multiplicidad de Infección.

A.O.: Ácido oleico.

RE: Retículo endoplásmico

BODIPY: 4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene.

TAG: Triacilgliceroles.

SE: Esteres de esteroles.

ACC: Acetil CoA carboxilasa.

SREBP1c: Factor de transcripción que se une a elementos regulatorios del DNA relacionados al esteroles 1.

REL: Retículo endoplásmico liso.

IB's: Cuerpos de inclusión.

dsRNA: Ácido Ribonucleico de doble cadena

ORF: Marco de lectura abierta

WAT: Tejido adiposo blanco

BAT: Tejido adiposo pardo

ADRP: Proteína relacionada con la diferenciación de adipocitos.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Representación esquemática de la estructura filamentososa del VSR.	3
2	Estructura y organización del genoma del VSR.	4
3	Esquema general del ciclo prototipo del Virus sincitial respiratorio.	16
4	Papel de los lípidos celulares durante la infección viral.	19
5	Características estructurales y funcionales de las gotas lipídicas.	23
6	Biogénesis de las GL.	25
7	El VSR modula la fosforilación de AMPK.	27
8	Esquema general de trabajo.	31
9	El RSV promueve un aumento de FASN en las células HEp-2.	42
10	VSR induce una disminución de las GL en células A549.	43
11	VSR induce una disminución de las GL en células A549.	44
12	Patrón de distribución de PLIN-2 en células A549 infectadas con VSR.	45
13	El área de las gotas de lipídicas disminuye en células infectadas con VSR.	46
14	Estímulo de células A549 con ácido oleico.	47
15	El tratamiento con ácido oleico incrementa el tamaño y número de GL.	48
16	Estímulo de las GL promueve un incremento en la infección del VSR.	49

---

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Características básicas de las proteínas presentes en las GL.	22
2	Líneas celulares empleadas en la evaluación del papel de las GL en la infección con VSR.	32
3	Medios de cultivo para el mantenimiento de las líneas celulares empleadas.	33

---

## RESUMEN

El Virus Sincitial Respiratorio es un patógeno respiratorio importante a nivel mundial causante de infecciones respiratorias agudas durante la infancia, siendo la causa más común de bronquiolitis y neumonía viral en infantes. Por lo cual, generar información acerca de los mecanismos de infección viral se vuelve necesario. Y es por ello que en los últimos años han tomado una gran importancia los lípidos celulares y el metabolismo lipídico en las infecciones virales, incluyendo al VSR. En ese sentido, se ha observado que la infección puede modular el metabolismo lipídico y vías de señalización involucradas en lipogénesis. Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido si enzimas lipogénicas como FASN, y las GL, organelos celulares de almacenaje lipídico; de los cuales recientemente se demostró son importantes en infecciones virales y podrían tener un papel en el ciclo de infección del VSR. Por ello, evaluamos la expresión de FASN en células HEp-2 infectadas con VSR y tratadas con el virus inactivado por calor (Mock). Encontrando que durante la infección, la expresión de FASN se ve incrementada y co-localiza con Nucleorpteína en los cuerpos de inclusión. Así mismo, encontramos que en células A549 infectadas con VSR, se produce una disminución en los organelos de almacenaje lipídico (GL) tanto en número como en intensidad empleando un colorante de lípidos neutros (BODIPY). Adicional a ello evaluamos por inmunofluorescencia (PLIN-2), una proteína conocida como marcador de GL, la cual mostró un sutil cambio en el patrón de distribución en las células infectadas. Finalmente, como un dato preliminar, utilizando un fármaco estimulador de gotas lipídicas (ácido oleico 0.2 mM) evaluamos el posible impacto durante la infección con VSR en células A549. Encontrando una tendencia al incremento en el porcentaje de infección en las células tratadas, permitiéndonos así sugerir que las GL juegan un papel en la infección por VSR, posiblemente a través de la liberación de ácidos grasos de las GL's, para incrementar la tasa de oxidación y producir más energía. Todo esto abre nuevas oportunidades al entendimiento de los mecanismos virales y con ello el desarrollo de estrategias que nos permitan abordar la problemática de la infección por VSR en la población más susceptible.

## **ABSTRACT**

Respiratory Syncytial Virus is an important respiratory pathogen worldwide that causes acute respiratory infections during childhood, being the most common cause of bronchiolitis and viral pneumonia in infants. Therefore, generate information about the mechanisms of infection becomes necessary. And that is why in recent years cellular lipids and lipid metabolism have taken on great importance in viral infections, including RSV. In that sense, it has been observed that the infection can modulate the lipid metabolism and signaling pathways involved in lipogenesis. However, until now it has not been established whether lipogenic enzymes such as FASN, and GL, cellular organelles of lipid storage; of which recently proved to be important in viral infections could play a role in the RSV infection cycle. We evaluated the expression of FASN in HEp-2 cells infected with RSV and treated with the heat-inactivated virus (Mock). Finding that during infection the expression of FASN is increased and co-localized with Nucleorpehine in the IBs. Likewise, we found that in A549 cells infected with RSV, there is a decrease in the lipid storage organelles (GL) both in number and intensity using a neutral lipid dye (BODIPY). In addition, we evaluated by immunofluorescence (PLIN-2), a protein known as GL marker, which showed a subtle change in the pattern of distribution in infected cells. Finally, as a preliminary data, using a lipid droplet stimulating drug (0.2mM oleic acid) we evaluated the possible impact on RSV infection in A549 cells. He found a tendency to increase the percentage of infection in treated cells, allowing us to suggest that GL play a role in RSV infection, possibly through the release of fatty acids from GLs, to increase the rate of infection. oxidation and produce more energy. All this opens new opportunities to the understanding of viral mechanisms and with it the development of strategies that allow us to address the problem of RSV infection in the most susceptible population.

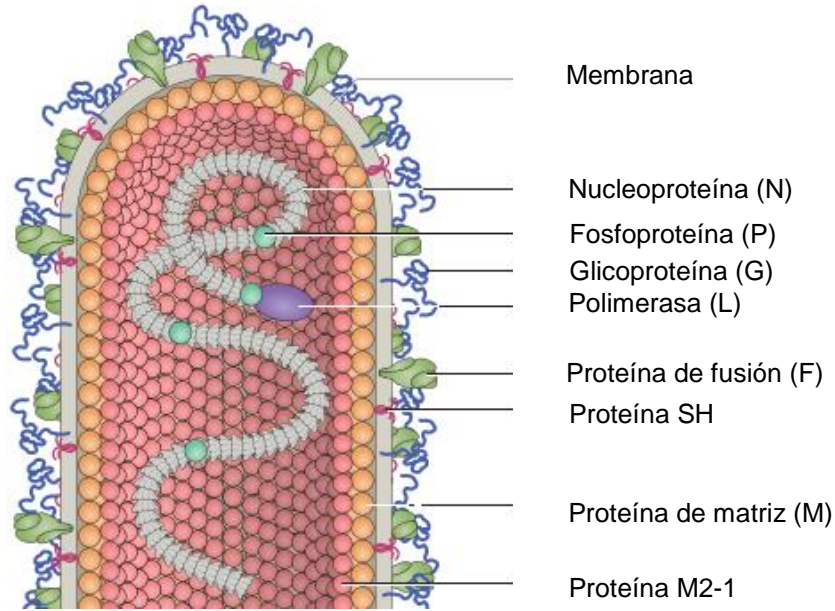
## **1. INTRODUCCIÓN**

El Virus Sincitial Respiratorio (VSR) es un virus envuelto de RNA de una sola cadena de polaridad negativa no segmentado, clasificado en la familia *Pneumoviridae* (Walsh, 2016, Rima *et al.*, 2016). Este virus es frecuentemente identificado como la causa más importante de enfermedades respiratorias agudas en pacientes de todas las edades, pero afecta de manera importante a la población infantil, la más vulnerable por la infección durante los primeros años de vida (Wong, 2013), teniendo una importante incidencia en neonatos y niños menores de seis años afectando principalmente el tracto respiratorio inferior (LRTI's) (Arroyo *et al.*, 2017) causando afecciones como epiglotitis, laringitis, laringotraqueobronquitis (crup), bronquitis, bronquiolitis y neumonía principalmente (Matano *et al.*, 2017). Este virus es uno de los principales causantes de hospitalización durante los primeros años de vida (Rossi & Colin, 2015, Ohrum *et al.*, 2017) y un patógeno relevante en pacientes inmunodeficientes. Globalmente, las cifras estimadas de mortalidad por VSR suelen ser nueve veces mayor que para influenza (Rodríguez *et al.*, 2017); con aproximadamente 60% de las infecciones respiratorias agudas en niños menores de 5 años (Piedimonte & Pérez, 2014), causando un impacto económico significativo en los sistemas de salud pública. (Griffiths *et al.*, 2016). En cuanto a las características epidemiológicas de la infección por VSR en México, se ha descrito actualmente, que VSR es el segundo agente viral más importante después de Rinovirus, particularmente en el grupo comprendido por niños menores de 9 años (Matano *et al.*, 2017).

## **1.1 Características generales del VSR**

De acuerdo a la actualización de la clasificación taxonómica aprobada por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), El VSR pertenece al Orden *Mononegavirales*, Familia *Pneumoviridae*, Género *Orthopneumovirus*, Especie, Virus Sincitial Respiratorio Humano, para el cual se ha descrito la existencia de dos grupos antigénicos, A y B basado en la variabilidad de la glicoproteína G (Schobel *et al.*, 2016, Rima *et al.*, 2017).

El VSR es un virus que presenta una envoltura lipídica rica en colesterol derivada de las *“lipid rafts”* de la membrana plasmática (PM) de la célula huésped (Chang *et al.*, 2012), que durante la salida puede adquirir formas y tamaños variables, siendo las más representativas las formas esférica y/o filamentosa, está última es la más abundante y considerada como infectiva (Ke *et al.*, 2018). Las partículas filamentosas tienen un tamaño promedio entre 70-190 nm de diámetro y 0.5-12  $\mu$ m de longitud, mientras que la partícula esférica tiene un tamaño aproximado de 80-140 nm de diámetro (URL 1, Ke *et al.*, 2018, Liljeroos *et al.*, 2013), La envoltura viral contiene tres glicoproteínas virales; i) la proteína de anclaje (G), ii) la proteína de fusión (F) y iii) una proteína pequeña hidrofóbica (SH), que se comporta como una viroporina con actividad de canal iónico dependiente de pH (Gan *et al.*, 2012). La organización de estas proteínas genera estructuras en forma de espículas de un tamaño de entre 11-20 nm. Adicionalmente, la nucleocápside es una hélice simétrica en la que el genoma viral se encuentra asociado a la nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) y la polimerasa viral (L), que es una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), las cuales en conjunto forman el complejo de la ribonucleoproteína (RNP). Yuxtapuesta a la envoltura viral, el virus contiene una cubierta proteica formada por la proteína de matriz (M), la cual parece no ser requerida para iniciar la gemación de la partícula viral; así mismo interactúa con el factor anti-terminador de la transcripción la proteína (M2-1), facilitando la interacción entre M2-1 y el complejo RNP a través de N (Fig. 1) (Adarme & Castellanos, 2013, Liljeroos *et al.*, 2013).



**Figura 1. Representación esquemática de la estructura filamentosa del VSR.** La partícula viral madura se encuentra formada por una envoltura viral que contiene tres proteínas transmembranales; la proteína de anclaje (G), la proteína de fusión (F) y la proteína (SH) que actúa como viroporina. Adosada a la membrana viral, se encuentra la proteína de matriz (M), la cual le otorga la forma filamentosa al virión y que interactúa con la proteína M2-1, así como con la nucleoproteína (N), la cual rodea al genoma viral, que contiene 10 genes que codifican 11 proteínas, M2, que codifica las 2 proteínas M2-1 y M2-2 y también se asocia con la polimerasa viral (L) y el cofactor de la polimerasa (P) (Modificada de Battles & McLellan, 2019).

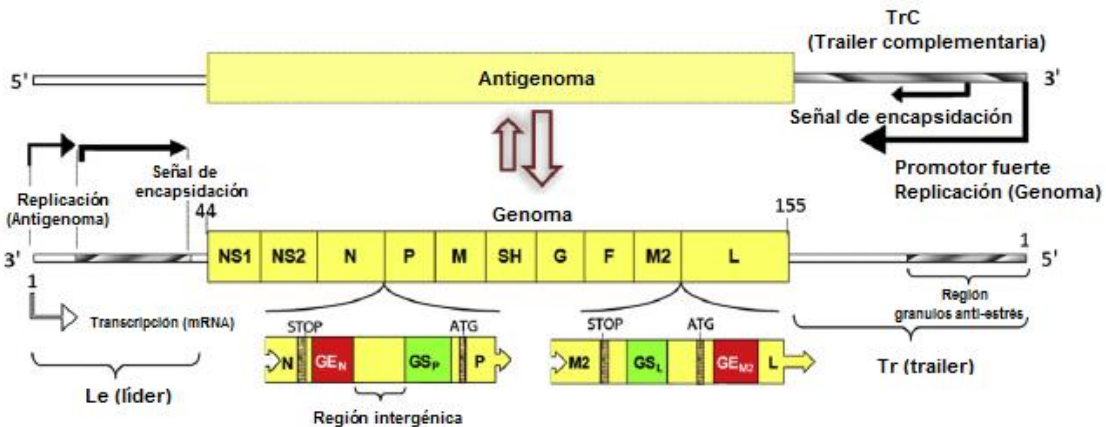
## 1.2 Genoma viral

El genoma del VSR está constituido por una molécula de RNA de una sola cadena de polaridad negativa (3'-5') no segmentada, con un tamaño promedio de 1522 nucleótidos (nt) (15.2 kb) que codifica para 10 genes, los cuales se distribuyen en el orden 3' NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L 5' (Fig. 2). Cada gen da origen un RNA mensajeros (mRNA) independiente que contiene señales de inicio y termino altamente conservadas conocidas como Inicio del gen (GS) y fin del gen (GE), que contienen 9 nt y 12-14 nt respectivamente, en este ultimo los 4-7 nt finales son uracilos (U) necesarios para la poliadenilación e inducen la modificación 5-metil guanosina (CAP) en el extremo 5' (López & Ramírez, 2013, Collins *et al.*, 2013). Los primeros 8 genes (NS1-F) están separados por regiones intergenicas que carecen de secuencias consenso; y que pueden variar en tamaño 1-58 nt según las cepas, en donde aparentemente el primer nt es importante para la terminación



del mRNA. Los dos últimos genes, M2 y L presentan un arreglo particular de las señales GS y GE, ya que la señal GS de L se superpone con la señal GE de M2 en 68 nt río abajo de la señal GE de M2, aunado a ello la expresión de las proteínas M2-1 y M2-2 derivan del mismo gen (M2), en donde una vez traducida M2-1, después de la terminación, el ribosoma se mueve hacia atrás para iniciar la traducción de la proteína M2-2 en un codón de inicio que se superpone al ORF de M2-1 (Lay *et al.*, 2013, Collins *et al.*, 2013, López & Ramírez, 2013)

Debido a que el genoma del VSR es de sentido negativo, la replicación del RNA involucra una copia complementaria del genoma llamada “antigenoma” que requiere para su síntesis regiones reguladoras que permitan dichos eventos. La región conocida como líder (Le) en el extremo 3’ del genoma viral, está constituida de 44 nt que preceden al gen NS1, la cual contiene regiones reguladoras de la replicación y la transcripción ubicados en los primeros 24-26 nt (Fig. 2). Otra región importante del genoma es el extremo 5’ del genoma; que consta de 155 nt inmediatamente después del gen L; contiene la región extragénica conocida como tráiler (Tr), que es importante para el inicio de la síntesis de RNA, ya que su región complementaria (TrC) se encuentra en el extremo 3’ del antígeno y contiene el promotor que dirige la síntesis de nuevos genomas (Lay *et al.*, 2013, Collins *et al.*, 2013)



**Figura 2. Estructura y organización del genoma del VSR.** El genoma del VSR consiste en una molécula de RNA monocatenario 3’-5’ que contiene una región líder 3’ (Le) que garantiza la replicación del antigenoma y la transcripción del mRNA. La región tráiler (Tr) 5’ codifica para un elemento que altera la formación de gránulos de tensión en la célula huésped. La producción de antigenomas utiliza el genoma completo como plantilla y está regulada por la región Le. El antigenoma se copia del RNA empleando la actividad promotora de la región complementaria del tráiler (TrC), que probablemente contiene una señal de encapsidación para la asociación de la nucleoproteína con el genoma nascente. Los genes virales están separados por señales de inicio de gen (GS) y de fin de gen (GE) que ordenan la producción de mRNA monocistrónicos. La disposición de los genes virales es similar a la de la unión del gen N-P. Sin embargo, la unión del gen M2-L contiene una disposición particular de señales GS y GE y la expresión de las proteínas M2-1 y M2-2, derivadas del gen M2 (Modificado de Collins *et al.*, 2013)

### **1.3 Características funcionales y estructurales de las proteínas del VSR**

El genoma del VSR codifica para 11 proteínas independientes, a diferencia de otros miembros de la misma familia *Pneumoviridae* (López & Ramírez, 2013). De las 11 proteínas, 8 son estructurales (Glicoproteína; G, Proteína de fusión; F, Fosfoproteína; P, Proteína SH, Proteína de Matriz; M, Nucleoproteína; N, Polimerasa viral; L, Proteína M2-1), y 3 no estructurales (NS1, NS2 y M2-2) (Collins *et al.*, 2013).

#### **1.3.1 Glicoproteína (G)**

El mapeo antigénico usando anticuerpos monoclonales, ha permitido la clasificación de los subtipos en dos grandes grupos A y B con base en la variabilidad de la secuencia de la proteína G (McLellan *et al.*, 2013, Collins *et al.*, 2013, López & Ramírez, 2013, Battles & McLellan, 2019). Ésta es una glicoproteína que varía en su peso dependiendo del tipo celular en el que es expresada 80-100 kDa en líneas celulares inmortalizadas (Beato *et al.*, 1996) y 180 kDa en cultivos primarios de células alveolares (HAE), esta proteína está constituida por 289-299 aminoácidos dependiendo de la cepa, además de estar palmitoilada; es responsable de la unión del virus al receptor celular en las primeras etapas del ciclo infectivo (McLellan *et al.*, 2013). La proteína G, es una proteína transmembranal tipo II, que posee una secuencia de localización membranar en la región amino terminal. En el retículo endoplásmico (ER), la proteína G se produce en dos formas: un polipéptido anclado a membrana (G<sub>m</sub>) y un polipéptido secretado soluble (G<sub>s</sub>), el cual se origina de un precursor que se modifica co-traduccionalmente mediante la adición de O-glicosilaciones para producir la forma madura de la proteína G del VSR (G<sub>m</sub>), mientras que la forma soluble de la proteína G retiene otras características estructurales de la forma asociada a la membrana aunque las funciones biológicas de la G<sub>s</sub> en el ciclo viral es desconocida. Se ha visto que la proteína G<sub>s</sub> y la proteína F inducen una fuerte

respuesta inmune Th2, permitiéndole participar en la evasión de la respuesta inmune del huésped (Openshaw, 2017).

### **1.3.2 Proteína de fusión (F)**

La proteína F, es una glicoproteína integral de membrana tipo I de aproximadamente 70 kDa con 574 aminoácidos, estructuralmente es muy similar a la proteína F de otros miembros de la familia *Pneumoviridae* y junto con la proteína G son los antígenos virales que inducen una respuesta de anticuerpos neutralizantes (Chang & Dutch, 2012).

La proteína F representa un factor crítico en la infección y patogenia de los miembros que conforman la familia *Pneumoviridae* y se sintetiza como un precursor inactivo en el retículo endoplásmico conocido como F<sub>0</sub>, esta proteína es modificada post-traduccionalmente con 5-6 glicosilaciones en el extremo amino. Para tener actividad biológica la proteína F debe escindir-se por una enzima de tipo furina, generando dos subunidades F1 y F2, que permanecen unidas por puentes disulfuro y que tienen la capacidad de oligómerizar (trímero o tetrámero) en la superficie del virión (Mclellan *et al.*, 2013). Después de la escisión, del dominio F2, este es modificado a través de N-glicosilaciones.

La proteína F tiene la función de inducir la fusión (independiente de pH) de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula huésped, atravesando por una serie de re-arreglos conformacionales, pasando por un estado de pre-fusión, he-mifusión y finalmente un estado de post-fusión (Mclellan *et al.*, 2013, Chang & Dutch, 2012) una vez que contacta con la célula huésped a través de su interacción con receptores celulares como Nucleolina, ICAM-1, EGFR y TLR-4 en la membrana de la célula huésped (Mastrangelo & Hegele, 2013).

Adicionalmente participa en la fusión entre las células infectadas, provocando la formación de sincitios; los cuales permiten la propagación directa del virus célula-célula (López & Ramírez, 2013). Dado que junto con G es uno de los principales

antígenos, F es examinada como antígeno vacunal, siendo el blanco de anticuerpos usado para profilaxis pasiva así como blanco de (McLellan *et al.*, 2013).

