



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“Evaluación de la activación de la familia SREBP y las enzimas FAS y HMGCR durante la infección con el virus sincitial respiratorio en la línea celular de placenta humana BeWo “

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO PRESENTA:

LUIS ANTONIO HERRERA MORO HUITRON

Director de Tesis: Dr. Moisés León Juárez

Asesor interno: M en BRA María Judith Villavicencio Macías

Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes

Departamento de inmunobioquímica

2017-2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



El desarrollo del presente trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" en el departamento de inmunobioquímica bajo la dirección del Dr. Moisés León Juárez en colaboración como asesora interna perteneciente a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza la M en BRA. María Judith Villavicencio Macías.

## Índice

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| Abreviaturas.....                                                         | 6  |
| Índice de figuras.....                                                    | 8  |
| Resumen.....                                                              | 9  |
| Abstract.....                                                             | 10 |
| Introducción.....                                                         | 11 |
| Infecciones respiratorias agudas.....                                     | 11 |
| Epidemiología del VSR en México.....                                      | 12 |
| Características generales del virus Sincitial Respiratorio.....           | 12 |
| Taxonomía.....                                                            | 12 |
| Estructura.....                                                           | 13 |
| Características estructurales y funcionales de las proteínas del VSR..... | 14 |
| Proteína de Fusión (F).....                                               | 14 |
| Glicoproteína (G).....                                                    | 14 |
| Proteína pequeña hidrofóbica (SH).....                                    | 15 |
| Proteína de matriz (M).....                                               | 16 |
| Nucleoproteína (N).....                                                   | 16 |
| Fosfoproteína (P).....                                                    | 16 |
| Proteína polimerasa (L).....                                              | 17 |
| Proteína M2-1.....                                                        | 18 |
| Proteína M2-2.....                                                        | 18 |
| Proteínas No Estructurales.....                                           | 18 |
| Ciclo de Infección del VSR.....                                           | 19 |
| Importancia de los lípidos en infecciones virales.....                    | 21 |
| Importancia de los lípidos en infecciones por VSR.....                    | 21 |

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Proteínas celulares que modulan la síntesis de lípidos.....                               | 22 |
| Familia SREBP.....                                                                        | 22 |
| Proteína 1 de unión al elemento regulador de esteroides. (SREBP1) .....                   | 24 |
| Proteína 2 de unión al elemento regulador de esteroides. (SREBP2) .....                   | 24 |
| Blancos enzimáticos de la familia SREBP. ....                                             | 25 |
| Sintasa de ácidos grasos. (FAS).....                                                      | 25 |
| HMG-Coenzima A Reductasa. (HMGCR) .....                                                   | 26 |
| Papel de las proteínas y enzimas lipogénicas en infecciones virales.....                  | 27 |
| Actividad de SREBP en infección con Citomegalovirus.....                                  | 27 |
| La sintasa de ácidos grasos (FAS) y su efecto al inhibirla en infección con VSR.<br>..... | 28 |
| El papel de HMG-CoA Reductasa (HMGCR) en infecciones virales.....                         | 28 |
| Infección Vertical: Método de transmisión de algunos agentes virales. ....                | 29 |
| Estudios que sugieren la infección vertical del VSR.....                                  | 30 |
| Justificación.....                                                                        | 32 |
| Hipótesis.....                                                                            | 32 |
| Objetivo General: .....                                                                   | 32 |
| Objetivos particulares: .....                                                             | 32 |
| Diseño experimental.....                                                                  | 33 |
| Líneas celulares utilizadas. ....                                                         | 33 |
| Método. ....                                                                              | 34 |
| Producción del Stock viral de VSR.....                                                    | 34 |
| Titulación del stock viral de VSR.....                                                    | 34 |
| Crecimiento de la línea celular BeWo. ....                                                | 35 |
| Ensayo de infección en células BeWo. ....                                                 | 35 |