### **1.3.3 Fosfoproteína (P)**

La fosfoproteína o proteína P del VSR, es una proteína de 241 aminoácidos, altamente fosforilada en diferentes residuos de Serina (López & Ramírez, 2013); y funciona como un cofactor importante de la polimerasa viral junto con la nucleoproteína (Lu *et al.*, 2002). La proteína P se asocia como un homotetrámero que interactúa con otras proteínas virales como N, L y M2-1 (Blondot *et al.*, 2012).

La fosfoproteína funciona como chaperona de la proteína N, ya que promueve que esta se mantenga en su forma soluble y disponible para la síntesis de RNA viral, el ensamblaje y asegurar el ensamble correcto de la nucleocápside y el suministro de la proteína N a la cadena viral creciente de RNA durante la replicación del genoma (Collins *et al.*, 2013, Lu *et al.*, 2002). La liberación del promotor y el alargamiento de la cadena de RNA por la polimerasa viral L durante la transcripción parece ser dependiente de la proteína P, ya que la interacción de la proteína P y L estabiliza el complejo de polimerasa (Lu *et al.*, 2002). Mientras que el extremo amino terminal de la proteína L está unido a la proteína P, el extremo carboxilo de la proteína P interactúa con el extremo carboxilo de la proteína N para abrir la estructura de la nucleocápside con el fin de permitir la interacción de la proteína L con el RNA viral (Galloux *et al.*, 2015). Incluso la proteína P actúa como un adaptador que se une a la proteína M2-1, y ayuda a disociar a la proteína M de la nucleocápside al inicio de la infección (Collins *et al.*, 2013). Su expresión junto con N es suficiente para originar los cuerpos de inclusión virales (IB's), estructuras densas citoplásmicas que participan en la síntesis de RNA viral (Collins *et al.*, 2013, García *et al.*, 1993).

### **1.3.4 Proteína SH**

La proteína pequeña hidrófoba (SH) del VSR es una glicoproteína transmembranal tipo II, de 64 o 65 aminoácidos (VSR A, VSR B respectivamente) (Gan *et al.*, 2012). Esta proteína se acumula en las células infectadas en cuatro formas diferentes (SH0, SHt, SHg y SHp); SH0, representa la forma cuya traducción inicia en el primer codón dentro del ORF y SHt da inicio su traducción en el segundo codón del mismo ORF. Las formas SHg y SHp son formas provenientes de SH0, pero presentan N-glicosilación y la forma SHp adicionalmente presenta una modificación post-traducciona de polilactosaminoglican unido al azúcar (Collins & Mottet, 2019). La proteína SH participa junto con las glicoproteínas F y G en la formación de sincitios en las células infectadas. Se ha descrito que la proteína SH, forma estructuras homooligómeras similares a poros que poseen una función similar a un canal iónico (Gan *et al.*, 2012). Curiosamente, la proteína SH comparte similitud estructural con un grupo de proteínas conocidas como viroporinas, las cuales son una clase de proteínas hidrofóbicas que se insertan en la membrana celular del huésped e inducen cambios en la permeabilidad a iones y moléculas pequeñas, también participa junto con las glicoproteínas F y G en la formación de sincitios de células infectadas, así como en la modulación de la respuesta inmune del huésped y en la liberación de partículas virales infecciosas de la membrana (Gan *et al.*, 2012). Se ha reportado que la proteína SH del VSR, es una proteína involucrada en la evasión de la respuesta inmune como su homóloga en el virus de la Parainfluenza 5 (PIV5), regulando la apoptosis en las células infectadas y la inhibición de la expresión y señalización del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ). Esta proteína se acumula en “*lipid rafts*” y dentro del Aparato de Golgi, donde se favorece el transporte por la vía secretoria hacia la membrana citoplasmática y la maduración del virión (Brown *et al.*, 2004).

### **1.3.5 Proteína Matriz (M)**

La proteína M está constituida por 256 aminoácidos y juega un papel clave en la morfogénesis del virión. Es un monómero no glicosilado (Collins *et al.*, 2013) con carga positiva, que puede mediar la interacción electrostática con la membrana plasmática de la célula huésped y con la nucleocápside viral que se localiza en la cara interna de la envoltura viral. Al inicio de la infección, la proteína M es translocada al núcleo de la célula infectada y puede ser responsable de una inhibición moderada de la transcripción de la célula huésped durante el proceso de infección. Posteriormente, la proteína M se acumula en la membrana plasmática, e interactúa con la proteína F y otros factores durante la morfogénesis de la partícula viral, siendo esencial en su formación. Diversos estudios han descrito que la proteína M puede ser detectada en IB's, durante la infección tardía en asociación con las proteínas N, P y M2-1. Siendo todo lo anterior indicativo de que la proteína M es esencial para el ensamblaje eficaz del virus y la salida a través de la unión de las nucleocápsides citoplásmicas con las proteínas de la envoltura del VSR en la membrana plasmática (López & Ramírez, 2013); pero no es necesaria para iniciar la formación de filamentos virales (se cree que es el precursor de virus infeccioso), pero en ausencia de ella, los viriones permanecen inmaduros al encontrarse alterada la distribución de las proteínas virales en la partícula filamentosa (Mitra *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha definido que la proteína M se encuentra asociada a los IB's y a la membrana plasmática en etapas posteriores a la transcripción viral. (Ghiyal *et al.*, 2008). Además, análisis cristalográficos evidenciaron que los residuos cargados positivamente en las regiones amino terminal de la proteína M interactúan con los fosfolípidos de los IB's (Shaikh & Jr, 2013).

### **1.3.6 Nucleoproteína (N)**

Esta proteína tiene un peso aproximado de 43 kDa y está constituida por 391 aminoácidos; es un componente principal de la nucleocapside viral, participa en la replicación viral, en la encapsidación del RNA genómico, se asocia con las proteínas P-L durante la transcripción y replicación del genoma viral; y se piensa que interactúa con la proteína M durante el ensamblaje del virus (López & Ramírez, 2013). El molde utilizado por la proteína L durante la síntesis de RNA es un complejo de RNA genómico y antigenómico vírico fuertemente unido por proteínas N. Recientemente se identificó por cristalografía, que la nucleoproteína tiene una estructura en forma de anillo decamérico, que presenta una larga horquilla  $\beta$  que se proyecta lejos del núcleo decamérico y que puede servir como un sitio de contacto con la polimerasa viral L (Bakker *et al.*, 2013). Además, se demostró que el extremo carboxilo (C) y amino (N) se extienden por encima del plano del anillo y puede servir como el sitio de interacción con la proteína P durante la síntesis de RNA (Tawar *et al.*, 2009). La proteína N también juega un papel importante en la inmunidad innata, ya que se une a la proteína quinasa PKR la cual es regulada por el RNA de doble cadena (dsRNA) inhibiendo la fosforilación del factor de iniciación de la traducción (EIF-2A) y por consiguiente la inhibición de la síntesis de proteínas del hospedero (Collins *et al.*, 2013).

### **1.3.7 Polimerasa viral o proteína L**

La polimerasa viral (L), es una proteína de 2165 aminoácidos con un peso molecular de 250-226 kDa conservada respecto a otros virus del orden Mononegavirales, la proteína L es relativamente hidrofóbica, con un gran contenido de leucina (Leu) e isoleucina (Ile). Junto con las proteínas P y N forma el complejo requerido para la actividad de polimerasa. Es la menos abundante de las proteínas estructurales. La proteína L sirve como RNA polimerasa dependiente de RNA viral y lleva a cabo la síntesis del RNA. También realiza el “*capping*” de



mRNA en el extremo 5' y la poliadenilación en el extremo 3' (López & Ramírez, 2013). En el análisis de mutantes del VSR, se han identificado regiones funcionales en la proteína L, que incluye al dominio de unión a nucleótidos con actividad de cinasa de nucleótidos di-fosfato (Collins *et al.*, 2013).

### **1.3.8 Proteína M2 (M2-1/ M2-2)**

Previamente se describió que el genoma del VSR codifica para 10 mRNA independientes a excepción del gen M2, el cual contiene 2 marcos de lectura abierta (ORF) que se solapan en 32 nucleótidos (nt). El producto del primer marco de lectura da lugar a una proteína denominada M2-1 (ORF-1). Y el segundo marco, codifica para una proteína denominada M2-2 (ORF-2), que se ha encontrado en los extractos de las células infectadas (Cheng *et al.*, 2005). La proteína M2-1 es un homotetrámero antiterminador de la transcripción, esencial para la viabilidad del virus. La proteína M2-1 está formada por 194 aminoácidos y funciona como un factor de elongación de la transcripción para el complejo de polimerasa viral con motivos de dedos de Zinc, esencial para su actividad en la síntesis viral (Cheng *et al.*, 2005, Collins *et al.*, 2013). Se ha demostrado que se une a la proteína P y al RNA viral de una manera competitiva, lo que sugiere que la proteína P interactúa con la proteína M2-1 soluble y promueve su unión al molde de RNA. M2-1 incluso se une a la proteína M para trasladarla a los cuerpos de inclusión (Collins *et al.*, 2013). Incluso media la asociación entre el complejo RNP a través de N con la proteína M (Battles & Mclellan, 2019). La proteína M2-2, es una pequeña proteína de 11 KDa, que puede presentar 2 formas con un tamaño diferente ya que puede contener 88 o 90 aminoácidos, esto dependerá del sitio de inicio de la transcripción del ORF-2, ya que se ha determinado que este proceso tiene una baja regulación. Se ha sugerido que M2-2 juega un papel en la regulación de la síntesis de RNA; específicamente reduce la transcripción y promueve la replicación del RNA, ya que actúa como un factor regulador de la



transcripción que puede mediar un “cambio” en el equilibrio, entre la replicación y la transcripción del RNA (Cheng *et al.*, 2005).

### **1.3.9 Proteínas No estructurales: NS1 y NS2**

Se consideran no estructurales porque no se han encontrado en viriones maduros. Las proteínas no estructurales NS1 y NS2 del VSR, son únicas de este virus, y no se ha demostrado homología en su estructura primaria con ninguna otra proteína conocida (Preteel *et al.*, 2013). NS1 de 139 kDa, y NS2 de 124 kDa. Para ambas proteínas han sido reportadas múltiples funciones. Sin embargo principalmente se ha descrito su participación en mecanismos de evasión de la inmunidad innata, tales como: disminución de la expresión de interferones (IFNs) tipo I, preferentemente interferón alfa y beta (IFN- $\alpha/\beta$ ) (Valdés, 2013, Esteban, 2014), disminución de los niveles de TRAF3, un importante transductor de señal en la vía de inducción del gen de IFN de tipo 1, e IKK $\epsilon$ , una proteína quinasa que específicamente fosforila y activa el factor de regulación 3 del IFN (IRF3). Se ha descrito que la proteína NS2, interactúa con la proteína RIG-I y antagoniza la activación del promotor del gen de IFN, resultando en la inhibición de la transcripción de genes de IFN de tipo 1. Es importante destacar que la proteína NS2 también es responsable de la ubiquitinación vía proteasoma de STAT2, que sirven como un transductor de señal del receptor IFN- $\alpha / \beta$  activado en la vía JAK / STAT y conduce a la activación transcripcional de elementos reguladores por interferón. Adicionalmente, las proteínas NS de VSR pueden poseer una propiedad anti-apoptótica intrínseca, ya que suprimen la apoptosis mediada por el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) durante la infección temprana, promoviendo así la señal de supervivencia en la célula infectada (Lo *et al.*, 2005, Spann *et al.*, 2005; Ramaswamy *et al.*, 2006). Tales propiedades de las proteínas NS de VSR pueden verse como un mecanismo para aumentar la progenie viral. Recientemente se demostró que la expresión temprana de estas proteínas

umenta la replicación viral, y retrasa la apoptosis en las células infectadas (Viegas, 2011).

#### **1.4 Ciclo de replicación viral**

El ciclo de infección del VSR inicia una vez que las proteínas G y F del virión contactan la superficie apical de las células epiteliales ciliadas de vías respiratorias con las moléculas que actúan como receptores virales (Fig. 3) (Persson *et al.*, 2014, Battles & Mclellan, 2019). Específicamente, el VSR puede infectar uniéndose a receptores celulares tipo Glicosaminoglicanos (GAG's) en la superficie de la célula, incluyendo heparan sulfato (HS) y condroitin sulfato B, a través de un dominio putativo de unión a heparina en la proteína G, que genera una interacción primaria de baja afinidad, incluso se ha descrito que VSR utiliza CX3CR1 como receptor celular en células epiteliales respiratorias humanas (HAE) (Krusat & Streckert, 1997, Tripp *et al.*, 2001, Johnson *et al.*, 2015). Este primer contacto permite que la proteína F se acerque a la superficie celular y así dirija la fusión de la membrana viral con la celular. Antes de la infección, F existe en una conformación de pre-fusión metaestable que experimenta una serie de cambios conformacionales que producen una estructura de post-fusión de seis hélices que impulsa la fusión de la membrana del virus y de la célula huésped (Battles *et al.*, 2017). Se ha descrito que la fusión es independiente de pH e insensible a la acidificación de lisosomas, sin embargo la evidencia actual considera al sistema de endocitosis como el modelo más aceptado por el cual el VSR entra a la célula aunque no es utilizado de manera muy eficiente (Lay *et al.*, 2013).

Modelos descritos consisten en que F se une a nucleolina, una proteína celular que se encuentra integrada en los microdominios lipídicos ricos en colesterol en la superficie de la célula apical de microvellos y cilios (Chang *et al.*, 2012, Lay *et al.*, 2013), provocando que Pak-1, una serina/treonina cinasa que regula el remodelamiento del citoesqueleto, active la reorganización del citoesqueleto y del

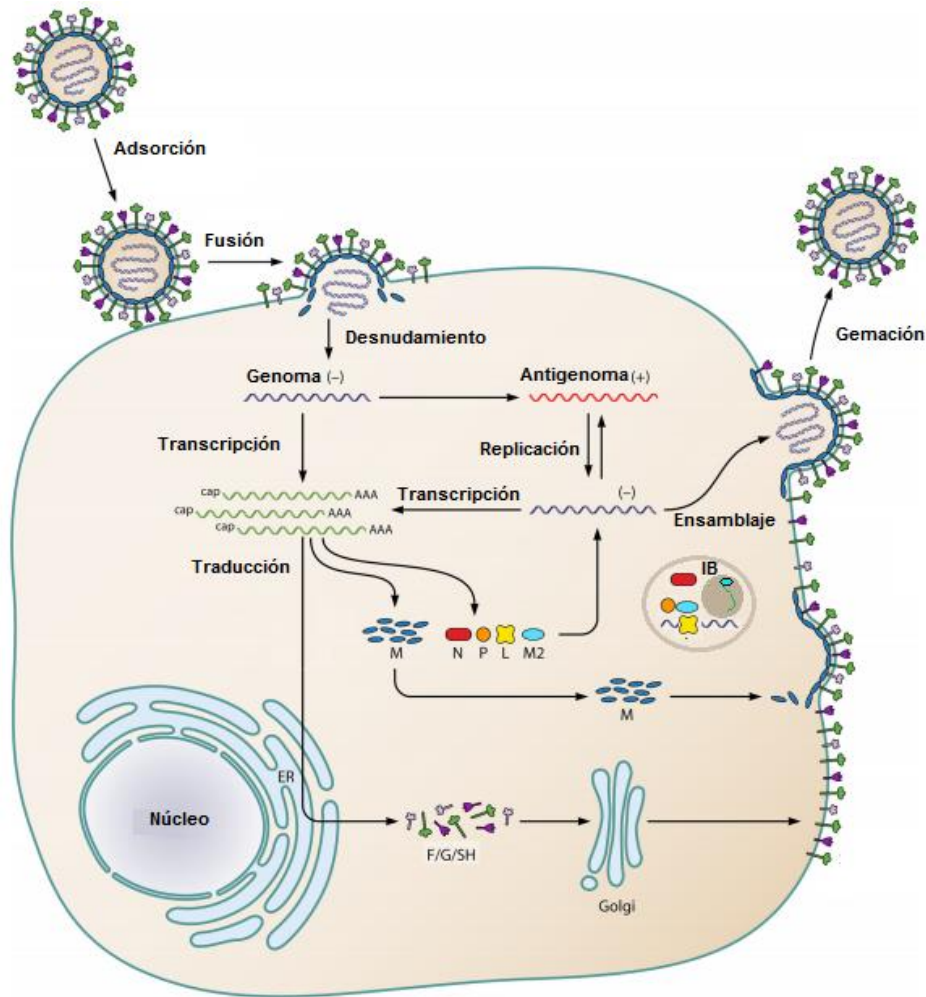
filamento de actina e inicie los eventos de hemifusión de la envoltura del VSR en la membrana plasmática para inyectar el contenido del VSR en el citoplasma, o a través de macropinocitosis seguido por fusión en endosomas lo cual permite entonces la liberación del genoma viral (Krzyzaniak *et al.*, 2013, Vergara *et al.*, 2006, Battles & McLellan, 2019, Lay *et al.*, 2013).

Después de la fusión de la membrana viral con la membrana plasmática de la célula huésped, el complejo de la ribonucleoproteína (RNP) es liberado en el citoplasma de la célula, facilitado por la fosforilación específica de la serina 54 de la fosfoproteína, que directamente interfiere con la interacción del complejo RNP con la proteína de matriz (Battles & McLellan, 2019, Lay *et al.*, 2013). Una vez dentro del citoplasma, el complejo RNP transcribe los genes virales requeridos para la replicación. A tiempos tempranos de la infección se da la síntesis de mRNA viral que incrementa substancialmente en el citoplasma, principalmente en los cuerpos de inclusión (IB's), estructuras altamente dinámicas que forman parte de un sub-compartimento de los gránulos asociados a IB (IBAG's) que juegan un papel importante en los eventos de transcripción, replicación e inclusive traducción, ya que se ha descrito que estos IB's concentran proteínas del complejo RNP, sin embargo excluyen el mRNA viral recién sintetizado y el anti-terminador de transcripción viral M2-1 los cuales se concentran en los IBAG's, en donde son excluidos, el RNA genómico viral, N, L y P. La exclusión de las proteínas N, P y L, así como el ARN genómico viral, de los IBAG's sugiere fuertemente que la transcripción y la replicación viral no tienen lugar en estas estructuras, y lo más probable es que ocurran en otras áreas de los IB (Lay *et al.*, 2013, Rincheval *et al.*, 2017, García *et al.*, 1993). La transcripción inicia cuando el complejo de la polimerasa, fosfoproteína y la proteína L contactan al promotor “Le” del genoma en el extremo 3' permitiendo la transcripción secuencial de los genes virales censando las señales GS y GE que ordenan la producción de mRNA monocistrónicos con la participación 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 (Collins *et al.*, 2013). Una vez que los productos proteicos se acumulan, y dentro de estos el factor regulador M2-2, el complejo de la polimerasa cambia del modo transcripción, al modo de replicación, en donde se ha asociado la liberación de los mRNA virales de los IBAG's como la señal que permite el cambio a modo replicacional (Rincheval *et al.*, 2017). La replicación inicia cuando la proteína L se asocia al extremo 3' del genoma, donde la polimerasa ignora los condones de inicio y fin, produciendo intermediarios replicativos de polaridad positiva de longitud completa del genoma, conocidos como antígenoma. En este evento, la copia antígenómica con orientación positiva, sirve como plantilla para generar el genoma del virión (Noton & Fearn, 2011, Peeples & Collins, 2000). La unión de la proteína N al RNA genómico o antígenómico asiste en el ensamblaje de la nucleocápside, la cual se complementa con la incorporación del resto de las proteínas para producir progenie viral (Vergara *et al.*, 2006, García *et al.*, 1993, Rincheval *et al.*, 2017).

VSR debe coordinar el ensamblaje con las proteínas traducidas en el citoplasma, las glicoproteínas que han sido movilizadas a la superficie celular a través de la vía secretoria son dirigidas a las *“lipid rafts”*, como la proteína F en ausencia de otra proteína viral a través de un motivo codificado dentro de su dominio extracelular. Además, se ha descrito que F podría reclutar otras proteínas virales como G para formar un complejo en la superficie de las células infectadas, incluso se ha descrito la interacción de G con SH sin embargo no se ha reportado el complejo F, SH y G (Lay *et al.*, 2013, Battles & McLellan, 2019, Shaikh & Jr, 2013), a diferencia de la interacción de G con M a través del tallo citoplásmico de G, permitiendo así la interacción entre las proteínas de la superficie y las proteínas virales internas. Dentro del virión, se ha descrito que M2-1 actúa como una proteína *“linker”* entre el complejo RNP y M, que se encuentra localizada en la cara citoplasmática de las *“lipid rafts”* permitiendo reclutar estas estructuras a la membrana de la célula para el ensamblaje de la partícula viral (Ke *et al.*, 2018,

Lay *et al.*, 2013), donde la actina pareciera juega un papel importante a través de la formación de filamentos que aproximan al complejo RNP, así como IB a la superficie de la célula donde algunos reportes han sugerido que la proteína de choque térmico HSP90 podría actuar como puente entre proteínas virales y actina (Ke *et al.*, 2018).