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Extracción de proteínas totales en células BeWo. ....                                                      | 36 |
| Cuantificación de proteínas totales. ....                                                                  | 36 |
| Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot. ....                                                               | 37 |
| Análisis estadístico de la densitometría de los blots. ....                                                | 38 |
| Inmunofluorescencia para la identificación de FAS en células BeWo infectadas con VSR. ....                 | 38 |
| Resultados. ....                                                                                           | 40 |
| Obtención y propagación del stock viral de VSR. ....                                                       | 40 |
| Identificación de la forma activa de la proteína SREBP1 durante la infección con VSR en células BeWo. .... | 41 |
| Identificación de la forma activa de la proteína SREBP2 en infección con VSR en células BeWo. ....         | 42 |
| Análisis de la expresión de las proteínas FAS y HMGCR en infección con VSR en células BeWo. ....           | 43 |
| Cambio en la distribución de la sintasa de ácidos grasos (FAS) en infección con VSR en células BeWo. ....  | 44 |
| Discusión. ....                                                                                            | 45 |
| Conclusiones. ....                                                                                         | 49 |
| Prospectivas. ....                                                                                         | 49 |
| Referencias. ....                                                                                          | 50 |

## Abreviaturas.

ACC: Acetil Coenzima A Carboxilasa

ACS: Acetil Coenzima A Sintetasa

ACSL: Ligasa de ácidos grasos

ARN: Ácido Ribonucleico

BHLH: Región hélice bucle hélice

BSA: Albumina Sérica Bovina

CI: Cuerpos de Inclusión

CK7: Citoqueratina 7

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ESCRT: Complejos de Clasificación endosomal de transporte

FAS: Sintasa de Ácidos grasos

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FPP: Pirofosfato de farnesilo

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GGPP: Pirofosfato de geranylgeranilo

hCG: Hormona Gonadotropina Coriónica Humana

HLA-1: Antígenos Leucocitarios Humanos 1

HMGCR: 3-Hidroxi-3 metilglutaril Coenzima A Reductasa

HRP: Peroxidasa de rábano

ICAM: Molécula de Adhesión Intracelular

InDRE: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos

INSIG: Proteína del gen 1 inducida por insulina

IRA: Infecciones respiratorias agudas

LDL: Lípidos de baja densidad

MDA5: Proteína asociada a melanoma 5

MOI: Multiplicidad de infección

OGN: Osteoglicina

PBS: Tampón fosfato salino

PDVF: Polifluoruro de vinilideno

PFA: Paraformaldehido

PI: Fosfatidilinositol

PIP3: Fosfatidilinositol 3

RE: Retículo endoplasmático

RIG-3: Gen I inducible por ácido retinoico

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SCAP: Proteína de activación de escisión de SREBP

SDS: Dodecilsulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino

SER: Elemento regulador de esteroides

SREBP: Proteína de unión al elemento regulador de esteroides

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa

TLR4: Receptor tipo toll 4

TORCH. Toxoplasma gondii, virus Rubéola, Citomegalovirus, virus Herpes simple y Otros

UFP: Unidades formadoras de placa

VSR: Virus sincitial respiratorio



## Índice de figuras.

Figura 1. Etiología de infecciones respiratorias agudas.

Figura 2. Genoma del VSR.

Figura 3. Estructura del VSR.8

Figura 4. Esquema del ciclo de infección del VSR en una célula.

Figura 5. Estructura y localización cromosómica de los genes SREBF1 y SREBF2

Figura 6. Disposición en la membrana del retículo endoplásmico (RE) de las proteínas implicadas en el transporte y maduración de los factores SREBP.

Figura 7. Esquema de la actividad de la proteína SREBP.

Figura 8. Permisividad de las células BeWo a la infección por VSR.

Figura 9. Producción y titulación del stock viral de VSR.

Figura 10. Aumento en la expresión de SREBP1 en células BeWo infectadas con VSR.

Figura 11. Aumento en la expresión de SREBP2 en células BeWo infectadas con VSR.

Figura 12. Aumento en los blancos enzimáticos de la familia SREBP.

Figura 13. Aumento en la expresión de FAS en células BeWo infectadas con VSR.