**Figura 3. Esquema general del ciclo prototipo del Virus Sincitial Respiratorio.** Una vez que la partícula viral ha reconocido a su receptor en la superficie celular (Anexina I, Nucleolina, etc), la partícula viral es internalizada por endocitosis aunque no está completamente demostrado. Sucedido esto, la nucleocápside viral se libera en el citoplasma, con la consecuente liberación del genoma del virus. El cual lleva a cabo ciertas rondas de transcripción que permiten la formación de mensajeros para la síntesis de proteínas tanto estructurales como no estructurales esenciales tanto para la replicación, como para el ensamblaje de partículas maduras, una vez alcanzados los niveles necesarios de determinadas proteínas (M2-2) se produce un switch que da inicio a la replicación, la cual originará más plantados de mRNA, así como RNA viral que será empaquetado para la formación de nueva progenie viral y que se liberará por gemación en la membrana celular (Modificado de Schildgen *et al.*, 2011).

Finalmente el proceso de gemación del VSR da origen a la liberación de la progenie viral, 10-12 h después de la infección, con un pico máximo después de 24 h que continúa hasta que las células se deterioran entre 30-48 h, mediado por la vía de reciclado apical de endosomas (AER) que involucra a la familia Rab11 que interactúa con la proteína optineurina (FIP2), y es independiente de los complejos de clasificación endosomal requeridos para la maquinaria de transporte (ESCRT), aunado a esto, otro modelo descrito es en el que la actividad de viroporina de la proteína SH contribuye a la gemación del VSR, es a través de la generación de una despolarización de la membrana, que da como resultado una disminución en la repulsión eléctrica o por contacto entre las monocapas de la membrana en el sitio de salida, que podría proporcionar el estímulo para promover la gemación y la liberación (Collins & Graham, 2008, Nieva, 2012, Lay *et al.*, 2013).

### **1.5 Papel de los lípidos en el ciclo de infección viral**

Inherente a su condición de parásitos intracelulares obligados, los virus tienen que invadir una célula huésped para completar su ciclo viral, razón por la cual los virus han desarrollado interacciones complejas y dinámicas con su célula huésped (Heaton & Randall, 2011). En los últimos años, se ha expandido la información sobre el papel que juegan los lípidos de la célula huésped en el ciclo de infección viral, ya que se ha descrito que los virus son capaces de emplear lípidos celulares, involucrados en señalización y aprovechando el metabolismo de los lípidos para remodelar sus células huésped y generar un entorno óptimo para su ciclo de infección (Fig. 4). Posiblemente debido a que los lípidos son un grupo muy diverso de biomoléculas y con un amplio rango de funciones biológicas (Heaton & Randall, 2011). Actualmente se ha descrito el papel de los lípidos en las diferentes etapas que comprenden el ciclo de vida prototipo de un virus, es decir: anclaje y entrada, liberación del genoma, replicación, ensamble y liberación.

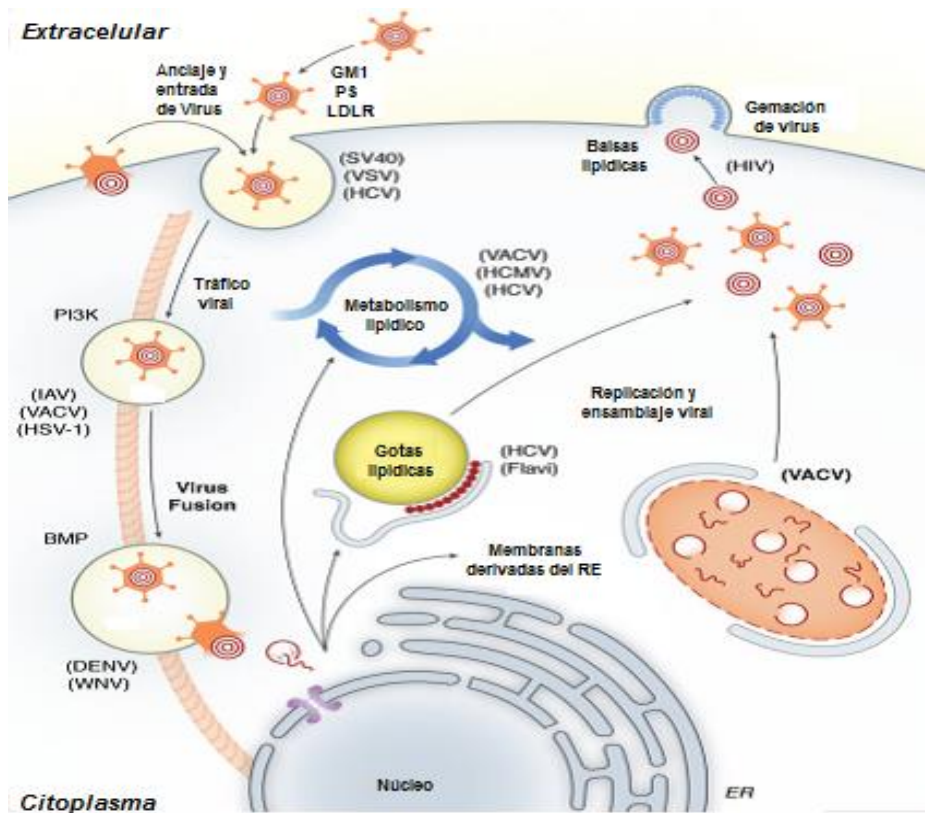
Los pasos iniciales de la infección viral incluyen la unión de la partícula viral a algún receptor específico ubicado en la superficie celular. A este respecto, se ha descrito que en algunos casos un lípido específico puede ser usado como receptor viral, como por ejemplo; el gangliosido GM1 es usado como receptor viral por SV40, o fosfatidilserina, un lípido aniónico que es empleado como receptor viral por el virus de la estomatitis vesicular (VSV) a través de interacciones electrostáticas con la proteína viral G, que permiten el anclaje del virus a la célula huésped. El anclaje del virus a los receptores celulares, comúnmente activa vías de señalización que inducen endocitosis del virus, permitiendo así que el genoma viral entre a la célula huésped para llegar a los sitios de replicación. En estas etapas, se ha descrito que diferentes lípidos ubicados en la membrana plasmática y/o endosomal, pueden contribuir a estos procesos de reclutamiento de los receptores para promover su entrada o fusión de la membrana y dentro de este grupo de lípidos se ha descrito de manera importante el papel del fosfatidilinositol (PI), una de las moléculas de señalización más versátiles (PI3K) y que pertenece a una de las vía de señalización más importantes y más explotada en diferentes etapas y por diferentes virus como: Herpes simplex virus tipo 1 (HSV-1) (Zheng *et al.*,2014), Virus de la Hepatitis C (HCV) (Berger *et al.*, 2009), Zaire Ebola Virus (ZEBOV) y Vaccinia virus (VACV). En particular, la vía PI3K es empleada para coordinar la entrada y dirigir la reprogramación río abajo de la célula huésped.

Una vez que se inicia la infección y se expresan los genes virales, ocurre una reprogramación extensa en la síntesis de lípidos para promover la replicación, el ensamblaje y la salida de los virus, en la que la replicación viral puede tener lugar asociada a membranas celulares u otras estructuras lipídicas, como las gotas de lípidos, formando estructuras denominadas complejos de replicación. Por ejemplo se ha descrito, que en muchos virus de replicación citoplasmica, tienden a reorganizar la membrana celular para crear sitios de replicación llamados complejos de replicación o fabricas virales, dentro de este grupo se incluyen virus que son capaces de reorganizar la membrana del RE, Golgi, endosomas, etcétera. Tal es el caso de DENV que produce reestructuración de la membrana del RE, así como una modificación del perfil lipídico que finalmente contribuye a la



remodelación de la membrana del RE y promover la infección (Mazzon & Mercer, 2014).

Los genomas virales recién sintetizados se encuentran dentro de las partículas virales sintetizadas de *novo*, un proceso en el que varios lípidos pueden jugar una vez más un papel importante, especialmente en el caso de virus que contienen una envoltura lipídica como un componente integral de su partícula infecciosa. Posteriormente, las partículas virales maduran para producir partículas infecciosas que se liberan desde la célula huésped para iniciar un nuevo ciclo de infección empleando de igual forma lípidos que participan en la señalización y promuevan la liberación, o incluso dominios lipídicos, que se ha descrito para muchos virus son empleados para la gemación de partículas virales (Lorizate & Kräusslich, 2011, Mazzon & Mercer, 2014)



**Figura 4. Papel de los lípidos celulares durante la infección viral.** El ciclo de vida de la mayoría de los virus se desarrolla a través de una serie de pasos básicos: unión e internalización, fusión, desnudamiento del genoma viral, replicación, ensamblaje de nuevas partículas y gemación o liberación de los virus recién creados. Una multitud de virus han aprendido a aprovechar los lípidos de la célula huésped en cada una de estas etapas. En la foto se muestran las etapas de la infección por virus en las que la interacción entre virus y lípidos del huésped ocurre en diversas etapas del ciclo de vida de un virus, en el que los lípidos celulares pueden ser alterados o subyugados; se muestran ejemplos de virus enumerados entre paréntesis SV40 (virus de simio 40); VSV (vesicular virus de la estomatitis); IAV (virus de la influenza A); VACV (virus vaccinia); HSV-1 (virus del herpes simple 1); BMP [bis (monoacilglicero) fosfato]; DENV (virus del dengue); WNV (virus del Nilo Occidental); VHC (virus de la hepatitis C); HCMV (humano citomegalovirus); VIH (virus de inmunodeficiencia humana); GM1 (GM1 gangliósido); PS (fosfatidilserina); PI3K (fosfoinositide-3 quinasa) (Modificado de Mazzon & Mercer, 2014)



## **1.6 Gotas lipídicas (GL)**

Los cuerpos lipídicos o gotas lipídicas (lipid droplets, por sus siglas en inglés), son estructuras identificadas por microscopía óptica, tanto en células eucariontes como procariontes (Walther *et al.*, 2012; Welte, 2015, Romero *et al.*, 2016). Actualmente reconocidos como organelos citosólicos altamente dinámicos y especializados, debido a que están vinculados a muchas funciones celulares de los lípidos, tales como: metabolismo lipídico, almacenamiento de lípidos, componentes de membrana, lípidos de señalización, modificaciones post-traduccionales, etcétera (Olzmann & Carvalho, 2018).

Generalmente se localizan en el citoplasma, sin embargo, algunos estudios han demostrado la existencia de GL nucleares en algunos tipos celulares (Fareser & Walther 2016; Barneda & Christian 2017, Kory *et al.*, 2016; Roingard & Melo 2017; Thiam & Foret 2016). Las gotas lipídicas, están compuestas principalmente por un núcleo de lípidos neutros, que en la mayoría de las células consiste de triacilgliceroles (TAG) y ésteres de esteroles (SE) recubiertos por una monocapa de fosfolípidos que puede ser variable, en las GL de mamíferos, la fosfatidilcolina (PC) es el fosfolípido de superficie principal, seguido por la fosfatidiletanolamina (PE) y el fosfatidilinositol (PI) (Fig. 5) (Wilfling *et al.*, 2014; Welte, 2015, Bickel *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2016) y adosadas a la monocapa de fosfolípidos, se encuentran un gran número de proteínas de acuerdo a los datos obtenidos por ensayos de proteómica; las cuales varían entre diferentes tipos celulares así como la metodología con la que se analicen, sin embargo, consta de 100-150 proteínas en células de mamífero e invariablemente del tipo celular incluyen proteínas de la familia de las perilipinas (Olzmann & Carvalho, 2018). Tanto el diámetro, como el tamaño y el número pueden ser variables, observándose en muchas células GL pequeñas (diámetros de 100-200 nm), mientras que las GL en adipocitos blancos tienen diámetros de hasta 100  $\mu\text{m}$ . (Romero *et al.*, 2016).

## **1.7 Proteínas de las gotas lipídicas**

En la superficie de las gotas lipídicas se encuentran proteínas con diversas funciones estructurales y metabólicas (Pol *et al.*, 2014), que han sido identificadas por análisis de proteómica en diferentes organismos, los cuales arrojan una lista muy diversa de proteínas asociadas. Las primeras proteínas que se describieron en las GL, son las pertenecientes a la familia PAT (Perilipina, Adipofilina o Proteína relacionada con la diferenciación de adipocitos “ADRP” y Proteína que interactúa con la cola de 47 kDa “TIP47”), actualmente conocidas como perilipina (PLIN) 1-5. Las cuales son proteínas residentes o estructurales de GL, que se localizan en la superficie y desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la función, estructura y morfología de las GL, ayudando al secuestro de lípidos y protegiéndolas de la acción de la lipasa lipídica neutra (Tabla 1). Entre el resto de las proteínas que se asocian a las GL’s, se encuentran enzimas involucradas en la síntesis de triacilglicéridos y fosfolípidos (AcilCoa sintetasa, Diacilglicerol aciltransferasa uno y dos DGAT1, 2, acil-CoA: colesterol aciltransferasa ACAT1, 2, y lecitina), proteínas implicadas en la formación de vesículas, transporte y proteínas que participan en procesos de reconocimiento y fusión de membranas, proteínas de señalización (Protein cinasa asociada a mitógenos (MAPK) Protein cinasa C (PKC) y Fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K)), proteínas involucradas en la degradación, proteínas ribosómicas, histonas y proteínas del citoesqueleto, entre otras (Ding *et al.*, 2012, Itabe *et al.*, 2017, Xu *et al.*, 2018).

## **1.8 Función de las gotas lipídicas en la célula**

Las GL al ser orgánulos citoplásmicos dinámicos, están asociados a múltiples procesos fisiológicos celulares, siendo el almacenamiento de lípidos la más importante, ya que proporcionan bloques de construcción para las membranas o sustratos para el metabolismo energético. (Barbosa & Siniosoglou, 2017, Horton *et al.*, 2012, Roingeard & Melo, 2017, Welte, 2015). Sin embargo, actualmente se

conoce que existe una gran diversidad de funciones relacionadas con estos organelos como son (Fig. 5):

- Síntesis de membrana plasmática.
- Almacenamiento temporal de proteínas de membrana mal plegadas antes de la degradación proteasomal.
- Modulación de lípidos nucleares.
- Secuestro de factores de transcripción citoplásmicos, enzimas, muchas otras proteínas y componentes de la cromatina, controlando la disponibilidad de está en el núcleo.
- Sitios de interacción con otros organelos celulares (mitocondria, peroxisomas, lisosomas, endosomas, RE, etc.

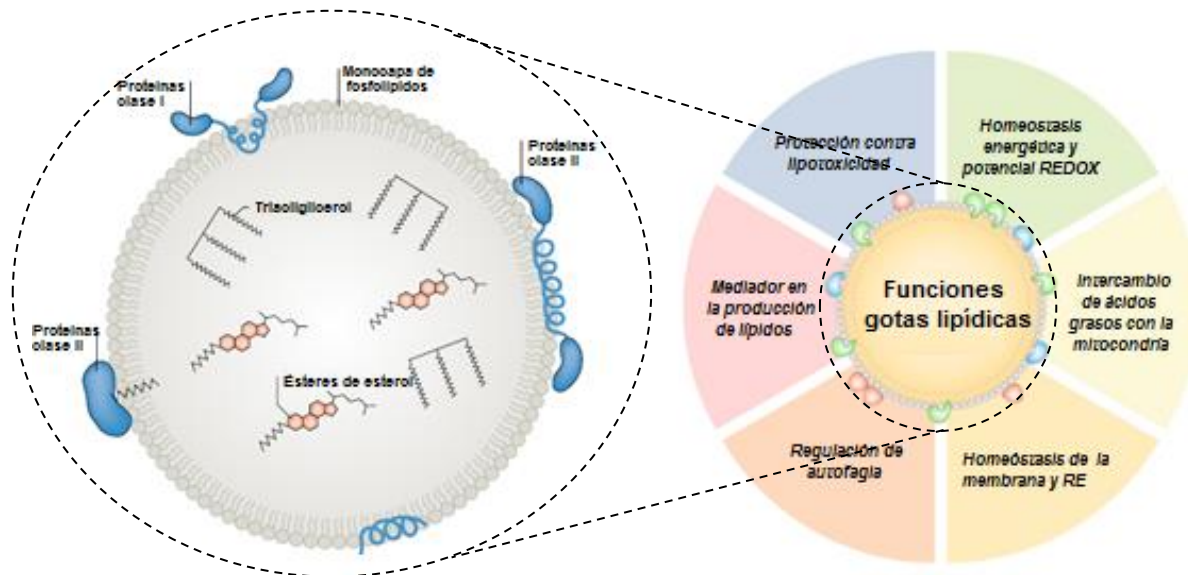
**Tabla 1** Características básicas de las proteínas presentes en las GL.

Proteínas	Nombres alternativos	Principal sitio de expresión	Otros sitios de expresión	Función
PLIN1	Perilipina A	WAT	BAT, Liposarcoma de músculo cardíaco	Lipólisis inducida por hormonas y estabilización de GL
PLIN2	ADRP, ADFP (human ADRP) y Adipofilina	Hígado	Adipocitos prematuros, macrófagos, sebocitos, epitelio de glándula mamaria, células de coriocarcinoma (BeWo) y ubicuamente expresado	Diferenciación de adipocitos, generación de pequeñas GL y estabilización de GL
PLIN3	TIP47	Ubicuo	Músculo esquelético, mastocitos, epitelio pigmentario de retina y sebocitos	Estabilización de GL (compensación de PLIN2), producción de PG32 y tráfico intracelular
PLIN4	S3-12	WAT	hMSC (inducido durante la diferenciación) y músculo esquelético	Diferenciación de adipocitos humanos
PLIN5	MGLP, OXPAT, LSDP5	Músculo cardíaco, BAT y músculo esquelético	Islotes de células $\beta$ y células hepáticas	Estabilización de GL y suplir a la mitocondria de ácidos grasos

WAT: Tejido adiposo blanco, ADRP: Proteína Relacionada con la Diferenciación Adiposa, BAT: Tejido de adipocitos marrones, PLIN: Perilipina Tomado de Itabe *et al.*, 2017.

## 1.9 Biogénesis y regulación de las gotas lipídicas

La biogénesis de las GL está regulada por mecanismos complejos en los que participan múltiples enzimas del retículo endoplásmico liso (REL) (Fig. 6) (Pol *et al.*, 2014, Romero *et al.*, 2016). Teniendo así varios modelos propuestos acerca de la biogénesis de las GL, (Walther & Jr, 2009); i) Gemación, ii) Formación de bicela, iii) Gemación vesicular y iv) Modelo "egg-cup" (Walther & Jr, 2009). Sin embargo el modelo más aceptado es el modelo de gemación, que se ha descrito en una serie de 4 pasos, que son ilustrados en la (Fig. 6) y que serán descritos a continuación.



**Figura 5. Características estructurales y funcionales de las gotas lipídicas.** A) Las gotas lipídicas son orgánulos de almacenamiento universal de lípidos neutros, el número, tamaño y composición varía ampliamente entre las células o incluso dentro de la misma célula. Las diferencias a menudo reflejan estados metabólicos dentro de esas células. Aunque morfológicamente diversas, todas las gotas tienen una organización estructural similar. En lugar de la bicapa de fosfolípidos típica, las gotas de lípidos están rodeadas por una monocapa de fosfolípidos cubierta por proteínas de diversa naturaleza, siendo importantes dos clases, clase I: Aquellas que se asocian mediante horquillas hidrofóbicas y clase II: Se asocian por unión directa a otra proteína de la gota lipídica o por interacción con la monocapa lipídica a través de un lípido. La bicapa encierra un núcleo lleno de lípidos neutros, con mayor frecuencia triacilglicerol y ésteres de esterol. Las GL al ser orgánulos citoplásmicos dinámicos, se asocian a múltiples procesos fisiológicos celulares, encontrándose que pueden asumir diferentes roles (1) reducción del daño por lipotoxicidad; (2) mantenimiento de la homeostasis energética y redox al proporcionar sustratos para producción de energía, estimulación de la síntesis de NADPH y regulación del metabolismo oxidativo a través de lipólisis mediada por señalización; (3) la regulación del tráfico y distribución de FA, por ejemplo, permitiendo una transferencia óptima de las FA a las mitocondrias para una eficiente oxidación de los FA; (4) mantenimiento del retículo endoplásmico (ER) y homeostasis de membrana, control de calidad de proteínas y protección contra el estrés ER; (5) regulación de autofagia y (6) la producción de mediadores lipídicos bioactivos, incluidos los pro y antiinflamatorios y moléculas de señalización derivadas de FA poliinsaturadas, como los eicosanoides, entre otras (Modificado de Oltzman & Carvalho, 2018) .

### **1.9.1 Paso 1. Síntesis de triacilglicerol dentro del REL**

La vía de síntesis de glicerolípidos de *novo*, o la vía de Kennedy, es la vía principal de síntesis de TAG en la mayoría de las células. Emplea glicerolfosfato y acil-CoA graso (Jones, 2015). Siendo el paso final, la síntesis de TAG; catalizado por las enzimas DGAT (diacilglicerol aciltransferasas): DGAT1 y DGAT2 (Walther & Jr, 2017).