## Resumen.

Estudios epidemiológicos en México han demostrado que el principal agente infeccioso asociado a infecciones respiratorias en población infantil es el virus sincitial respiratorio (VSR). Se han realizado estudios acerca de la capacidad del VSR para invadir tejido intrauterino y así transmitirse verticalmente, en uno de ellos se utilizó un modelo de ratas gestantes que fueron inoculadas con el VSR en donde un 30% de los fetos se infectaron a partir de madres expuestas al virus, lo que sugiere que existe una posible infección vertical. Recientemente, nuestro grupo de trabajo mostró la susceptibilidad de la línea celular BeWo a la infección con el VSR. Este modelo celular posee características bioquímicas y fisiológicas similares a los trofoblastos de placenta de primer trimestre por lo cual es un sistema ideal para estudiar la interacción célula-patógeno. Una serie de evidencias han establecido que los lípidos celulares participan durante la infección por este virus y son esenciales para completar su ciclo de replicación. En este sentido existe una familia de factores de transcripción que regulan la biogénesis de lípidos, ácidos grasos y colesterol, conocida como SREBP los cuales modulan la expresión de numerosas enzimas necesarias para la síntesis de lípidos y colesterol entre las que se encuentran la sintasa de ácidos grasos (FAS) y HMGCR. El objetivo del trabajo es evaluar la activación de los factores de transcripción de la familia SREBP, así como las enzimas que modula esta familia (FAS y HMGCR) durante la infección con VSR en la línea celular BeWo. Para ello se realizaron ensayos de Western Blot para evaluar los niveles de expresión de estas proteínas en células infectadas con VSR o virus inactivado por calor (Mock) por 24 horas post-infección. Posteriormente se realizó una inmunofluorescencia en células BeWo infectadas con VSR para evaluar la localización y distribución de FAS con proteínas virales (N). Como resultados se observó un aumento en la expresión de las proteínas de la familia SREBP además de FAS y de HMGCR durante la infección con VSR con respecto al control negativo en células BeWo. El análisis de IF se observó una co-localización con la proteína viral N con la FAS en las células infectadas respecto al control negativo. Los resultados obtenidos sugieren que el VSR promueve un aumento en la expresión de algunas enzimas encargadas de la biogénesis de lípidos y ácidos grasos como es la FAS y la HMGCR. Adicionalmente la infección por VSR posiblemente regula la familia de factores de transcripción que estimulan la expresión de estas enzimas para cumplir con un ciclo de infección exitoso.

## Abstract.

Epidemiological studies in Mexico have shown that the main infectious agent associated with respiratory infections in children is the respiratory syncytial virus (RSV). Studies have been conducted on the capacity of RSV for intrauterine tissue and thus transmitted vertically, in one of them, as the model of pregnant rats that were inoculated with RSV where 30% of parents were infected from mothers exposed to the virus, which suggests that there is a possible vertical infection. Our working group showed the susceptibility of the cell line. This cellular model has biochemical and physiological characteristics like the trophoblasts of the first trimester placenta, making it an ideal system to study the cell-pathogen interaction. A series of evidences have established that cellular lipids are used for infection by this virus and are essential to complete their cycle of replication. In this sense there is a family of transcription factors that regulate the biogenesis of lipids, fatty acids and cholesterol, as well as SREBP, which modulate the expression of the enzymes necessary for the synthesis of lipids and cholesterol, among which are the synthase of fatty acids (FAS) and HMGCR. The objective of the work is to evaluate the activation of the transcription factors of the SREBP family, as well as the enzymes that this family modulates (FAS and HMGCR) during the infection with RSV in the BeWo cell line. For this, Western Blot assays were performed for expression levels of these proteins in cells infected with RSV or heat-inactivated virus (sham) for 24 hours post-infection. Subsequently an immunofluorescence was performed in cells. BeWo infected with VSR to evaluate the localization and distribution of FAS with viral proteins (N). As a result, an increase in the expression of the proteins of the SREBP family, in addition to FAS and HMGCR, is obtained in the infection with RSV with respect to the negative control in BeWo cells. The IF analysis shows a co-localization with the viral N protein with the FAS in the infected cells with respect to the negative control. The results indicate that RSV promotes an increase in the expression of some enzymes responsible for the biogenesis of lipids and fatty acids such as FAS and HMGCR. The use of RSV can regulate the family of transcription factors that stimulate the expression of these enzymes to comply with a successful infection cycle.