### **1.9.2 Paso 2. Formación de “oil lens” en la membrana del retículo endoplásmico**

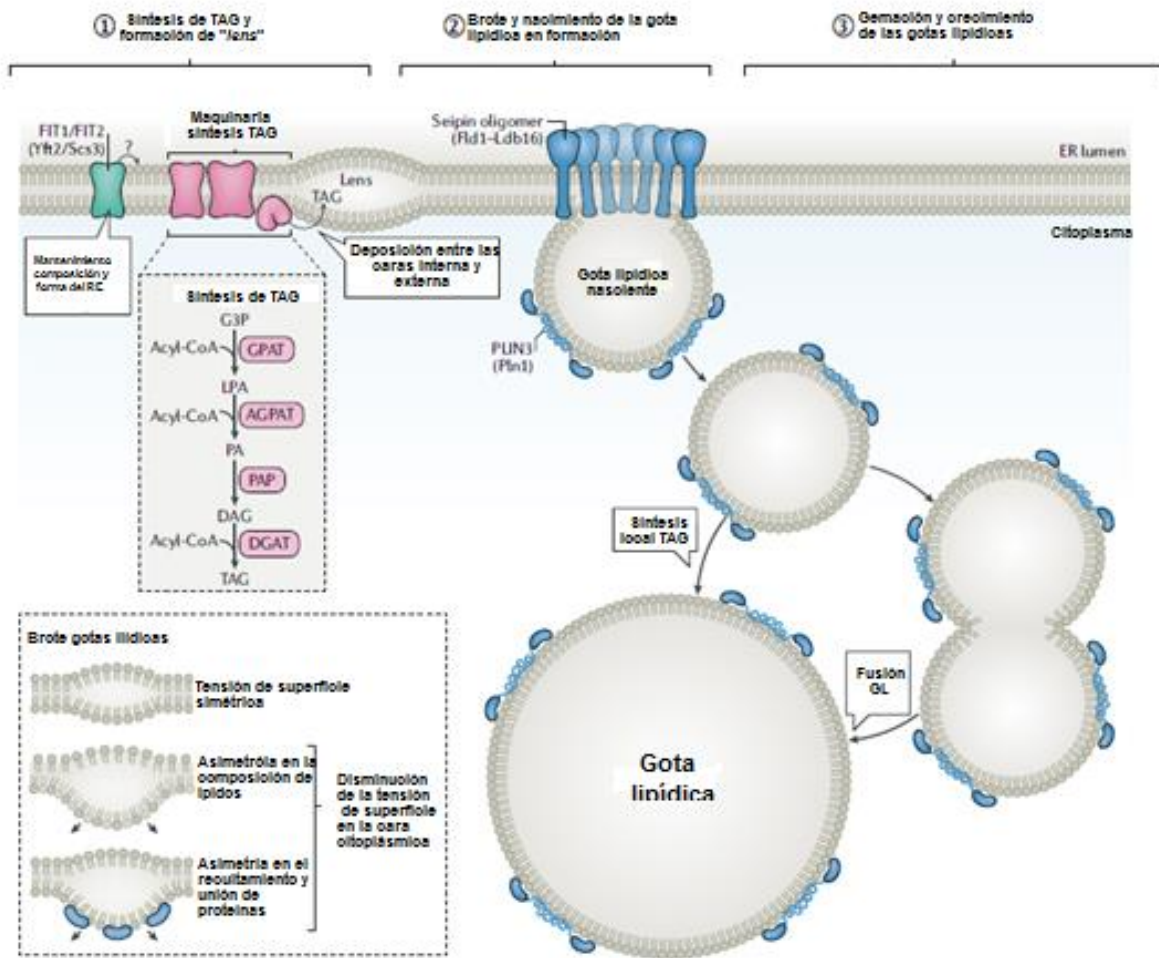
El segundo paso de la formación de las GL, es la acumulación de lípidos neutros dentro de la bicapa del REL; a medida que se sintetizan los TAG, se acumulan en medio de la bicapa del RE, generando una deformación de la bicapa por la acumulación de lípidos, lo cual es favorecido por otros factores celulares, que son reclutados en la lente y facilitan el crecimiento de la gotita de lípidos naciente. Llegado este punto, se puede decir que la GL está casi madura o lista para ser liberada y entrar a la siguiente etapa (Horton *et al.*, 2012, Walther *et al.*, 2017).

### **1.9.3 Paso 3. Gemación y formación de gotas lipídicas nacientes**

El modelo prevalente establece que cuando se acumulan suficientes TAG dentro de la bicapa del RE, ocurre la gemación de la GL en el citosol, sin embargo se desconoce si esto sucede para todas las GL, así como los factores que median la direccionalidad de la reacción de gemación hacia el citosol. Pudiendo así actuar fosfolípidos o proteínas específicas. Finalmente las GL recién formadas se pueden convertir en una subpoblación, producto de la última etapa de la biogénesis (Walther *et al.*, 2017)

### 1.9.4 Paso 4. Crecimiento y expansión de las gotas lipídicas

Las gotas lipídicas en expansión (eGL) son gotas lipídicas iniciales (iGLs) que se convierten en GL especializadas y se caracterizan por la síntesis de TG localizada. Aunque lo que desencadena la conversión de un iGL a un eGL es desconocido; se sabe que en condiciones fisiológicas, las acciones de la maquinaria de proteínas ARF1 y COP-I son claramente necesarias.



**Figura 6. Modelos de la biogénesis de las GL.** Las gotas lipídicas se forman a partir de zonas especializadas del retículo endoplásmico (RE) donde se acumulan los triglicéridos en una serie de pasos que comprenden desde la síntesis hasta su fusión. Paso 1: Las enzimas de síntesis de triacilglicerol (TAG) y de síntesis de éster de colesterol depositan lípidos neutros en la bicapa del ER. Más allá de una cierta concentración, los lípidos neutros se mezclan y se unen formando una lente. Paso 2: Seipina y otros factores de biogénesis de las gotitas se reclutan en la estructura de la lente y facilitan el crecimiento de la gotita de lípidos nascente. La aparición de la gota de lípidos en el citosol se ve afectada por las diferencias en la tensión superficial entre la cara luminal y citosólica de la bicapa ER, probablemente determinados por la unión a proteínas asimétricas y la composición de fosfolípidos (que se muestra en el recuadro). Paso 3: en algunas células de mamíferos, las gotitas de lípidos brotan y crecen a través de la fusión o la síntesis local de lípidos. AGPAT, acilglicerofosfato aciltransferasa; DAG, diacilglicerol; DGAT, acil-CoA: diacilglicerol aciltransferasa; G3P, glicerol 3-fosfato; GPAT, glicerol-3 fosfato aciltransferasa; LPA, ácido lisofosfatídico; PA, ácido fosfatídico; PAP, fosfatasa ácida fosfatídica; PLIN, perilipina (Modificada de Olzmann & Carvalho, 2018).



## 2. ANTECEDENTES DIRECTOS

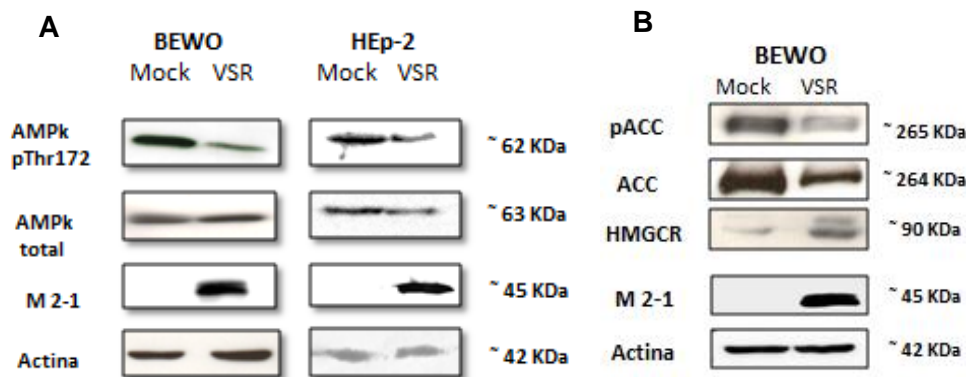
El virus sincitial respiratorio es uno de los patógenos respiratorios más prevalentes a nivel mundial, capaz de afectar a todos los grupos etarios, sin embargo los infantes y ancianos sufren de la enfermedad más grave por VSR, que compromete el tracto respiratorio, causando neumonía y bronquiolitis (Chang *et al.*, 2012)

Los virus constituyen patógenos importantes que pueden infectar a los animales, incluidos humanos y plantas. A pesar de su gran diversidad, los virus comparten como característica común la dependencia de los factores de la célula huésped para completar su ciclo replicativo. Encontrando que los lípidos celulares desempeñan un papel importante en las infecciones virales (Mazzon & Mercer, 2014), tanto en virus envueltos (aquellos virus cuya partícula infecciosa está envuelta en uno o más membranas lipídicas) como en virus sin envoltura (Heaton & Randall, 2011).

En este orden de ideas, los datos sugieren fuertemente que los virus usurpan y/o reprograman los lípidos celulares (Vanni, 2017). En el caso particular del VSR, una serie de evidencias han establecido el papel que juegan los lípidos celulares durante el ciclo de infección. Por ejemplo, en células HEp-2 infectadas con VSR se ha demostrado que las “*lipid rafts*” ricas en colesterol juegan un papel importante durante la infección con VSR (Chang *et al.*, 2012), ya que la disrupción de las “*lipid rafts*” con fármacos como metil beta ciclodextrina (M $\beta$ CD), inducen una drástica disminución de progenie viral infecciosa (Vergara *et al.*, 2012). De igual manera, se demostró que la presencia de colesterol en las “*lipid rafts*” es indispensable para el ensamblaje y liberación de partículas virales (Vergara *et al.*, 2012); lo que coincide con el aumento de la expresión del gen para la 3- hidroxil-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMGCR), enzima necesaria para la síntesis de colesterol (Yeo *et al.*, 2009, Chang *et al.*, 2012).

Por otra parte, la inhibición de otras enzimas necesarias para el anabolismo de lípidos como FASN; reduce significativamente la progenie del VSR tanto *in vitro*

como *in vivo* (Ohol *et al.*, 2015). Sin embargo hasta el momento no se ha descrito el papel, ni el mecanismo de esta enzima durante la infección. Finalmente, nuestro grupo de trabajo, ha identificado una disminución de la forma fosforilada de AMPK en células HEp-2 y BeWo. AMPK, es una molécula importante en la regulación metabólica de la síntesis de lípidos durante la infección por VSR (Fig. 7). Adicionalmente, al evaluar los blancos enzimáticos de esta cinasa, se encontró que la forma inactiva de la Acetil-CoA Carboxilasa (pACC) tuvo una disminución respecto a su forma total y la enzima HMGCR, tuvo un aumento significativo en la expresión a nivel de proteína en las células BEWO infectadas; y a nivel de mensajero en células HEp-2, lo que de alguna forma sugeriría que la infección produce un cambio en la síntesis de ácidos grasos, así como del colesterol (González, 2017),



**Figura 7. El VSR modula la fosforilación de AMPK.** Los niveles de AMPK fosforilados, AMPK total y proteína viral M2-1 se analizaron por WB a partir de un lisado total de células de células BEWO y HEp-2 infectadas con VSR (MOI 1) o Mock durante 24 h (Tomado de González, 2017).

Todos estos hallazgos, finalmente remarcan la íntima conexión entre VSR y el metabolismo lipídico, y una forma de evidenciar esto podría ser a través de las GL, estructuras reconocidas actualmente como organelos citosólicos altamente dinámicos, debido a que están vinculados a muchas funciones celulares y dentro de las más importantes metabolismo lipídico y almacenamiento de lípidos (Olzmann & Carvalho, 2018). Las GL en la última década se han ido caracterizando cada vez más, por el hecho de que muchos patógenos intracelulares usurpan las GL durante su ciclo de infección con diferentes



propósitos. Sin embargo los virus han mostrado mayor habilidad para usurpar estos organelos (Itabe *et al.*, 2017, Roingear & Melo 2017, Camus *et al.*, 2013).

Las primeras evidencias acerca del papel de las GL en el ciclo de infección de los virus surgió en el 2007, con el virus de la hepatitis C (VHC) (Miyanari *et al.*, 2007), sin embargo actualmente la información acerca del papel de las GL durante el ciclo de infección en diferentes virus ha ido creciendo (DENV, RV, etc.), encontrando que pueden participar en diferentes etapas del ciclo de infección por ejemplo: ensamblaje, replicación y transcripción; incluso como parte de una estrategia anti-inmune, tal es el caso del virus Junin (JUNV), donde se ha descrito que las GL son consumidas durante la infección, lo que sugiere su relevancia para la correcta multiplicación del virus y donde es sugerido que las gotas son consumidas en la vía antiviral mediada por viperina a nivel de la gota de lípidos (Hinson & Creswell, 2009, Cárcamo *et al.*, 2018).

También se ha descrito que las GL son consumidas durante la infección con DENV, a través de un procesamiento dependiente de autofagia de gotitas de lípidos para liberar ácidos grasos libres, que resultan en un aumento de la oxidación celular y producción de ATP, que finalmente potencia la replicación viral (Samsa *et al.*, 2009, Heaton & Randall, 2011). Por lo que entonces, el mecanismo a través del cual los virus pueden emplear las gotas lipídicas es muy variable y puede ser en gran medida en función de su dinámica. No obstante, los estudios coinciden en que las GL tienen un papel importante en el ciclo de infección; lo cual resalta finalmente la importancia de las GL (Filipe & McLauchlan, 2015). Sin embargo para el VSR, no se ha descrito si las GL podrían estar jugando un papel durante el ciclo de infección.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los lípidos, son elementos celulares importantes debido a la diversidad de sus funciones; y en los últimos años se ha demostrado que juegan un papel importante en diversas infecciones virales, incluyendo al VSR. En ese sentido, se ha observado que la infección puede modular el metabolismo lipídico y vías de señalización involucradas en lipogénesis, remarcando así la importancia de evaluar el papel de los lípidos en la infección por VSR, a través de la evaluación de enzimas involucradas en lipogénesis como FASN, así como las GL, organelos celulares de almacenaje lipídico. De los cuales recientemente se demostró son importantes en la infección productiva de virus como HCV, DENV, etc. Sugiriendo así un papel importante de estos elementos celulares en el ciclo de infección. Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido el papel de las GL y FASN en el ciclo de infección del VSR.

## **4. HIPÓTESIS**

Si el VSR incrementa la expresión de FASN y regula la expresión de GL durante la infección, entonces la replicación viral se verá favorecida.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general:**

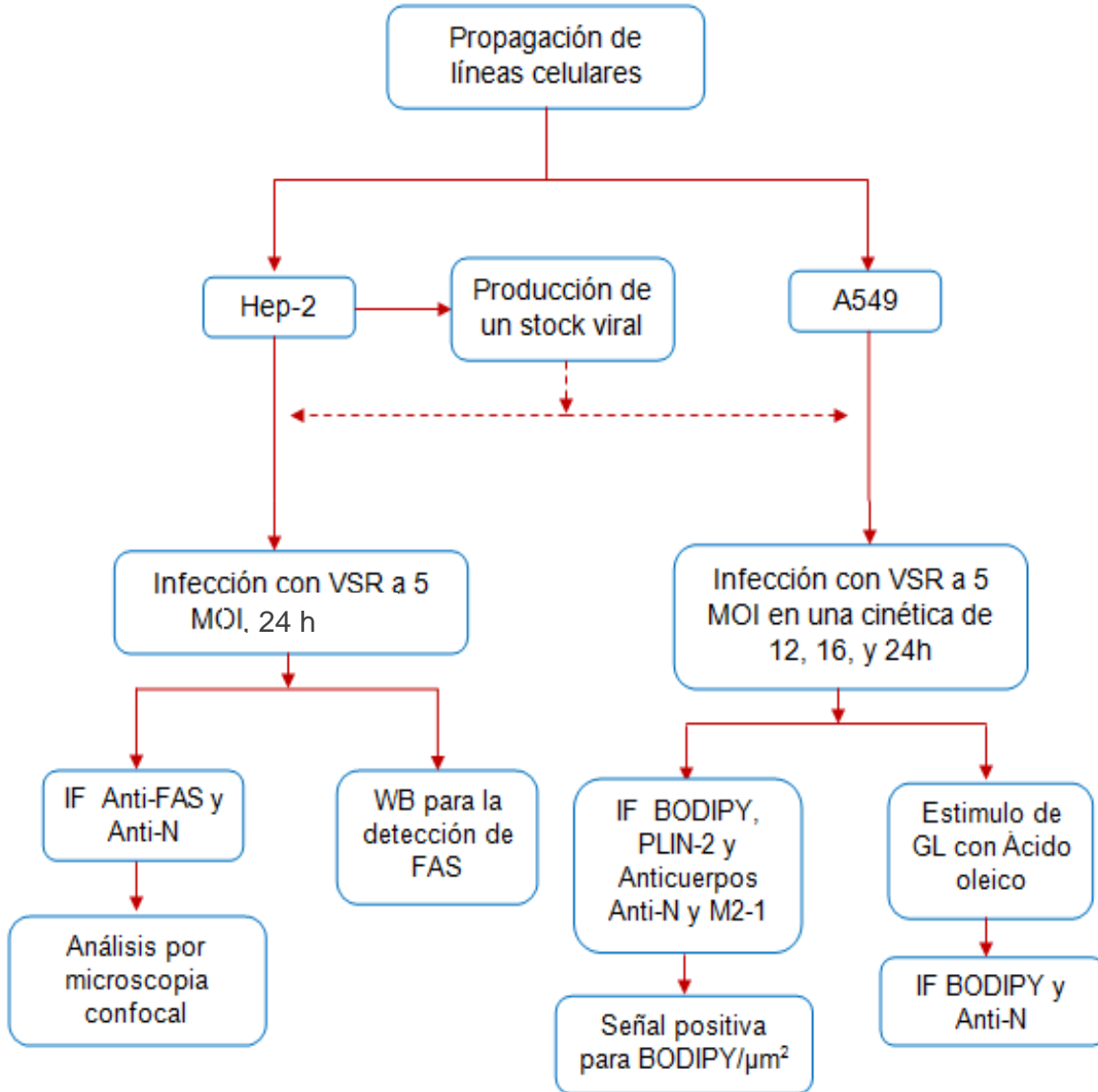
Analizar cambios de expresión de las gotas lipídicas durante el ciclo de infección del VSR.

### **5.2 Objetivos particulares:**

1. Evidenciar cambios en la expresión de FASN y su distribución celular durante la infección con VSR en células HEp-2.
2. Determinar la localización sub-celular de proteínas virales (N y M2-1) en células A549 infectadas con VSR.
3. Caracterizar la proteína (PLIN-2) asociada a gotas lipídicas, así como lípidos neutros en células A549 infectadas con VSR.
4. Evaluar el efecto que produce la inducción de las gotas lipídicas en células A549 infectadas con VSR.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se muestra un esquema del desarrollo experimental que se siguió durante el desarrollo del trabajo (Fig. 8).



**Figura 8. Esquema general de trabajo.** El proyecto consistió básicamente en dos etapas, la primera evaluar la expresión de FASN así como la distribución celular y la segunda, evaluarla el papel de las GL durante la infección con VSR. IF: Inmunofluorescencia, WB: Western blot

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Material biológico

Para el desarrollo de este proyecto se usaron las líneas celulares que se enlistan en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Líneas celulares empleadas en la evaluación del papel de las GL en la infección con VSR

Línea celular	Descripción
HEp-2	Carcinoma de cérvix humano
A549	Epiteliales basales alveolares de un adenocarcinoma humano

### 7.2 Propagación celular

Una botella de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> al 100 % de confluencia de células HEp-2 se le eliminó el medio de cultivo y se lavó con 1 mL de solución de Tripsina-EDTA 0,25 % (m/v), posteriormente se retiró el volumen adicionado y se añadió nuevamente 1 mL de solución de Tripsina-EDTA y se dejó incubando 3-4 min a 37° C, se observaron las células bajo un microscopio invertido hasta observar el redondeamiento de las células; se retiró de la incubación y se le aplicó un ligero movimiento para desprender la monocapa. Una vez desprendida, se agregaron 3 mL del medio de cultivo suplementado de acuerdo a la línea celular (Tabla 3). Se aspiraron las células por pipeteo suave homogeneizando la suspensión para posteriormente colocarlas en tubos estériles de 15 mL. Inmediatamente, el aspirado se llevó a centrifugar durante 5 min a 225 x g. Después se decantó el medio y el botón celular se re-suspendió con 1 mL de medio suplementado, distribuyendo en diferentes volúmenes de acuerdo a la confluencia requerida en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> o de 75 cm<sup>2</sup>. Finalmente se dejaron los cultivos a 37° C, en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> y 80 % de humedad relativa (RH). Todos

estos pases fueron lavados con medio base a las 24 h y posteriormente, conforme el cultivo fuera creciendo se realizaron lavados.