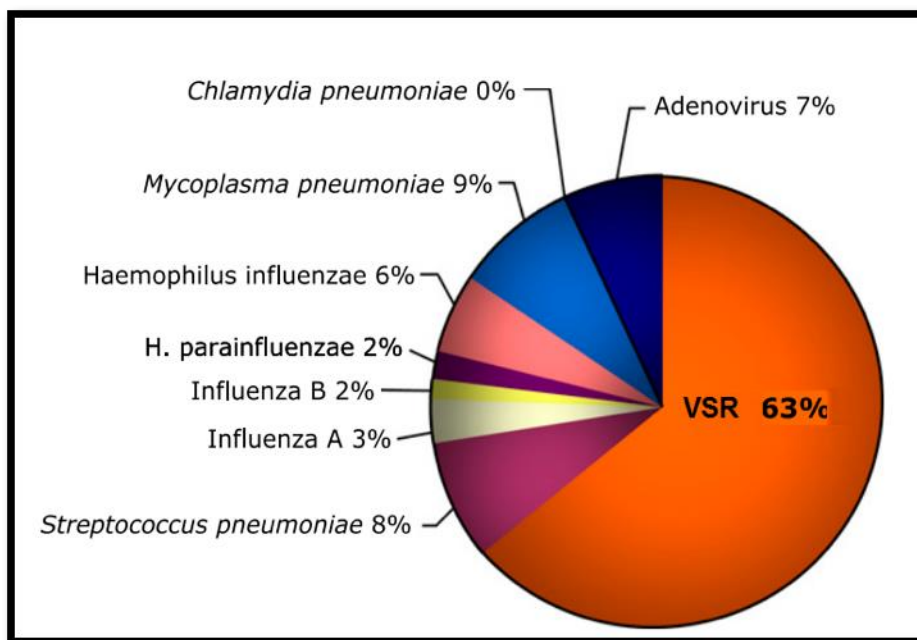
## Introducción.

### Infecciones respiratorias agudas.

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) se definen como el conjunto de enfermedades transmisibles del aparato respiratorio que incluye desde la gripe común hasta la neumonía, pasando por diversos padecimientos como la otitis, amigdalitis, sinusitis y bronquitis, con evolución menor a 15 días y con la presencia de uno o más síntomas como tos y dificultad respiratoria, los cuales pueden estar o no acompañados de fiebre. Estas infecciones pueden ocurrir en el tracto respiratorio superior e inferior. La principal población que es afectada por éstas infecciones alrededor del mundo son los infantes menores de 5 años (Fernandes-Matano *et al.*, 2017; Ferreira-Guerrero *et al.*, 2013).

Las infecciones respiratorias agudas pueden ser causadas por virus, bacterias, hongos o coinfecciones, pero en más del 70% de los casos son ocasionadas por los agentes virales (Ferreira-Guerrero *et al.*, 2013).

De acuerdo con investigaciones por parte de la Organización Mundial de la Salud indican que el virus sincitial respiratorio (VSR) es el principal agente infeccioso que provoca IRA en menores de 5 años además de ser el responsable de más del 60% (figura 1) de las infecciones del tracto inferior en niños menores de 1 año (Piedimonte y Pérez, 2014).



**Figura. 1. Etiología de infecciones respiratorias agudas en niños.** Las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud indican que el virus sincitial respiratorio (VSR) representa en todo el mundo más del 60% de las infecciones respiratorias agudas. Tomado de Piedimonte y Pérez, 2014.

## Epidemiología del VSR en México.

Las estadísticas oficiales en México muestran que las IRA constituyen la primera causa de morbilidad y egreso hospitalario en los menores de 5 años, con frecuencia de 13 episodios por cada 100 consultas médicas. Lo anterior representa dos a cuatro episodios de IRA al año por niño los cuales pueden complicarse con neumonía grave (Ferreira-Guerrero *et al.*, 2013).

Aproximadamente 27 millones de casos de IRA se producen anualmente en México. Estos casos pueden ser causados por una gran variedad de agentes etiológicos. Sin embargo, el objetivo principal de la vigilancia epidemiológica en el país es detectar las variaciones antigénicas de diferentes virus que se presentan cada temporada, los cuales determinan los cambios en la composición de las vacunas (Fernandes-Matano *et al.*, 2017).

En 2013, el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) implementó un diagnóstico diferencial de influenza que incluía otros 14 virus respiratorios los cuales fueron analizados por medio de diagnóstico molecular para detectar su presencia en los ingresos hospitalarios que presentaron IRA en prácticamente todo el territorio nacional, los resultados mostraron que el VSR fue el segundo virus con mayor prevalencia con 30% de los casos que dieron positivo para al menos un agente viral (Fernandes-Matano *et al.*, 2017).

Además de presentar las prevalencias de los agentes virales también se muestra el rango de edades que el VSR afecta encontrando en un 86% a infantes menores a 5 años lo cual coloca al VSR como un patógeno de importancia de salud pública dentro del territorio nacional y de salud neonatal (Fernandes-Matano *et al.*, 2017).

## Características generales del virus Sincitial Respiratorio.

### Taxonomía.

El VSR es un virus envuelto con un genoma de ARN monocatenario con polaridad negativa, perteneciente a la familia *Pneumoviridae* recientemente definida, género *Orthopneumovirus*. El genoma viral es ARN no segmentado, de 15,2 kb de longitud, que codifica 10 genes que se expresan independientemente para once proteínas: NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L (Rey-Jurado and Kalergis, 2017).

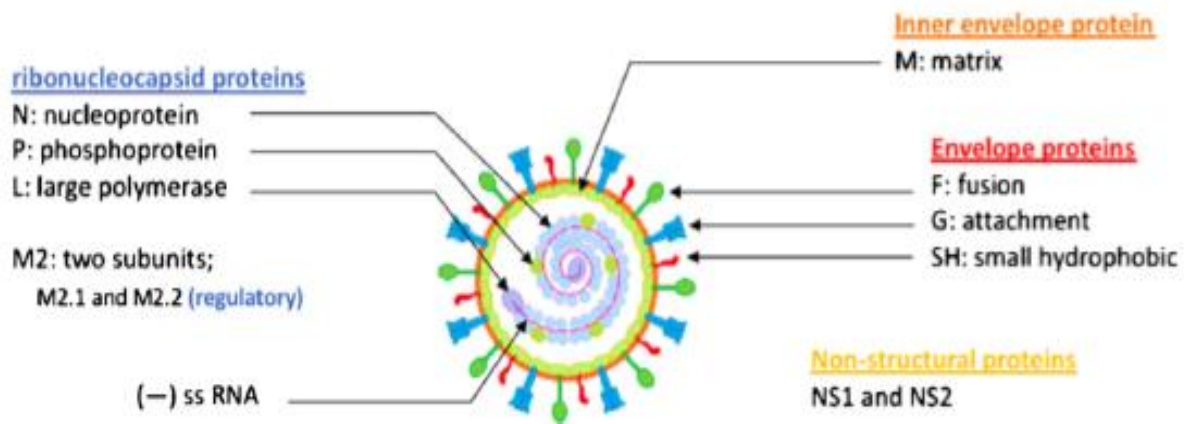


**Figura 2. Genoma del VSR.** se observan todas las proteínas que constituyen al virus en la parte superior el número de nucleótidos y en la parte inferior el número de aminoácidos. Tomado de Taleb *et al.*, 2018.

## Estructura.

Las partículas virales están constituidas por una nucleocápside helicoidal cubierta de una envoltura lipoproteica, que el virus adquiere al salir de la célula por gemación. Esta envoltura contiene tres glicoproteínas transmembranales, la proteína de unión al receptor (glicoproteína G), la proteína de fusión (glicoproteína F) y una proteína pequeña hidrofóbica (la proteína SH). La proteína matriz (M) forma una cubierta proteica en la cara interna de la envoltura. Las glicoproteínas están organizadas por separado en espículas virales, que se visualizan como proyecciones con una longitud de 11 a 20 nm y separadas entre sí. La nucleocápside es una hélice simétrica en la que está el ácido ribonucleico viral (ARNv) asociado con la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), un factor antiterminador de la transcripción (M2 o 22K), y la polimerasa (L) (Murata, 2008).

Además, cuenta con algunas proteínas que se consideran no estructurales porque no se han encontrado en viriones maduros, aunque abundan en células infectadas. Se ha visto que estas proteínas están implicadas en la evasión de la respuesta inmune innata durante la infección por VSR se ha notado que dichas proteínas están implicadas en la disminución de la expresión de interferones (Eliot *et al.*, 2007).



**Figura 3. Estructura del VSR.** Se observa la distribución de las proteínas estructurales y no estructurales que constituyen a la partícula viral, proteína F, G, L, M, M2-1, M2-2, N, P, SH, NS1 y NS2 y el RNA de cadena negativa. Tomado de Taleb *et al*, 2018.