**Tabla 3.** Medios de cultivo para el mantenimiento de las líneas celulares empleadas.

LÍNEA CELULAR	MEDIO BASE	MEDIO SUPLEMENTADO
<b>A549</b>	Medio de cultivo de Kaigh's modificado F12K (GIBCO®) 1x	Medio F12K (1x), 10 % SFB (GIBCO®) descomplementado, 1 % de antibiótico-antimicótico (penicilina sódica $1 \times 10^4$ U/ml, sulfato de estreptomicina $1 \times 10^4$ U/ml GIBCO®).
<b>HEp-2</b>	Medio mínimo esencial de Eagle (DMEM) (GIBCO®) 1X	DMEM (GIBCO®) 1X, 5 % SFB, 1 % de antibiótico-antimicótico (penicilina sódica $1 \times 10^4$ U/ml, sulfato de estreptomicina $1 \times 10^4$ U/ml GIBCO®).

SFB: Suero fetal bovino

### 7.3 Producción de un “stock” viral del VSR

Para el establecimiento del “stock” viral, se empleó una alícuota de la cepa viral ATCC® RSV-26™, la cual se propagó en células HEp-2.

A una botella de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> con células HEp-2 a una confluencia del 80 al 90 % se le adicionó 1.5 mL del abasto del VSR y después se completó con DMEM base a un volumen final de 2 mL para cubrir la monocapa de células, se dejó en adsorción por 2 h a 37° C y 5 % de CO<sub>2</sub> con movimientos periódicos cada 15 min. Finalizadas las 2 h de adsorción se retiró el inóculo y se adicionó medio DMEM suplementado y se incubó en las condiciones mencionadas. Posteriormente se monitorearon las células al microscopio para seguir la infección hasta observar la formación de grandes sincitios (efecto en más del 80 %) en un promedio de 24 a 48 h. Una vez transcurrido este periodo se recuperó una fracción del sobrenadante en tubo de centrifuga de 50 mL y se procedió a raspar la monocapa de células con ayuda de un gendarme, la suspensión obtenida fue lisada en un sonicador

BRANSON B1510MT en frío en 3 periodos de 5 s cada uno, con intervalos de 5 s en hielo. Finalmente, los sobrenadantes se centrifugaron a 7,250 x g por 7 min a 4 °C y a partir del sobrenadante se hicieron alícuotas, las cuales se mantuvieron a -70°C hasta su uso.

#### **7.4 Titulación del abasto viral**

Para determinar el título viral, se realizó un ensayo de titulación por el método de unidades formadoras de placas líticas por mililitro (PFU/mL). Para ello se sembraron  $1 \times 10^6$  células HEp-2 por pozo en placas de 6 pozos y se efectuaron diluciones seriadas 1:10 del stock viral desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-10}$ , se incluyeron dos controles; células no infectadas y células inoculadas con el virus concentrado. Las células se infectaron con 800  $\mu$ L de volumen final y se dejaron incubando por 2 h. Finalizado el tiempo de incubación se añadió a cada pozo 3 mL de una matriz semisólida de medio DMEM suplementado con SFB 2 % y agarosa al 3 %, las células se dejaron incubando a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 5 días. Transcurrido este periodo se fijaron las células con paraformaldehído al 3.65 % por 30 min. Posteriormente, se retiró la agarosa de los pozos a chorro de agua y se añadió 2 mL de una solución de Cristal violeta (MERCK) 0.5 % durante 5 min para evidenciar las placas líticas. Finalmente los pozos se lavaron con agua y se contaron en el pozo de mayor dilución, donde fueran contables las placas líticas para calcular las unidades formadoras de placas por mililitro, empleando la siguiente ecuación:

$$\text{PFU/mL} = \frac{\text{Número de placas}}{\text{Dilución} * \text{Volumen del inóculo}}$$

## **7.5 Análisis de la expresión y distribución celular de FASN durante la infección con VSR**

Se sembraron células HEP-2 en cubreobjetos de 18 mm en placas de 6 pozos con medio suplementado DMEM, 24 h después se infectó como se describió anteriormente. Finalizado el tiempo de incubación las células se lavaron una vez con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 4 % (SIGMA) por 30 min y se permeabilizaron con una solución de PBS 1X- gelatina-Tritón 0.1 % durante 40 min. Previo al marcaje primario se bloqueó con una solución (1:10) de suero de chivo en PBS 1X-Tritón 0.1%. Para el marcaje primario se agregaron los anticuerpos primarios correspondientes a FASN (1:200, ab99359) y N (1:100 GTX36623) en solución de bloqueó. Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en agitación suave con 3 lavados de 5 min cada uno con PBS 1X-Tritón 0.01 %, posteriormente se incubó el anticuerpo secundario (Cy3 anti ratón de cabra para FASN y FITC anti ratón de cabra para N) a una dilución 1:200 y 1:300 respectivamente con solución de bloqueo. Se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno y finalmente por 30 min con agua destilada. La preparación se montó en portA.O.bjetos con Vectashield H-100 ® y se analizó por microscopia confocal en un microscopio Leica, TCS SP5.

Adicionalmente se analizó por ensayos de WB extractos celulares de  $1.5 \times 10^6$  de células HEP-2 infectadas y el Mock, 24 h post-infección a 5MOI. Se trataron con Tripsina-EDTA 0.005 %, el paquete celular se resuspendió con PBS 1X y se centrifugó a  $7,250 \times g$  durante 5 min. Posteriormente el paquete celular se liso con 100  $\mu$ L de buffer RIPA (NaCl 150 mM, Tritón 1 %, Deoxicolato de sodio 0.5 %, Tris base pH 8.0 y SDS 0.1 %) a 4 °C durante 1 h a 50 rpm, finalizado el tiempo de incubación se centrifugó a 13,000 rpm 20 min a 4 °C y los sobrenadantes se recuperaron para almacenarse a -20 °C hasta su uso. Los extractos celulares fueron cuantificados mediante el método de Lowry (Bio-Rad) en el equipo Synergy™ HT (BioTek) a una absorbancia de 725 nm usando una curva estándar de Albúmina sérica bovina (BSA) para determinar la concentración final de cada extracto. Posteriormente se tomaron 30  $\mu$ g del extracto y se re-suspendieron en buffer Laemmli (Glicerol, azul de bromofenol, SDS y 10 % de  $\beta$ -mercaptoetanol).



Las muestras se desnaturalizaron a 96 °C por 10 min y se analizaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12 %. La electroforesis se desarrolló en una cámara de electroforesis (Bio- Rad) a 90 volts durante 1 h 40 min en regulador SDS-PAGE (192 mM de Glicina, 0.1 % SDS, 25 mM Tris-base) y utilizando como marcador, PageRuler Plus (Thermo Scientific) de 250 kDa. Una vez terminada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa durante 2 h empleando un regulador de transferencia (192 mM de Glicina, 25 mM Tris-base, metanol 1:5) a 90 volts en frío. La membrana se bloqueó con leche descremada (Svelty, Nestlé) durante 1 h seguido de una serie de 3 lavados por 5 min con TBS-Tween 20 0.5 %. Enseguida la membrana se incubó con los anticuerpos primarios correspondientes (Anti-FASN (1:1000, ab99359) Anti- $\beta$ -Actina y Anti-M2-1) en TBS 1X- 0.5%Tween 20 con 5% leche por una hora a temperatura ambiente en agitación constante. La membrana se lavó 3 veces cada 5 min a temperatura ambiente con PBS 1X-0.5%Tween 20. El anticuerpo secundario correspondiente empleado fue: anti-ratón HRP 1:8000 o anti-conejo 1:5000, diluidos con TBS 1X, 0.5% Tween 20 y 5% de leche a temperatura ambiente durante 1 h. Concluido el tiempo, la membrana se reveló mediante el uso de un Kit ultrasensible de quimioluminiscencia (SuperSignal™ West Femto, Thermo Scientific).

## **7.6 Cinética de infección de células A549 con el VSR**

Se sembraron 80,000 células por pozo en placa de 24 pozos, con medio suplementado F-12K (Tabla 3). Las células se incubaron a 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 80 % de humedad relativa. Una vez sembradas, se infectaron a 5 MOI, en una cinética de 6, 12, 16 y 24 h con el respectivo control negativo, células tratadas con el virus inactivado por calor (Mock), dejando en las condiciones de incubación descritas anteriormente y se evaluó por inmunofluorescencia las GL durante la infección con VSR.

## **7.7 Detección de antígenos virales y localización subcelular de proteínas asociadas a gotas lipídicas (PLIN-2), así como lípidos neutros en células A549 infectadas con VSR**

Se efectuaron ensayos de inmunofluorescencia en células A549 infectadas con el VSR siguiendo el mismo protocolo de inmunofluorescencia descrito anteriormente, solo se modificaron los anticuerpos primarios, N (1:100 GTX36623) y M2-1 (1:100 1:500 GTX11331). Después de los lavados del anticuerpo secundario (Cy3 anti ratón de cabra 1:300), se incubó el colorante de lípidos neutros (BODIPY® 493/503 1:1500) diluido en PBS 1X durante 30 min a 37 °C, se lavó con PBS 1X durante 10 min y finalmente por 30 min con agua destilada. La preparación se montó en portA.O.bjetos con Vectashield H-100 ®, y se analizó por microscopia confocal en un microscopio Leica, TCS SP5.

De igual forma, para el análisis de PLIN-2 y N el protocolo seguido fue el descrito previamente modificando el detergente en las soluciones por Saponina 0.1 %, así como los anticuerpos primarios N (1:100 GTX36623) y PLIN-2 (1:50, ab78920) y se adicionó un anticuerpo secundario en la tinción para evidenciar PLIN-2 (FITC anti ratón de cabra) a una dilución 1:200.

Todas las imágenes digitales fueron capturadas en un microscopio Leica, TCS SP5 de tres a cinco campos representativos y procesadas en ImageJ para ajustar la escala de pixeles a 8 bits, posteriormente se definió un umbral de intensidad para separar los pixeles del objeto con los del fondo para expresar en área ( $\mu\text{m}^2$ ) la señal de BODIPY. Se seleccionó la escala expresada como  $\mu\text{m}^2$  partiendo de una imagen en la que la distancia en pixeles correspondía a una distancia conocida en  $\mu\text{m}$ , adicionalmente se eligieron los rangos de tamaño para las partículas entre 0.1-15 ( $\text{pixel}^2$ ) con una circularidad de 0.00-1.00, entendiendo como circularidad la circunferencia de la partícula. Finalmente los datos se graficaron como área total en  $\mu\text{m}^2$  de la señal de BODIPY tanto para los infectados como el Mock.

## **7.8 Viabilidad celular por el método colorimétrico de MTT**

Se condujo un ensayo de estimulación de las GL con Ácido oleico (A.O.) (SIGMA), un ácido graso monoinsaturado que estimula la biogénesis de GL. Para ello se realizó una curva de viabilidad celular por el método colorimétrico de MTT (3-(4,5-di metil tiazol -2-il)-2,5-di fenil tetrazolio bromuro). En una placa de 96 pozos se cultivaron 22,000 células por pozo para obtener una monocapa confluyente, 24h después se retiró el medio y se adicionó el ácido oleico a diferentes concentraciones de: 0.1, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40 mM y se adicionaron otros controles como; etanol absoluto, el vehículo en que se diluyo el A.O., y el control sin tratamiento, al cual se le adicionó medio base y se dejó incubando el tratamiento por 24 h a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Concluido el tratamiento, se lavaron los pozos con F12/DMEM y se adicionó un volumen de 100 µL de F12/DMEM-MTT (1:10). Adicionalmente se incluyeron pozos con la misma solución sin células como blanco y se dejó el tratamiento durante 1.5-2 h cubierto con aluminio a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Finalizado el periodo de incubación se adicionó 100 µL de una solución para disolver la sal de formazan formada por el MTT que constaba de Isopropanol, Ácido clorhídrico concentrado y Tritón, que se dejó en incubación durante 1.5 h a 36 rpm cubierto con aluminio a 37 °C. Finalmente se leyó la placa a 570 nm en el equipo Synergy<sup>TM</sup> HT (BioTek). La curva de viabilidad se realizó por triplicado para establecer la dosis efectiva no tóxica, que se empleó para realizar ensayos de inmunofluorescencia.

## **7.9 Determinación del efecto que produce el estímulo de las gotas lipídicas en la infección con VSR**

Con la finalidad de determinar si las gotas lipídicas influyen sobre el ciclo de infección del VSR, una vez establecida la concentración óptima de A.O. Se cultivaron células A549 como se describe en el apartado de cinética de infección de células A549 con el VSR, se infectaron a 5 MOI dejado 2 h de adsorción y transcurrido este periodo, se retiró el inóculo y se adicionó el medió con las

concentración definida de A.O. (0.20 mM) incluyendo los respectivos controles, sin tratamiento y el vehículo, 24 h post-infección y post-tratamiento para analizar el efecto del estímulo de las GL en la infección empleando un ensayo de IF descrito previamente.

## **8. RESULTADOS**

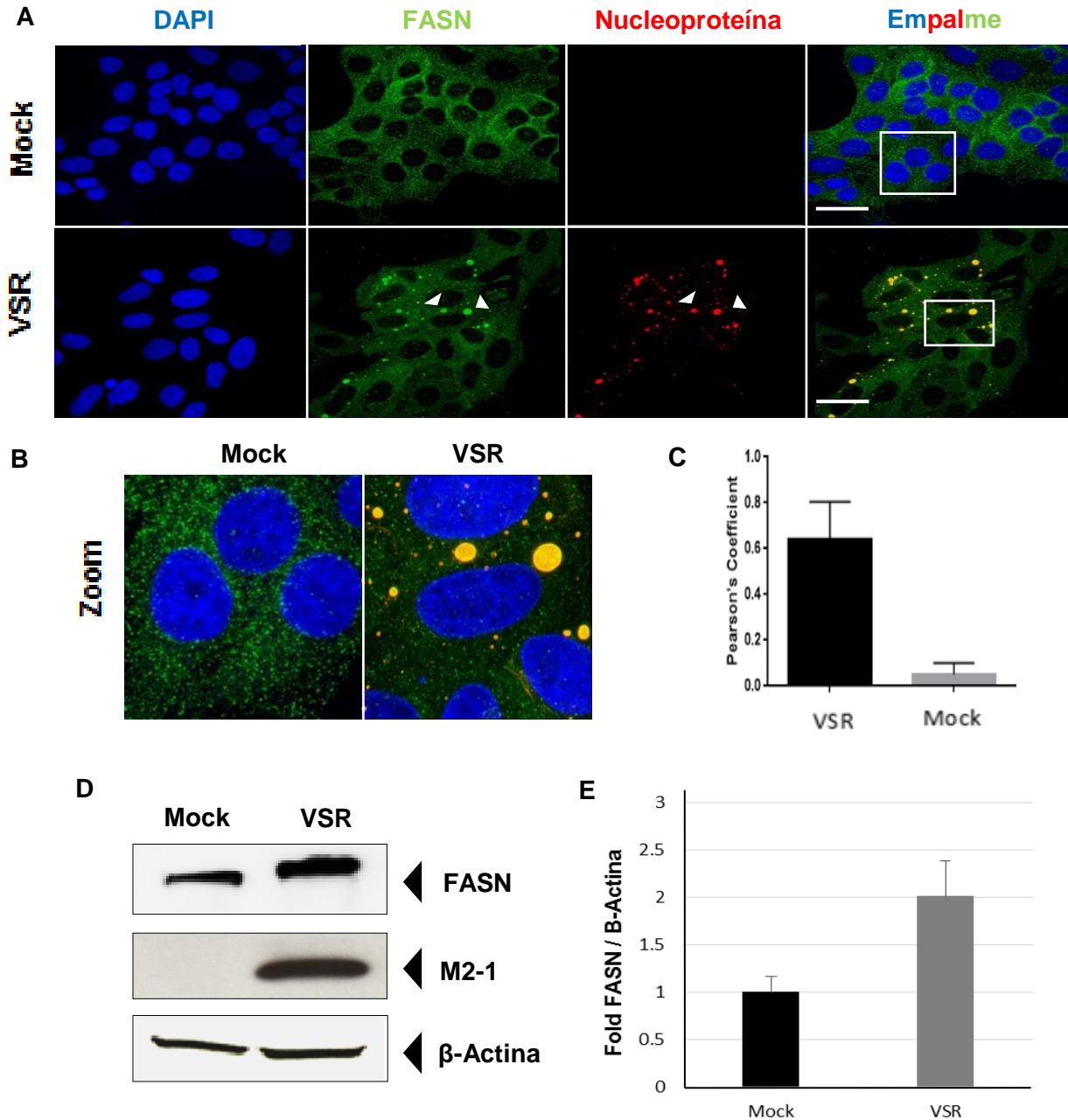
### **8.1 Efecto de la infección por VSR en la enzima FASN en células HEp-2**

Las evidencias generadas acerca del papel de los lípidos en el ciclo de infección viral establecen fuertemente una dependencia a través de la regulación de enzimas lipogénicas como FASN. Por ello, se evaluó mediante ensayos de inmunofluorescencia y WB la distribución celular y expresión de FASN en células HEp-2, infectadas con VSR a 5 MOI, 24 h post-infección (Fig. 9). Encontrando que durante la infección hubo un cambio en la distribución subcelular de FASN (Fig. 9A), lo primero que se observó fue una evidente disminución de la intensidad de la señal en el citoplasma celular y un reclutamiento de FASN en regiones celulares donde la proteína viral N fue identificada, interesantemente la proteína N es un marcador de las estructuras virales conocidas como IB's (flechas blancas), estructuras donde ocurren: la replicación del genoma viral y el ensamblaje de partículas virales (Fig. 9B). Adicionalmente, un análisis de correlación de Pearson determino un valor de 0.7 (Fig. 9C) sugiriendo que ambas proteínas comparten un mismo plano focal y en relación con ello una cercanía en las células infectadas. Un análisis por Western Blot nos permitió identificar que la expresión de FASN se ve incrementada durante la infección, no siendo así en el Mock, confirmado por un análisis densitométrico semi-cuantitativo que muestra un incremento en la expresión de aproximadamente el 60 % respecto al Mock (Fig. 9D y E).

### **8.2 Efecto de la infección por VSR en las GL**

Una vez establecido que una enzima lipogénica como FASN se encontraba incrementada, se prosiguió a evaluar a uno de los organelos relacionados de manera importante en la homeostasis del metabolismo lipídico, las GL, empleando un colorante de lípidos neutros (BODIPY) en una cinética de infección (6, 12, 16 y 24 h) en células A549, con 2 marcadores virales N y (12, 16 y 24 h) M2-1 del VSR

(Fig. 10 y 11) con la finalidad de observar la distribución celular de las GL durante la infección.