## Características estructurales y funcionales de las proteínas del VSR.

El VSR codifica 11 proteínas independientes y por lo tanto es más complejo que la mayoría de los miembros de *Paramyxovirinae*, que típicamente tienen 6-7 mRNAs que codifican 7-9 proteínas independientes. Las proteínas N, P, M, F y L del VSR tienen ortólogos en la mayoría de los miembros de los *Paramyxoviridae*, y su orden de genoma relativo se conserva (Collins *et al.*, 2013).

### Proteína de Fusión (F)

La proteína F tiene un peso aproximado de 63 kDa y constituida por 574 aminoácidos dirige la penetración viral y la formación de sincitios característicos en el ciclo de infección, como una proteína F típica de *Paramyxoviridae*, se sintetiza como un precursor F0 inactivo que se activa mediante la endoproteasa celular para producir dos subunidades unidas por puentes disulfuro, (NH<sub>2</sub>-F<sub>2</sub>-F<sub>1</sub>-COOH). Sin embargo, la proteína F del VSR tiene dos sitios de escisión, en lugar de uno, VSR F0 es fácilmente escindido intracelularmente por una proteasa similar a la furina y no es un factor limitante para la infectividad viral y el tropismo (Collins *et al.*, 2013).

La proteína F está constituida por 3 secuencias hidrofóbicas, la primera es la secuencia péptido señal ubicada en la parte N-terminal de la cadena F<sub>2</sub>, la segunda es la secuencia de péptido de fusión ubicada en el extremo N de la cadena F<sub>1</sub> y la tercera es la secuencia cercana a la región C-terminal de la cadena F<sub>1</sub> (González-Reyes *et al.*, 2001)

De acuerdo a un estudio realizado por Tayyari en el 2011, en donde se muestra que el VSR interactúa con la nucleolina de la célula huésped a través de la glicoproteína F, en este estudio mediante ensayos de co-inmunoprecipitación se identificó que hay una interacción específicamente a la nucleolina en la superficie celular apical, con lo cual se afirma que la nucleolina modula como receptor para la unión de la partícula viral y la célula blanco (Tayyari *et al.*, 2011).

La proteína F también se une a TLR-4, iniciando la transducción de señales y la respuesta inmune innata. La proteína F debe combinar actividades de fusión y adhesión de manera dependiente de las balsas lipídicas en la membrana y esto es necesario para producir la infección en el epitelio respiratorio (Collins *et al.*, 2013).

### Glicoproteína (G)

La proteína G tiene un peso aproximado de 90 kDa y constituida por 298 aminoácidos es una proteína de membrana tipo II, es la principal proteína de unión del virus a la célula hospedadora presenta una región N-terminal hidrofóbica que actúa como péptido señal para la inserción a la membrana. No se encuentra

relacionada ni estructural ni funcionalmente con las proteínas de unión al receptor de otros *paramixovirus* (Collins *et al.*, 2013).

La proteína G, además de su participación en la unión a la membrana, también tiene un papel en la evasión de la respuesta inmune ya que se ha mostrado que inhibe la activación de diversos TLRs, esta proteína está glicosilada y expresa dos formas ancladas a la membrana llamadas Gs y Gm. La proteína G también puede secretarse en forma soluble (Gs) no ligada a membrana. Esto es posible debido a un segundo codón de lectura que elimina los primeros 48 aminoácidos de la proteína (Roberts *et al.*, 1994). Esta forma soluble se piensa que tiene como función capturar anticuerpos neutralizantes del RSV y/o modular la respuesta inmune-inflamatoria.(Collins *et al.*, 2013).

La Gs está relacionada con la inhibición de la neutralización mientras que Gm se relaciona con la unión viral, la unión está mediada por la interacción con el receptor de proteoglicanos en este caso por el sulfato de heparina (Collins *et al.*, 2013; Taleb *et al.*, 2018).

#### Proteína pequeña hidrofóbica (SH)

La proteína SH, es una proteína transmembranal constituida por 64 aminoácidos esta proteína se acumula en las células infectadas en cuatro formas diferentes SH0 con un peso de 7.5 kDa, SHt con un peso de 4.6 kDa, SHg con un peso de 13 kDa y SHp con un peso de 21 kDa, dos de ellas glicosiladas (SHg y SHp). Participa junto con las glicoproteínas F y G en la formación de sincitios en las células infectadas (Collins *et al.*, 2013).