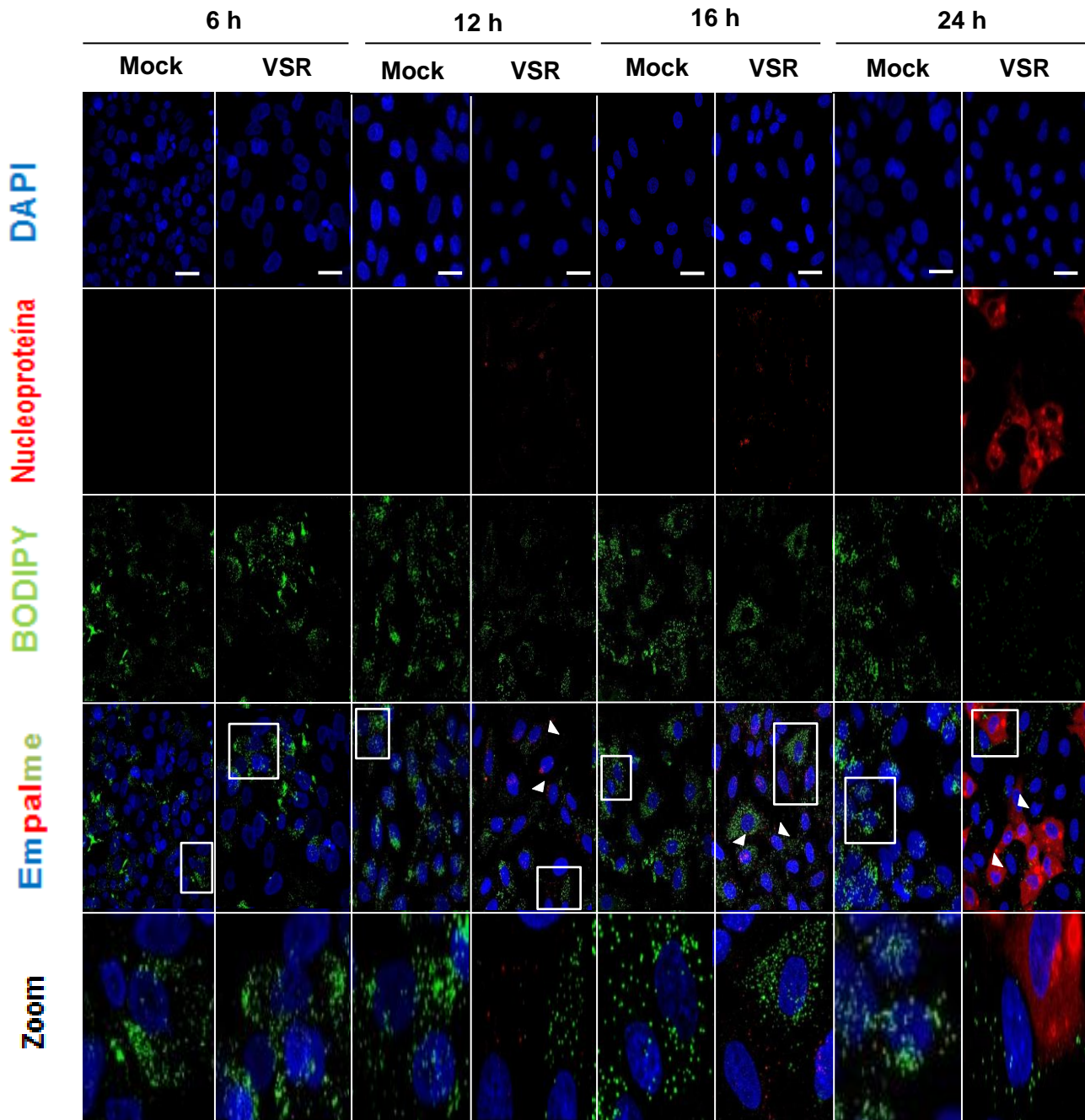


**Figura 9. El RSV promueve un aumento de FASN en las células HEP-2.** A) Las células HEP-2 infectadas con VSR fueron analizadas por microscopía confocal para la detección de FASN y Nucleoproteína 24 hpi; observando la colocalización y el aumento de FASN en las células infectadas. B) Zoom 3.8 x de la colocalización de FASN y Nucleoproteína en IB en células HEP-2 infectadas y Mock. C) Gráfica del análisis del coeficiente de correlación de Pearson de la colocalización entre Nucleoproteína y FASN. D) Niveles de FASN y proteína viral M2-1 se analizaron mediante un ensayo de WB de células HEP-2 infectadas con el VSR (5 MOI) durante 24 h y el control negativo. E) Los niveles de FASN se cuantificaron por densitometría en células HEP-2 y los valores se normalizaron con  $\beta$ -Actina y se calculó la relación de cambio. Barra de escala representa 20  $\mu$ m.

En la Fig. 10 se muestra el patrón de distribución de las GL en la cinética de infección con el marcador viral de la proteína N del VSR, donde a partir de las evidencias generadas para otros virus, se esperaba una co-localización entre N y las GL, con o sin un cambio aparente en la distribución de las GL, sin embargo interesantemente se identificó que la intensidad de la señal para BODIPY se redujo respecto al control (Mock) desde tiempos tempranos (12 h), sin embargo a 6 h no es evidente un cambio, lo cual refleja de alguna forma que el fenómeno es dado por la infección, ya que se ha descrito que un ciclo de infección se completa entre 12-16 h, cabe señalar que esta reducción se mantuvo hasta tiempos tardíos (24 h) sugiriendo fuertemente que existe un decremento de los lípidos de estos organelos durante la infección, partiendo de la idea que BODIPY tiñe exclusivamente lípidos neutros, los cuales están enriquecidos en estos organelos. Adicionalmente, es importante hacer notar que aquellas regiones de mayor señal de infección presentaban una disminución más marcada de la señal para BODIPY, incluso en algunas casi ausente respecto a aquellas en las que se observó indicios de la infección, o que no estaban infectadas (Fig. 10 Zoom). Por otro lado, también se analizó el patrón de distribución de las GL empleando a la proteína viral M2-1 como marcador de infección (Fig.11). Donde se observó un patrón similar al mostrado con la proteína N.

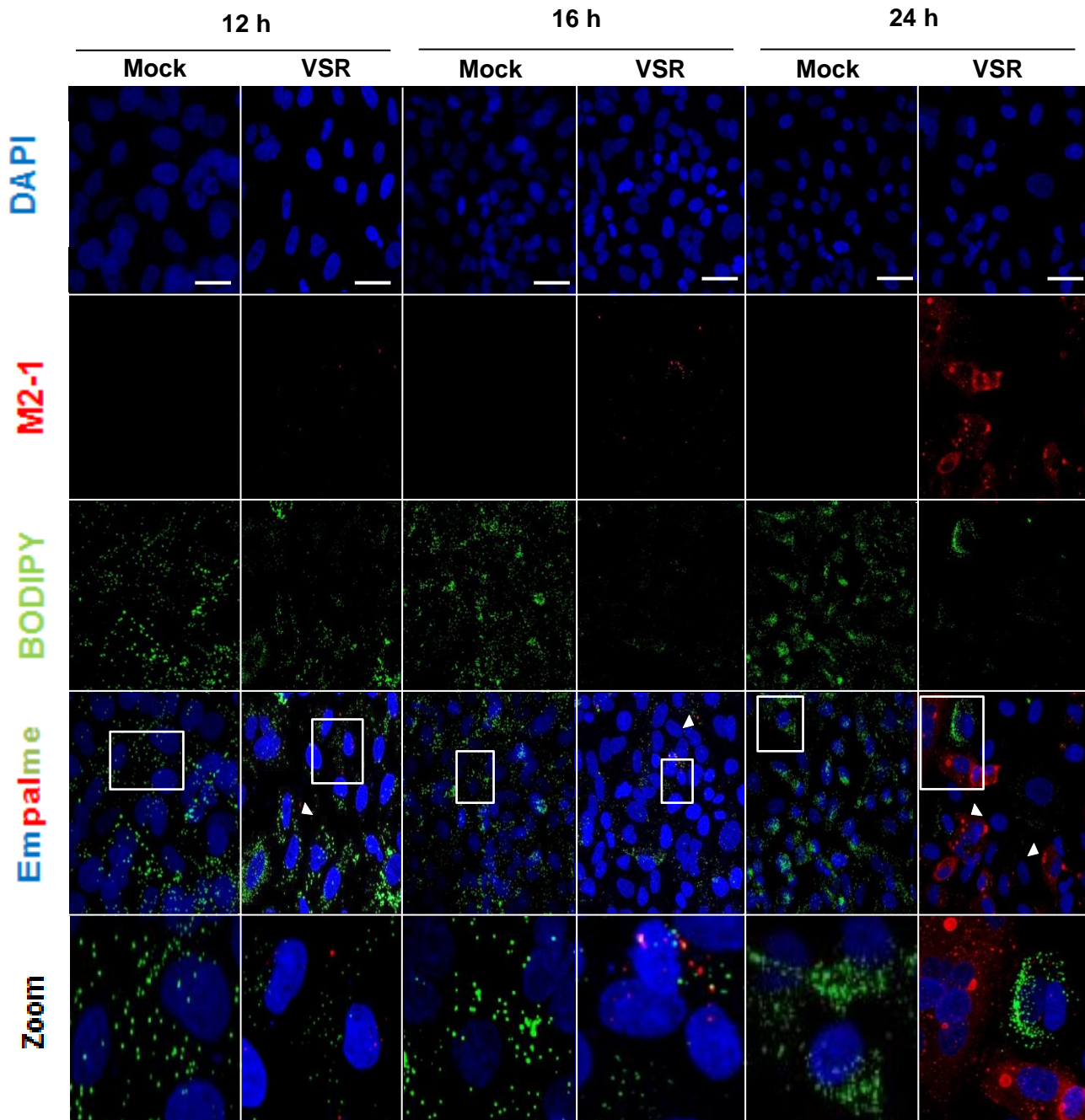
A partir de los datos obtenidos de la cinética de infección, los experimentos posteriores se desarrollaron tomando 24 h como parámetro de infección para evaluar el papel de las GL y N como marcador viral. Uno de los ensayos realizados fue evaluar Perilipina 2 (PLIN-2 o ADRP), una proteína ampliamente usada como marcador de GL que no es específica de tejido y participa de manera importante en el mantenimiento y función de las GL's (Fig.12). Los resultados obtenidos indican que en las células A549 falsamente infectadas, PLIN-2 tiene un patrón de distribución en forma de puntos, similar al patrón observado con BODIPY, el cual pareciera disminuye durante la infección con VSR, puesto que parte de la señal se observó más como un patrón homogéneo en el citoplasma, que como un patrón de puntos como se observó en el Mock.



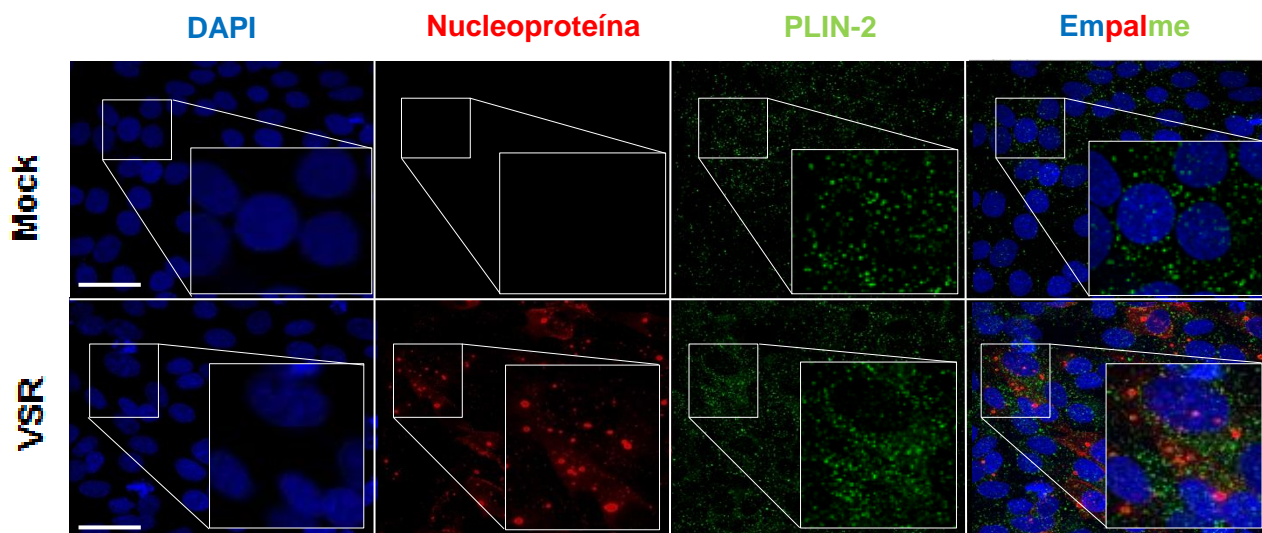


**Figura 10. VSR induce una disminución de las GL en células A549.** Cinética de infección en células A549 infectadas con VSR, fueron analizadas por microscopía confocal para la detección de GL y Nucleoproteína 24 h.p.i. a 5 MOI. Las imágenes corresponden a imágenes representativas de un ensayo, a un aumento de 63x, el zoom corresponde a los recuadros blancos presentes en el empalme y las flechas blancas a zonas de interés. Barra de escala representa 20  $\mu$ m.





**Figura 11. VSR induce una disminución de las GL en células A549.** Cinética de infección en células A549 infectadas con VSR, fueron analizadas por microscopía confocal para la detección de GL y M2-1 24 h.p.i. a 5 MOI. Las imágenes corresponden a imágenes representativas de un ensayo, a un aumento de 63x, el zoom corresponde a los recuadros blancos presentes en el empalme y las flechas blancas a zonas de interés. Barra de escala representa 20  $\mu$ m.



**Figura 12. Patrón de distribución de PLIN-2 en células A549 infectadas con VSR.** Se muestran imágenes de microscopía confocal de células A549 infectadas con VSR 24 h.p.i. las gotas lipídicas fueron evidenciadas empleando el marcador de PLIN-2 una proteína presente en la superficie de las GL, las imágenes se visualizan en aumento de 63x. Barra de escala representa 20  $\mu\text{m}$ .

Dados los datos anteriores, los ensayos de inmunofluorescencia básicamente nos sugerían una disminución de la señal de BODIPY y para poder establecer esto y evidenciar de manera contundente estos cambios, se realizó un análisis cuantitativo de las imágenes digitales empleando la herramienta de análisis de partículas en el programa ImageJ como se describió anteriormente.

El análisis de partículas nos permitió expresar la señal de BODIPY en área ( $\mu\text{m}^2$ ) (Fig. 13). De tal forma que al comparar los datos de la cinética con el respectivo control de infección (Mock), observamos de manera contundente que en la infección, la señal de BODIPY disminuye (Fig. 13A), por otro lado, con la finalidad de establecer si el tamaño era exclusivamente el que se veía modificado, se realizó un análisis de la señal de BODIPY como el número de puntos por célula, que hablaría de alguna forma que no solo disminuye el tamaño, si no el número de gotas, y en ese sentido es claro observar que durante la infección disminuye no solo el contenido, si no el número de GL (Fig. 13B).

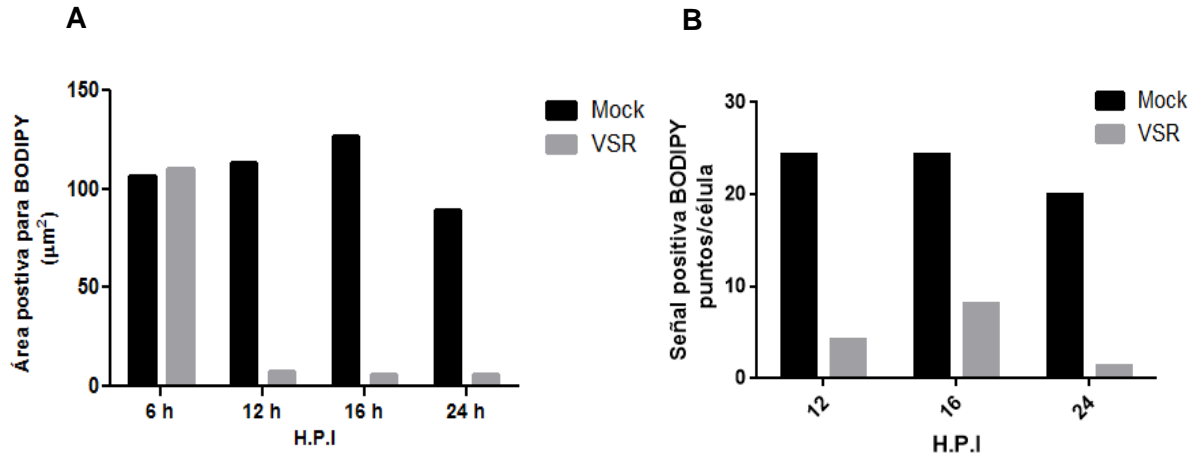
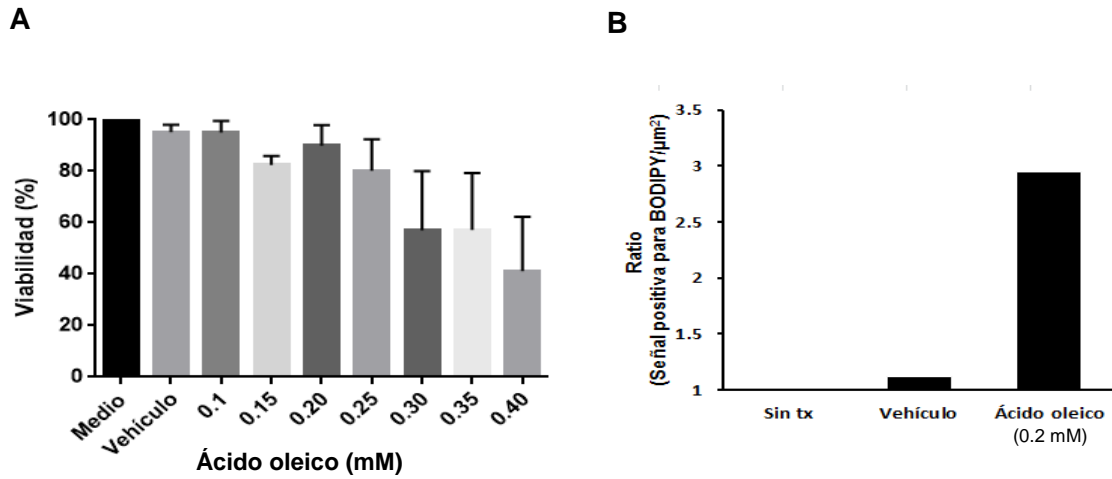


Figura 13. El área de las gotas de lipídicas disminuye en células infectadas con VSR. A) Cuantificación del área total positiva de BODIPY por  $\mu\text{m}^2$  B) Cuantificación del número de puntos de BODIPY por célula. Las imágenes representan la señal de BODIPY expresada en área de 3 campos independientes a un aumento de 63x, analizados mediante la herramienta, análisis de partículas en ImageJ. H.P.I: horas post-infección

### 8.3 Efecto del estímulo de las GL con Ácido oleico (A.O.) sobre la infección del VSR en células A549.

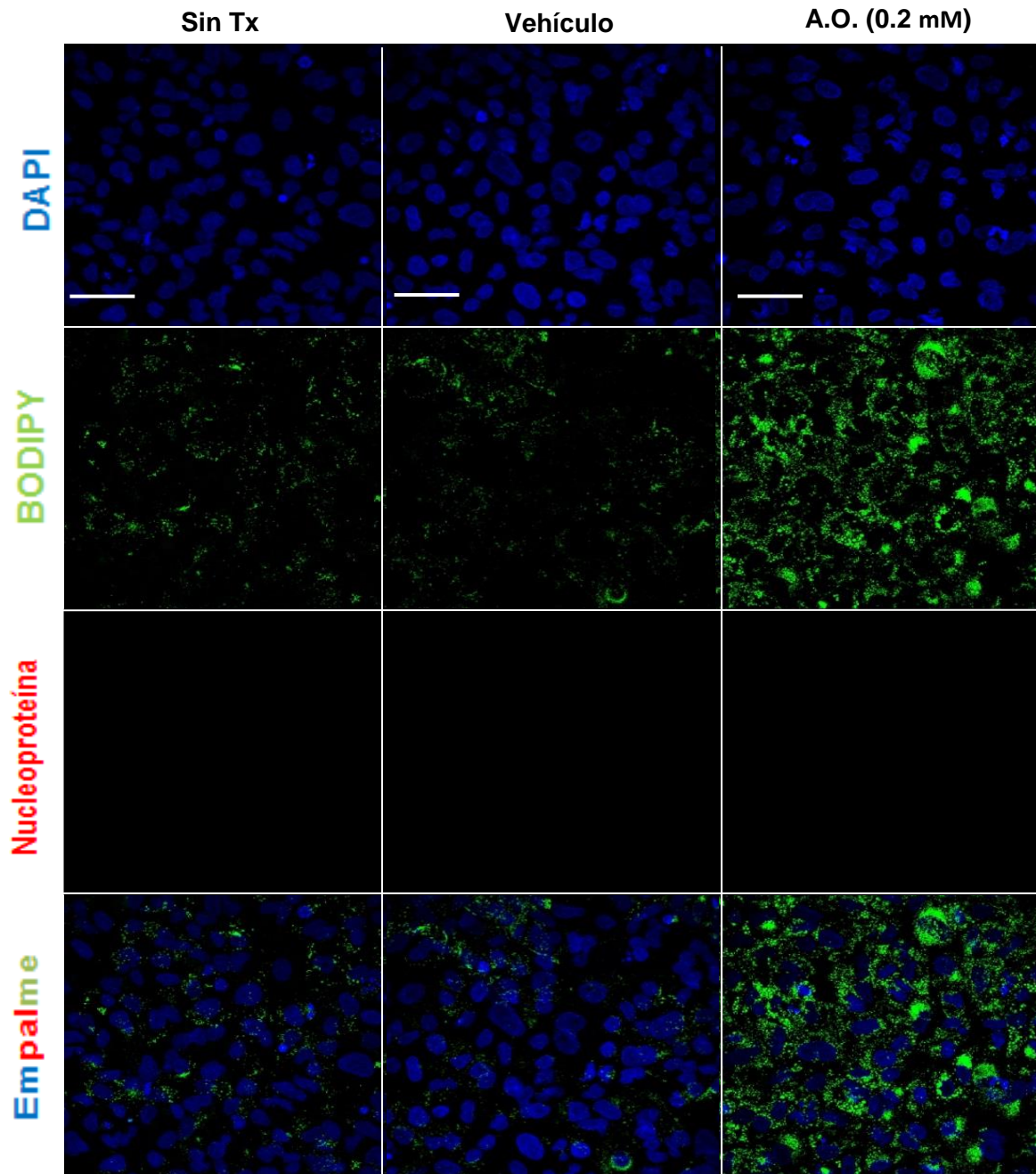
Una vez establecida la disminución del tamaño y número de las GL durante el ciclo de infección, se realizó un ensayo preliminar sobre el efecto del estímulo de las GL en la infección con VSR a través de inmunofluorescencia, para el cual previamente se evaluó la concentración mínima no tóxica de Ácido oleico empleando el ensayo de viabilidad por MTT (Fig. 14A), en el cual se eligió aquella en la que la viabilidad no fuera menor al 60%, dejando entonces las concentraciones de 0.2 mM para los ensayos, de igual forma, con la finalidad de evidenciar el efecto, se calculó la proporción en la que incrementa la señal de BODIPY de manera cuantitativa, encontrando que el estímulo promueve un incremento de la señal 3 veces más (Fig. 14B), donde se observa que el estímulo no solo incrementó en número, si no el tamaño de las GL en comparación con las células no tratadas y las tratadas con el vehículo (Etanol) (Fig. 15). Una vez establecidas las condiciones, se evaluó durante la infección el efecto del estímulo de las GL. Donde logramos observar de forma sugerente que durante el estímulo de las GL, la intensidad de la señal así como el porcentaje de infección parecían

ser mayores en comparación con los tratamientos con medio suplementado y etanol (Fig. 16), de igual forma es importante hacer notar que se observó un patrón similar al observado en la cinética de infección; es decir, el fenómeno de disminución de las GL se conservó en las células tratadas con A.O. observándose menor número y tamaño.

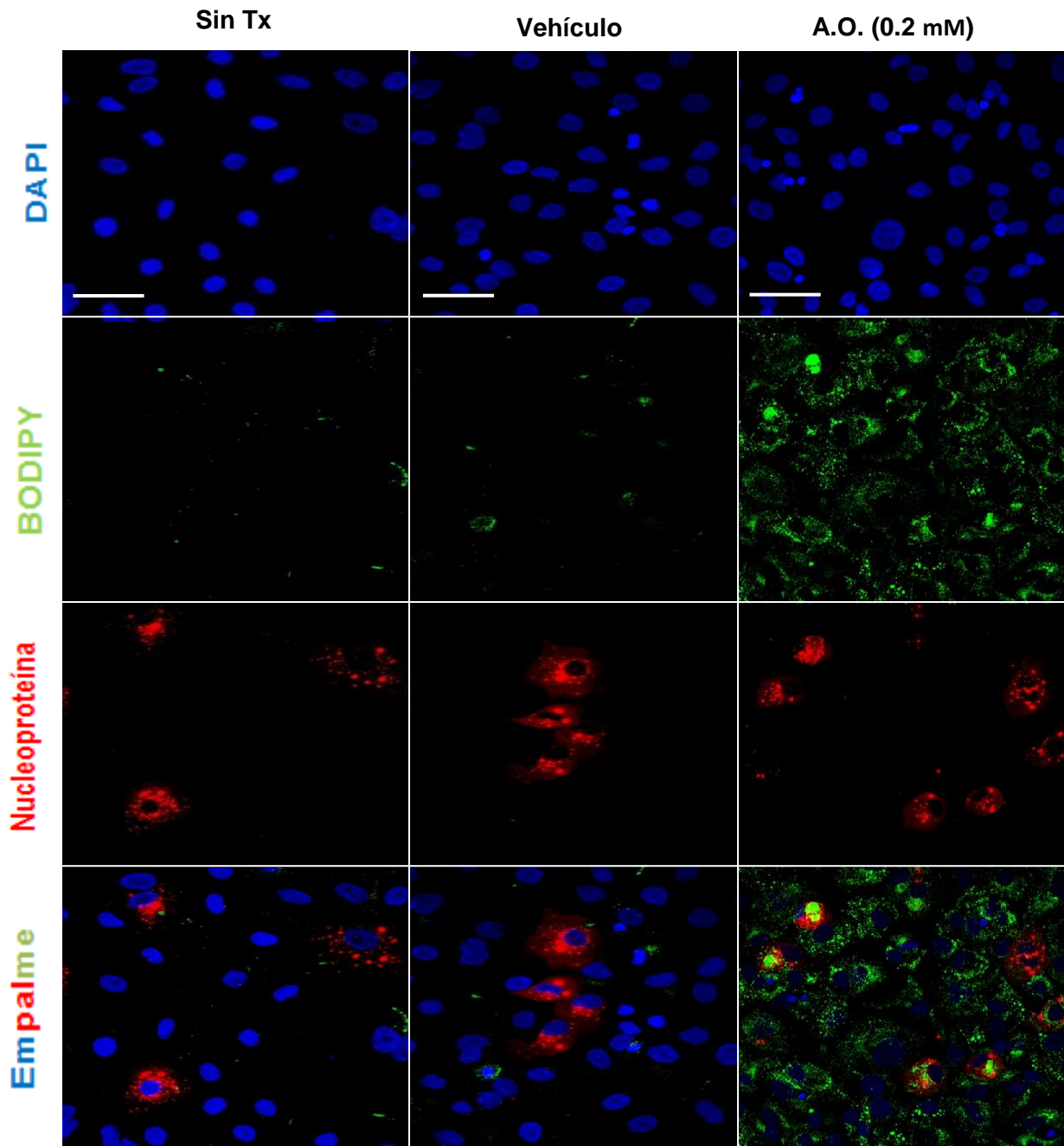


**Figura 14. Estimulo de células A549 con ácido oleico.** A) Gráfica del ensayo de viabilidad por el método de MTT para establecer la concentración mínima no tóxica de ácido oleico B) Los valores del área de BODIPY se normalizaron con el área de las células tratadas con el medio suplementado y se calculó la razón de cambio del área para el tratamiento con el vehículo y con ácido oleico





**Figura 15. El tratamiento con ácido oleico incrementa el tamaño y número de GL.** Células A549 falsamente infectadas fueron teñidas con BODIPY en tres condiciones Sin Tx: se le adicionó medio F12K suplementado, Vehículo: Etanol puro y A.O. (0.2mM): ácido oleico a una concentración establecida de acuerdo a los ensayos de viabilidad. Cada tratamiento se colocó 2 h después del tratamiento con el virus inactivado por calor y se evaluó 24 h después. . Barra de escala representa 20  $\mu$ m.



**Figura 16.** El estímulo de las GL promueve un incremento en la infección del VSR. Se evaluó por microscopia confocal células A549 infectadas con VSR; tratadas con medio F12K suplementado, vehículo y con A.O. 24 h.p.i y se muestran las imágenes a un aumento de 40X. . Barra de escala representa 20  $\mu$ m.

## 9. DISCUSIÓN

El Virus Sincitial Respiratorio es un patógeno respiratorio importante a nivel mundial, ya que es una de las principales causas de infecciones del tracto respiratorio durante la infancia, siendo la causa más común de bronquiolitis aguda y neumonía viral en niños menores de dos años y la segunda causa más común de mortalidad infantil post-neonatal en todo el mundo después de la malaria (Perk & Özdil, 2018). Actualmente se ha relacionado causalmente con sibilancias recurrentes y asma tardío. No obstante, hasta la fecha no se dispone de un tratamiento específico para las infecciones por VSR, siendo la inmunoprofilaxis con palivizumab el único tratamiento en conjunto con terapia paliativa de los síntomas, lo cual genera un impacto económico significativo (Bhuiyan *et al.*, 2017, Perk & Özdil, 2018).

Por lo cual, generar información de los mecanismos virales de infección se vuelve necesario para conocer los procesos de patogenicidad que permitan abordar la problemática. Y es por ello, que en los últimos años los lípidos celulares y el metabolismo lipídico, han tomado una gran importancia durante las infecciones virales, ya que los virus han desarrollado interacciones dinámicas y complejas con el metabolismo lipídico durante su ciclo de infección; y la proteína FASN, ha sido una molécula que de manera particular ha adquirido relevancia, ya que su función principal es la biosíntesis de ácidos grasos (Menendez & Lupu, 2007) y para la cual recientemente se ha descrito que es reclutada por un amplio rango de virus. Existen evidencias de que la inhibición química de FASN provoca una reducción de la progenie viral tanto *in vitro* como *in vivo* del VSR, así como otros virus respiratorios (Rinovirus y el Virus de la influenza), reduciendo significativamente la formación de partículas virales, la infectividad y la replicación del RNA viral; lo cual se ha relacionado con la reducción en la síntesis de palmitato por FASN; que podría estar afectando las “*lipid rafts*” y así mismo la síntesis de proteínas que dependen de este precursor (palmitoilación), como la proteína F (Ohol *et al.*,



2015), sin embargo hasta el momento no han sido caracterizados cambios en la expresión de FASN y su distribución celular durante la infección con VSR (Fig. 9).

Nuestros ensayos, revelaron que las células HEp-2 infectadas con VSR producen un incremento en la síntesis de FASN, similar a lo observado en células infectadas con el virus de la Hepatitis C (HCV), donde la expresión de FASN se ve incrementada, así como su actividad en presencia de la proteína NS4B y cápside (Nasheri *et al.*, 2013); futuros ensayos serían necesarios para establecer de igual forma si este incremento en la expresión de FASN observado en células infectadas con VSR está ligada también a un incremento de su actividad enzimática.

Las evidencias experimentales con otros virus han demostrado que si bien es cierto no se ve incrementada la expresión de FASN, su actividad pareciera ser necesaria para diferentes miembros de la familia *Flaviviridae*, incluidos Virus del Dengue (DENV), y el Virus del Oeste del Nilo (WNV) (Heaton *et al.*, 2010; Acebes *et al.*, 2011). Ya que durante la replicación de estos virus, FASN cambia su distribución y co-localiza en complejos de replicación viral (RCV). Por ejemplo en DENV, se ha demostrado que la proteína NS3 de DENV interactúa con FASN y la recluta en los RCV dependiente de RAb18 (Heaton *et al.*, 2010, Tang *et al.*, 2014), en el caso de WNV, se ha observado que FASN se concentra en los RC (Acebes *et al.*, 2011). Por lo tanto, analizamos la distribución celular de FASN en la infección con VSR por microscopia confocal, el cual confirmó de alguna manera el marcado incremento en los niveles de FASN, descartando que la intensidad observada era solo producto de un reclutamiento o cambio en la distribución en las células infectadas, además, puso en evidencia que FASN co-localiza en el RCV del VSR (IB's) particularmente con Nucleoproteína, la cual participa regulado eventos de transcripción y replicación, lo que de alguna manera podría sugerir la participación de FASN en estos procesos. Sin embargo son necesarios otros experimentos para establecer si la nucleoproteína es capaz de activar a FASN tal como sucede con HCV, debido a la función que podrían compartir ambas

proteínas (cápside y nucleoproteína), así como el mecanismo por el cual es reclutada FASN a las IB's.

Dadas las funciones de FASN, los datos sugerían fuertemente que el posible incremento de una enzima lipogénica como FASN durante la infección con VSR se reflejara en los niveles de triglicéridos celulares, ya que la reacción central de la síntesis de ácidos grasos es catalizada por FASN a partir de acetil CoA y malonil CoA. Una vez sintetizado, el palmitato puede tener destinos diferentes, que incluyen un alargamiento de las cadenas de acilo de los ácidos grasos, y que pueden usarse para la producción de membrana o el almacenamiento en GL en forma de triacilgliceroles y colesterol esterificado (Menendez & Lupu, 2007). En relación a ello, recientemente se ha destacado que muchos patógenos intracelulares usurpan las GL durante su ciclo de infección cumpliendo funciones muy variadas, incluyendo interacciones directas con las GL, como el HCV (Camus *et al.*, 2013), fuente de energía tal como se describe para DENV (Heaton *et al.*, 2010), o incluso como un depósito donde se almacenan proteínas virales, como la proteína m1 de los Orthoreovirus (Coffey *et al.*, 2006). En ese sentido en la cinética de infección, observamos un cambio en la distribución de la señal para BODIPY, esto con ambas proteínas virales N y M2-1, similar a lo observado con DENV (Heaton *et al.*, 2010), lo cual nos podría hacer pensar que el fenómeno observado con VSR pudiera ser el resultado de un consumo de las reservas energéticas de triglicéridos en las GL, y que podría estar relacionado con la activación de autofagia de GL (lipofagia), lo que da lugar a la liberación de ácidos grasos libres, los cuales se importan a las mitocondrias donde se someten a  $\beta$ -oxidación para genera ATP y así promover un ciclo de infección más eficiente (Heaton *et al.*, 2010), partiendo de ello, algunas evidencias en el ciclo de infección por VSR, podrían apoyar aún más está idea. Es decir durante la infección por VSR se ha descrito que éste es capaz de inducir la activación del flujo de autofagia (Li *et al.*, 2018) a través de la generación de ROS y la activación de la vía AMPK-mTOR (Ortiz *et al.*, 2016).

Por otra parte, algunas evidencias generadas con otros modelos virales como JUNV sugieren mecanismos relacionados más con la respuesta inmune, es decir, ya que durante la infección con JUNV se ha observado una disminución de las GL, consumidas probablemente en la vía antiviral mediada por viperina a nivel de GL's (Cárcamo *et al.*, 2018). Adicional a esto, como previamente se había mencionado, también se evaluó una proteína relacionada de manera importante con las gotas lipídicas, PLIN-2 de la cual observamos un sutil cambio en el patrón de distribución, el cual sería necesario confirmar a través de ensayos de WB, ya que pudiese ser que el cambio observado se deba a la deslocalización de los focos identificados (puntos) y no necesariamente por un cambio en la expresión como se ha reportado para HCV, en el cual aunque el fenómeno observado es completamente opuesto con las GL, las evidencias muestran que en el HCV disminuye la expresión de ADRP al desplazarlo de la superficie de las LD (Ei-Ekiaby *et al.*, 2016).

Como parte del análisis de la cinética de infección y las GL, se evaluaron las imágenes digitales, a partir de las cuales se establecieron dos panoramas; el primero era establecer el área total de BODIPY, la cual confirmaba la disminución de la señal de las GL's sin embargo también evaluamos el número total de focos por célula, que de algún manera nos podría hablar de un cambio en el número de las GL, encontrando que no solo el tamaño si no el número relativo de focos disminuía durante la infección, a diferencia de lo observado con DENV, donde se observó que el número de focos permanecía relativamente sin cambio alguno (Heaton *et al.*, 2010).

Partiendo de la idea básica de la interacción virus-huésped, podemos entonces sugerir que la formación de virus depende de la capacidad metabólica de la célula huésped para proporcionar los metabolitos necesarios, por ello los virus manipulan el metabolismo de la célula huésped para optimizar las necesidades biosintéticas del virus a través de "cambios metabólicos" (Cárcamo *et al.*, 2018), los cuales pueden involucrar los estados celulares y sus correspondientes demandas de energía, en el que los ácidos grasos experimentan  $\beta$ -oxidación para generar acetil

CoA, NADH y FADH<sub>2</sub> en la matriz mitocondrial, para la producción de ATP a través de fosforilación oxidativa que finalmente contribuya con el ciclo de infección viral, ya sea para complementar los requisitos de energía para sus procesos anabólicos o para generar compartimentos de replicación viral, tal como se ha descrito para DENV (Heaton *et al.*, 2010), HCV (Kapadia & Chisari, 2005), Citomegalovirus humano (HCMV) (Munger *et al.*, 2006), Herpes virus asociado a Sarcoma de Kaposi (KSHV) (Bhatt *et al.*, 2012) y el virus Vaccinia (Cárcamo *et al.*, 2018). Sin embargo no descartando así la posibilidad de una estrategia metabólica celular para inhibir la replicación viral a través de “cambios metabólicos antivirales”.

Con la finalidad de buscar una posible relación de las GL´s sobre la replicación del VSR. Se evaluó de forma preliminar el estímulo de la biogénesis de las GL en las células A549 con A.O. y se analizó su efecto sobre la infección, para ello primero se realizó un ensayo de viabilidad celular para establecer la concentración mínima no tóxica de A.O. donde observamos que a diferencia de otros modelos, las concentraciones tóxicas son relativamente bajas, ya que están relacionadas directamente con la capacidad celular de almacenamiento lipídico (Walther & Jr, 2012). En cuanto a la infección pudimos observar de manera sugerente que en aquellas células tratadas con A.O. pareciera ser que incrementa el número de células infectadas, lo que podría hacer sentido de alguna manera a lo observado con otros modelos como lo es con DENV, en donde la infección conduce al procesamiento de las GL celulares para la estimulación de la  $\beta$ -Oxidación (Heaton *et al.*, 2010), y no solo en modelos virales, se ha descrito con otros patógenos intracelulares la dependencia de estos organelos (Roingeard & Melho 2017). Otro modelo que sustenta esta idea es otro virus perteneciente a la familia de los Flavivirus, el HCV, en donde fuertes evidencias sugieren que la infección utiliza vías celulares y  $\beta$ -Oxidación de ácidos grasos (Rasmussen *et al.*, 2011), sustentado por análisis proteómico y lipidómica que han establecido la regulación a la alta de enzimas lipogénicas como 3,2-trans-enoylCoA isomerase (DCI) (Diamond *et al.*, 2010). Aunado a ello aparte de proveer ácidos grasos para la  $\beta$ -Oxidación, la familia *Flaviviridae*, ha generado evidencias experimentales que

demuestran que mientras DENV obtiene ácido grasos vía lipofagia de GL's, HCV activa enzimas relacionadas directamente con la síntesis lipídica a través de la activación de factores transcripcionales de la familia SREBP, el cual finalmente activa enzimas como FASN y HMGCR, que contribuye a modular la biogénesis de las GL's, (Olmstead *et al.*, 2012). Entonces en ese sentido y en relación con las evidencias generadas por nuestro grupo y las de este trabajo, se podría sugerir que la activación de enzimas lipogénicas como ACC, HMGCR, la forma activa del factor transcripcional SREBPc1 por parte del VSR tal como lo estableció González en el 2014 y actualmente FASN, podrían estar contribuyendo a la biogénesis de GL, las cuales estarían siendo empleadas como una fuente de energía constante a través de la liberación de ácidos grasos, que finalmente son llevados a  $\beta$ -Oxidación y con ello incrementar o promover la replicación viral del VSR, como se ha descrito para DENV, HCMV y HSV (Kapadia & Chisari, 2005, Munger *et al.*, 2006, Bhatt *et al.*, 2012). Sin embargo, serán necesarias futuras investigaciones para poder establecer la verdadera conexión entre éste organelo y el metabolismo lipídico en la infección con VSR.

Finalmente, como parte de la interacción patógeno-célula, los virus han desarrollado estrategias que permitan evadir la respuesta antiviral, sin embargo la célula de igual forma es capaz de montar mecanismos en respuesta a estos patógenos modulando el ambiente celular y en ese sentido las evidencias en cuanto a las funciones de las GL durante las infecciones con diferentes patógenos han mostrado diferentes vías a través de las cuales las GL pueden ser empleadas; y una de ellas sugiere que pueden funcionar como plataformas para la síntesis de mediadores pro-inflamatorios, es decir las GL son sitios reconocidos de almacén de ácido araquidónico esterificado y tras la estimulación con patógenos y/o sus componentes, el ácido araquidónico se libera como ácido graso en la GL y entra en las vías de la ciclooxigenasa o lipoxigenasa para generar eicosanoides como PGE2 o leucotrieno B4, lo cual podría de alguna forma contribuir a la disminución en el número de GL durante la infección con VSR (Melo & Weller, 2015).

## **10. CONCLUSIONES**

1. La infección por VSR promueve un incremento en la expresión de FASN en células HEp-2, así como su co-localización en cuerpos de IB's virales del VSR.
2. Las gotas lipídicas disminuyen en tamaño y número durante la infección con VSR en células A549 desde tiempos tempranos de la infección.
3. El estímulo de las gotas lipídicas con Ácido oleico, sugiere fuertemente que las GL incrementan el porcentaje de infección, posiblemente a través de la liberación de ácidos grasos de las GL's, para incrementar la tasa de oxidación y producir más energía.

## **11. PROSPECTIVAS**

- Determinar cambios en la actividad de FASN durante la infección, así como una posible activación dependiente de proteínas virales.
- Evaluar de forma cuantitativa cambios en la abundancia de TAG intracelulares durante la infección con VSR.
- Establecer si inhibidores farmacológicos de GL impactan en el ciclo de replicación del VSR.
- Definir el mecanismo a través del cual las GL son consumidas durante la infección del VSR

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bakker, S. E., Duquerroy, S., Galloux, M., Loney, C., Conner, E., Eleouet, J.-F., Bhella, D. (2013). The respiratory syncytial virus nucleoprotein-RNA complex forms a left-handed helical nucleocapsid. *Journal of General Virology*, 94(8), 1734–1738.
2. Barbosa, A. D., & Siniossoglou, S. (2017). Function of lipid droplet-organelle interactions in lipid homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864(9), 1459–1468.
3. Battles, M. B., & Mclellan, J. S. (2019). Respiratory syncytial virus entry and how to block it. *Nature Reviews Microbiology*. <http://doi.org/10.1038/s41579-019-0149-x>
4. Battles, M. B., Más, V., Olmedillas, E., Cano, O., Vázquez, M., Rodríguez, L., Melero J. A., Mclellan, J. S. (2017). Structure and immunogenicity of pre-fusion-stabilized human metapneumovirus F glycoprotein. *Nature Communications*, 8(1), 1–11.
5. Beato, G. R., Martínez, I., Francí, C., Real, X. F., Barreno, G. B., Melero, A. J., (1996) Host Cell Effect upon Glycosylation and Antigenicity of Human Respiratory Syncytial Virus G Glycoprotein, *Virology*, 221(2), 301-309
6. Berger, K. L., Cooper, J. D., Heaton, N. S., Yoon, R., Oakland, T. E., Jordan, T. X., Mateu, G., Grakoui, A., Randall, G. (2009). Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication, *106(18)*, 7577–7582.
7. Bhatt, A. P., Jacobs, S. R., Freerman, A. J., Makowski, L., Rathmell, J. C., & Dittmer, D. P. (2012). Dysregulation of fatty acid synthesis and glycolysis in non-Hodgkin lymphoma. *109(29)*, 11818-23.
8. Bhuiyan, M. U., Luby, S. P., Ishrat, N., Homaira, N., Ramirez, K. S., Gurley, E. S., Abedin, J., Zaman, U. R., Sanchez, O. R. I., Alamgir, A. S. M. (2017). Costs of hospitalization with respiratory syncytial virus illness among children aged < 5 years and the financial impact on households in Bangladesh. *Journal of Global health*, 7(1), 1–9.



9. Bickel, P. E., Tansey, J. T., & Welte, M. A. (2009). PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(6), 419–440.
10. Blondot, M. L., Dubosclard, V., Fix, J., Lassoued, S., Aumont-Nicaise, M., Bontems, F., ... Sizun, C. (2012). Structure and functional analysis of the RNA- and viral phosphoprotein-binding domain of respiratory syncytial virus M2-1 protein. *PLoS Pathogens*, 8(5).
11. Brown, G.; Jeffree, C. E.; McDonald, T.; Rixon, H. W.; Aitken, J. D.; Sugrue, R. J. Analysis of the interaction between respiratory syncytial virus and lipid-rafts in Hep2 cells during infection. *Virology*, 2004, 327(2), 175-185.
12. Camus, G., Herker, E., Modi, A. A., Haas, J. T., Ramage, H. R., & Farese, R. V. (2013). Diacylglycerol Acyltransferase-1 Localizes Hepatitis C Virus NS5A Protein to Lipid Droplets and Enhances NS5A Interaction with the Viral Capsid Core \*, 288(14), 9915–9923.
13. Cárcamo P. J. R., Morell, M. L., Vázquez, C. A., & Vatansever, S., Upadhyay, S. A., Overby, K. A., Cordo, M. S., García, C. C. (2018). The interplay between viperin antiviral activity , lipid droplets and Junín mammarenavirus multiplication, 514, 216–229.
14. Chang, T. H., Segovia, J., Sabbah, A., Mgbemena, V., & Bose, S. (2012). Cholesterol-rich “lipid rafts” are required for release of infectious human respiratory syncytial virus particles. *Virology*, 422(2), 205–213.
15. Cheng X, Park H, Zhou H, Jin H. (2005). Overexpression of the M2-2 protein of respiratory syncytial virus inhibits viral replication. *Journal of Virology*, 79(22), 13943–13952.
16. Chukkapalli, V., Heaton, N. S., & Randall, G. (2012). Lipids at the interface of virus-host interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 15(4), 512–518.
17. Coffey, C. M., Sheh, A., Kim, I. S., Chandran, K., Nibert, M. L., & Parker, J. S. L. (2006). Reovirus Outer Capsid Protein  $\sigma$  1 Induces Apoptosis and Associates with Lipid Droplets , Endoplasmic Reticulum , and Mitochondria, 80(17), 8422–8438. <http://doi.org/10.1128/JVI.02601-05>

18. 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- 389.
19. Collins, P. L., & Graham, B. S. (2008). Viral and Host Factors in Human Respiratory Syncytial, *Journal of Virology* 82(5), 2040–2055.
20. Ding, Y., Wu, Y., Zeng, R., & LiA.O., K. (2012). Proteomic profiling of lipid droplet-associated proteins in primary adipocytes of normal and obese mouse. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 44(5), 394–406.
21. El-ekiaby, N. M., Mekky, R. Y., Riad, S. E., Elhelw, D. S., El-sayed, M., Esmat, G., & Abdelaziz, A. I. (2017). miR-148a and miR-30a Limit HCV-Dependent Suppression of the Lipid Droplet Protein, ADRP, in HCV Infected Cell Models. *Journal of Medical Virology*, 89 653–659.
22. Esteban, M. (2014). La proteína no-estructural NS1 exclusiva del virus respiratorio sincicial: mecanismo de plegamiento y ensamblado espontáneo de oligómeros esféricos estables. (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.). Recuperado de [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n5494\\_Pretel](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5494_Pretel).
23. Filipe, A., & McLauchlan, J. (2015). Hepatitis C virus and lipid droplets: Finding a niche. *Trends in Molecular Medicine*, 21(1), 34–42.
24. Galloux, M., Gabiane, G., Sourimant, J., Richard, C.-A., England, P., Moudjou, M., ... Eléouët, J.-F. (2015). Identification and Characterization of the Binding Site of the Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein to RNA-Free Nucleoprotein. *Journal of Virology*, 89(7), 3484–3496.
25. Gamiño-Arroyo, A. E., Moreno, S. Lamosa, B. Ortiz, A. Guerrero, M. et al (2016) Epidemiology and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infections among children and adults in Mexico. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 11(1): pp 48–56
26. Gan, S. W., Tan, E., Lin, X., Yu, D., Wang, J., Tan, G. M. Y., ... Torres, J. (2012). The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. *Journal of Biological Chemistry*, 287(29), 24671–24689.

27. García, J., Barreno, G. B., Vivo, A., Melero, A José. (1993). Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells 195(1), 243-247.
28. González-García, L. D. (2017). Papel de la AMP cinasa en la activación del metabolismo lipídico durante la infección del virus sincitial respiratorio (VSR) en la línea celular BEWO (Tesis de maestría). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México.
29. Griffiths, C. Drews, S. Marchant, D. (2016). Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. *Clinical Microbiology Reviews*. 30(1): pp.277-319
30. Hinson, E. R., & Cresswell, P. (2009). The antiviral protein, viperin, localizes to lipid droplets via its N-terminal amphipathic-helix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(48), 20452–20457.
31. Horton, M., Read, J. C., Fitton, D., Toth, N., & Little, L. (2012). Too cool at school - Understanding cool teenagers. *PsychNology Journal*, 10(2), 73–91.
32. Itabe, H., Yamaguchi, T., Nimura, S., & Sasabe, N. (2017). Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins. *Lipids in Health and Disease*, 16(1), 1–11.
33. Johnson, S. M., McNally, B. A., Ioannidis, I., & Flano, E. (2015). Respiratory Syncytial Virus Uses CX3CR1 as a Receptor on Primary Human Airway Epithelial Cultures. *PLoS Pathogens*, 11(12) 1–16.
34. Kapadia, S. B., & Chisari, F. V. (2004). Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *PNAS*, 102(7):2561-6
35. Ke, Z., Dillard, R. S., Chirkova, T., Leon, F., Stobart, C. C., Hampton, C. M., ... Wright, E. R. (2018). The Morphology and Assembly of Respiratory Syncytial Virus Revealed by Cryo-Electron Tomography. *Viruses*, 10(8) e446
36. Krusat, T., & Streckert, H. (1997). Heparin-dependent attachment of respiratory syncytial virus ( RSV ) to host cells. *Arch Virol*, 142(6), 1247–1254.
37. Krzyzaniak, M. A., Zumstein, M. T., Gerez, J. A., Picotti, P., & Helenius, A. (2013). Host Cell Entry of Respiratory Syncytial Virus Involves

- Macropinocytosis Followed by Proteolytic Activation of the F Protein, *PLoS Pathog*, 9(4), e100330.
38. Lay, M. K., González, P. A., León, M. A., Céspedes, P. F., Bueno, S. M., Riedel, C. A., & Kalergis, A. M. (2013). Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response. *Microbes and Infection*, 15(3), 230–242.
39. Liljeroos, L., Anna, M., Helenius, A., & Jane, S. (2013). Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(27):11133-8
40. Lo, M. S., Brazas, R. M., & Holtzman, M. J. (2005). Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Proteins NS1 and NS2 Mediate Inhibition of Stat2 Expression and Alpha / Beta Interferon Responsiveness. *Journal of Virology*, 79(14), 9315–9319
41. López, C. M., Ramírez, V. O. (2013). El virus sincitial respiratorio humano : una panorámica, *CENIC* 44(2):1-19
42. Lorizate, M., & , Kräusslich, H-G. (2011). Role of Lipids in Virus Replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3, 1–21.
43. Lu, B., Ma, C.-H., Brazas, R., & Jin, H. (2002). The major phosphorylation sites of the respiratory syncytial virus phosphoprotein are dispensable for virus replication in vitro. *Journal of Virology*, 76(21), 10776–10784.
44. Martín-Acebes, M. A., Vázquez-Calvo, A., Caridi, F., Saiz, J.-C., & Sobrino, F. (2013). Lipid Involvement in Viral Infections: Present and Future Perspectives for the Design of Antiviral Strategies. *Lipid Metabolism*, 291–322.
45. Mastrangelo, P., & Hegele, R. G. (2013). RSV Fusion: Time for a New Model, 873–885.
46. Matano, F. L., Monroy, I. Angeles, J. Sarquiz, B. Palomec, I. et al. (2017). Prevalence of non-influenza respiratory viruses in acute respiratory infection cases in Mexico. *PLoS ONE*. 12(5): pp.1-18

47. Mazzon, M., & Mercer, J. (2014). Lipid interactions during virus entry and infection. *Cellular Microbiology*, 16(10), 1493–1502.
48. McLellan J.S., Ray W.C., Peeples M.E. (2013) Structure and Function of Respiratory Syncytial Virus Surface Glycoproteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Springer, 372, 83-104.
49. Melo, R. C. N., & Weller, P. F. (2016). Lipid droplets in leukocytes: Organelles linked to inflammatory responses. *Experimental Cell Research*, 340(2), 193–197.
50. Menendez, J. A., & Lupu, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis, 7(october). <http://doi.org/10.1038/nrc2222>
51. Mitra, R., Baviskar, P., Duncan-decocoq, R. R., Patel, D., & Oomens, A. G. P. (2012). The Human Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Required for Maturation of Viral Filaments, 86(8), 4432–4443.
52. Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production, *Nature cell biology*, 9(9).
53. Naseri, N., Joyce, M., Rouleau, Y., Yang, P., Yao, S., Tyrrell, D. L., & Pezacki, J. P. (2013). Article Modulation of Fatty Acid Synthase Enzyme Activity and Expression during Hepatitis C Virus Replication. *Chemistry & Biology*, 20(4), 570–582.
54. Noton, S. L., & Fearn, R. (2011). The first two nucleotides of the respiratory syncytial virus antigenome RNA replication product can be selected independently of the promoter terminus. *Rna*, 17(10), 1895–1906.
55. Ohol, Y. M., Wang, Z., Kemble, G., & Duke, G. (2015). Direct Inhibition of Cellular Fatty Acid Synthase Impairs Replication of Respiratory Syncytial Virus and Other Respiratory Viruses, 1–20.
56. Ohrum, S. K., Cayatte, C., Bennet, S. A., Rajani, G. M., Mctamney, P., Nacel, K., & Hostetler, L. (2017). Immunization with Low Doses of Recombinant Postfusion or Prefusion Respiratory Syncytial Virus F Primes

- for Vaccine-Enhanced Disease in the Cotton Rat Model Independently of the Presence of a Th1-Biasing (GLA-SE) or Th2-Biasing (Alum) Adjuvant, *Journal of General Virology*, 91(8), 1–19
57. Olzmann, J. A., & Carvalho, P. (2018). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.20, 137-155.
58. Ortiz, C. S. L., Cuervo, N. Z., & Grandvaux, N. (2016). Respiratory Syncytial Virus and Cellular Stress Responses : Impact on Replication. *Viruses*, 8(5), 1-16.
59. Peeples, M. E., & Collins, P. L. (2000). Mutations in the 5' Trailer Region of a Respiratory Syncytial Virus Minigenome Which Limit RNA Replication to One Step. *Journal of Virology*, 74(1), 146–155.
60. Perk, Y., & Özdil, M. (2018). Respiratory syncytial virüs infections in neonates and infants, *Turk Pediatri Ars*, 53(2): 63–70
61. Persson, B. D., Jaffe, A. B., Fearn, R., & Danahay, H. (2014). Respiratory Syncytial Virus Can Infect Basal Cells and Alter Human Airway Epithelial Differentiation, *9(7)*, 1–15.
62. Piedimonte G. y Perez M. (2014). Alternative Mechanisms for Respiratory Syncytial Virus (VSR) Infection and Persistence: CouGL VSR Be Transmitted Through the Placenta and Persist into Developing Fetal Lungs?. *Current Opinion on Pharmacology*. 16: pp.82-87.
63. Pol, A., Gross, S. P., & Parton, R. G. (2014). Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites. *Journal of Cell Biology*, 204(5), 635–646.
64. Pretel, E., Camporeale, G., & de Prat-Gay, G. (2013). The Non-Structural NS1 Protein Unique to Respiratory Syncytial Virus: A Two-State Folding Monomer in Quasi-Equilibrium with a Stable Spherical Oligomer. *PLoS ONE*, 8(9), e74338.
65. Ramaswamy, M., Shi, L., Varga, S. M., Barik, S., Behlke, M. A., & Look, D. C. (2006). Respiratory syncytial virus nonstructural protein 2 specifically inhibits type I interferon signal transduction. *Virology*, 344, 328–339.

66. Rasmussen, A. L., Diamond, D. L., Mcdermott, J. E., Gao, X., Metz, T. O., Matzke, M. M., ... Katze, M. G. (2011). Systems Virology Identifies a Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Enzyme , Dodecenoyl Coenzyme A Delta Isomerase , Required for Hepatitis C Virus Replication and Likely Pathogenesis. *Journal of Virology*, 85(22), 11646–11654.
67. Rima, B., Collins, P., Easton, A., Fouchier, R., Kurath, G., Lamb, R., Lee, B., Maisner, A., Rota, P., Wang, L., and ICTV Report Consortium. (2017), ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae, *Journal of General Virology*, 98, 2912–2913.
68. Rincheval, V., Lelek, M., Gault, E., Bouillier, C., Sitterlin, D., Blouquit-Laye, S., Galloux, M., Zimmer, C., Elecuet F. J., Rameix-Welti, M.-A. (2017). Functional organization of cytoplasmic inclusion bodies in cells infected by respiratory syncytial virus. *Nature Communications*, 8(1), 1-11.
69. Rodríguez-Auad, J. P. Nava, M. Casasola, J. Johnson, M. Nava, A. et al. (2012) The epidemiology and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infection in chiGLren at a public pediatric referral hospital in Mexico. *International Journal of Infectious Diseases*. 16(7), 508-513
70. Roingard, P., & Melo, R. C. N. (2017). Lipid droplet hijacking by intracellular pathogens. *Cellular Microbiology*, 19(1), 1–9.
71. Romero Aguilar L., Guerra Sánchez, G., Pardo J.P., Luqueño Bocado O. I., (2016) Cuerpos lipídicos, organelos metabólicamente activos. *Revista de Educación bioquímica* 35(4), 115-124.
72. Rossi, G. & Colin, A. (2015) Infantile respiratory syncytial virus and human rhinovirus infections: respective role in inception and persistence of wheezing. *European Respiratory Journal*, 45 (3): pp.774-789
73. Samsa, M. M., Mondotte, A. J., Iglesias, G. N., Miranda, A. I., Barbosa, G., Poian, A. T. Da, Bozza, P. T., & Gamarnik, A. V. (2009). Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral PLoS Pathogens, 5(10), e1000632



74. San, H., Vergara, J., Gutiérrez, M. A., & Mohapatra, S. S. (2006). Molecular biology of syncytial respiratory virus and development of prophylactic strategies, *World Allergy Organ J*, 21–28.22, 135–153.
75. San-Juan-Vergara, H., Sampayo-Escobar, V., Reyes, N., Cha, B., Pacheco-Lugo, L., Wong, T. Mohapatra, S. S. (2012). Cholesterol-Rich Microdomains as Docking Platforms for Respiratory Syncytial Virus in Normal Human Bronchial Epithelial Cells. *Journal of Virology*, 86(3), 1832–1843.
76. Schildgen, V., van den Hoogen, B., Fouchier, R., Tripp, R. A., Alvarez, R., Manoha, C., ... Schildgen, O. (2011). Human metapneumovirus: Lessons learned over the first decade. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 734–754.
77. Schobel, S. A., Stucker, K. M., Moore, M. L., Anderson, L. J., Larkin, E. K., Shankar, J. Das, S. R. (2016). Respiratory Syncytial Virus whole- genome sequencing identifies convergent evolution of sequence duplication in the C-terminus of the G gene. *Nature Publishing Group*, 1–11.
78. Shaikh, F. Y., & Crowe Jr, J. E. (2013). Molecular mechanisms driving respiratory syncytial virus assembly. *Future Microbiology*, 8(1), 123–131.
79. shaw, P. J. M., Chiu, C., Culley, F. J., & Johansson, C. (2017). Protective and Harmful Immunity to RSV Infection, 18(3), 541-555
80. Shi, T. McAllister, D. O'Brien, K. Simoes, E. Madhi, S. et al. (2017) Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet*, 390(10098):946-958.
81. Spann, K. M., Tran, K. C., Collins, P. L., & Irol, J. V. (2005). Effects of Nonstructural Proteins NS1 and NS2 of Human Respiratory Syncytial Virus on Interferon Regulatory Factor 3 , NF-κB , and Proinflammatory Cytokines. *Journal of Virology*, 79(9), 5353–5362.

82. Tang, W., Lin, R., Liao, C., & Lin, Y. (2014). Rab18 Facilitates Dengue Virus Infection by Targeting Fatty Acid Synthase to Sites of Viral Replication. *Journal of Virology*, 88(12), 6793–6804.
83. Tawar, R. G., Duquerroy, S., Vonnheim, C., Varela, P. F., Bricogne, G., Rey, F. A. (2014). Crystal Structure of a Nucleocapsid-Like Nucleoprotein-RNA Complex of Respiratory Syncytial Virus. *Science*. 326(5957), 1279–1283.
- 84.** Tripp, R. A., Jones, L. P., Haynes, L. M., Zheng, H., Murphy, P. M., & Anderson, L. J. (2001). CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein, *Nature Immunology* 2(8),732-8.
85. Valdés-ramírez, M. C. O. (2013). El virus sincitial respiratorio humano : una panorámica. *CENIC*, 44(2).
86. Vanni, S. (2017). Intracellular gotas lipídicas: From structure to function. *Lipid Insights*, 10, 14–16.
87. Viegas, M. (2011). Epidemiología molecular del virus sincitial respiratorio en pacientes pediátricos en un período de seis años . *Acta Bioquím Latinoam*, 45(1), 3–45.
88. Viviana, L., Adarme, Á., & Castellanos, J. E. (2013). Diagnóstico virológico de la infección por virus. *Revista Salud Bosque*, Volumen 3(Número 1), Págs. 23–36.
89. Walsh, E. (2016) Respiratory Syncytial Virus Infection An Illness for All Ages. *Clinic in chest Medicine*. 38(1): pp.29-36.
90. Walther, T. C., & Farese, R. V. (2009). The life of lipid droplets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(6), 459–466.
91. Walther, T.C. Chung J., y Fareser, R V. Jr (2017) Lipid Droplet Biogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 33, 491-510.
92. Walther, T.C., y Fareser, R V. Jr (2012) Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 81, 687-714.
93. Welte M.A (2015) Expanding Roles for lipid droplets. *Current Biology* 25(11), 470-481.

94. Wilfling, F., Haas J. T., Whalter, T. C., Farese Jr R. V. (2014) Lipid Droplet Biogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 29, 39-45
  95. Wong, T. M. (2013). Innate Immune Responses to Respiratory Syncytial Virus: Age-associated Changes. *Current topics microbiology immunology*, 372:139-54
  96. Xu, S., Zhang, X., & Liu, P. (2018). Lipid droplet proteins and metabolic diseases , *BBA - Molecular Basis of Disease* 1864(5B), 1968–1983.
  97. Yeo, D. S. Y., Chan, R., Brown, G., Ying, L., Sutejo, R., Aitken, J., ... Sugrue, R. J. (2009). Evidence that selective changes in the lipid composition of raft-membranes occur during respiratory syncytial virus infection. *Virology*, 386(1), 168–182.
  98. Zheng, K., Xiang, Y., Wang, X., Wang, Q., Zhong, M., Wang, S., Wang, S., Fan, J., Kitazato, K., Wang, Y. (2014). Epidermal Growth Factor Receptor-PI3K Signaling Controls Cofilin Activity To Facilitate Herpes Simplex Virus 1 Entry into Neuronal Cells. *mBio*, 5(1), 1-15.
1. URL International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) Extraído el 11 de Agosto del 2018 <https://talk.ictvonline.org/>