SH forma estructuras pentámeras similares a poros que confieren actividad similar a un canal selectivo de cationes, aunque la importancia de esto para el VSR no es clara. Por lo tanto, la proteína SH parece ser una viroporina, una clase de pequeñas proteínas virales que puede modificar la permeabilidad de la membrana y puede afectar la gemación y la apoptosis. Se ha informado que la proteína SH reduce la apoptosis, aunque el efecto es pequeño además de inhibir el efecto de TNF- $\alpha$ , una citoquina antiviral. Ésta proteína dentro del Aparato de Golgi y posiblemente favorezca el transporte de proteínas virales por la vía secretoria hacia la membrana citoplasmática y la maduración del virión (Collins *et al.*, 2013).

Las proteínas SH de los paramixovirus inhiben la señalización del interferón TNF- $\alpha$  y la apoptosis de la célula infectada (Fuentes *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2006), también se le atribuye la posibilidad de que funcione como canal de iones y otras pequeñas moléculas (Carter *et al.*, 2010).



### Proteína de matriz (M)

La proteína M tiene un peso aproximado de 27 kDa y está constituida por 256 aminoácidos, desempeña un papel clave en la morfogénesis del virión. Al inicio de la infección, M se detecta en el núcleo y puede ser responsable de la inhibición de la transcripción del huésped durante la infección por VSR, Posteriormente la proteína M es localizada en los cuerpos de inclusión viral, estructuras que solo se forman durante la infección con este patógeno y que son sitios de replicación y ensamblaje viral (Collins *et al.*, 2013).

El papel fundamental de ésta proteína es que modula el proceso de ensamblaje viral ya que interactúa con las membranas plasmáticas de la células y se asocia con los microdominios conocidos como balsas lipídicas las cuales funcionan como andamio para el ensamblaje de la partícula, además, tiene la función de mantener estable a la nucleocápside y con ello inhibir la transcripción antes de modular el ensamblaje viral (Collins *et al.*, 2013).

### Nucleoproteína (N)

La proteína N tiene un peso aproximado de 43 kDa y está constituida por 391 aminoácidos la cual se une estrechamente al genoma y al antígenoma para formar nucleocápsides helicoidales, creando las plantillas para la síntesis de ARN.

Es la proteína principal de la nucleocápside y forma un complejo con el genoma viral (N-ARN) además es el molde funcional para la transcriptasa y replicasa viral, este complejo protege al genoma viral de las ribonucleasas. También posee varias funciones en la replicación viral ya que participa en la encapsidación del ARN geonómico, se asocia con las proteínas P-L durante la transcripción y la replicación del virión y se piensa que interactúa con la proteína M durante el ensamblaje del virus (Collins *et al.*, 2013).

La determinación de la estructura atómica entre las interacciones de la proteína N y el ARN viral indicó que cada monómero de N está constituido de los dominios amino y carboxilo terminal los cuales están asociados por una región bisagra. Los monómeros adyacentes se orientaron en la misma dirección y se conectaron débilmente, proporcionando flexibilidad que permitiría el acceso a la polimerasa viral sin tener que dejar de interactuar con la estructura helicoidal de la proteína N (Collins *et al.*, 2013).

### Fosfoproteína (P)

La proteína P tiene un peso aproximado de 33 kDa y está constituida por 241 aminoácidos, es un cofactor esencial para la actividad de la polimerasa viral, también actúa como un adaptador que se une a las proteínas N, M2-1 y L para mediar las interacciones en el complejo nucleocápside-polimerasa (Collins *et al.*,

2013). Además, la proteína P se une a monómeros de proteína N libres y los administra a genomas-antigenomas nacientes, evitando así que N se autoagregue o se una al ARN no viral. La expresión de N y P es suficiente para formar cuerpos de inclusión virales, que son estructuras citoplásmicas grandes y densas que se cree que son los sitios de la síntesis de ARN viral. P existe como un homotetrámero formado a través de un dominio de multimerización en el centro de la molécula, que está flanqueado por dominios intrínsecamente desordenados. El carboxilo terminal de la proteína P interacciona con la proteína N mediante una región ubicada en la posición 46-151 dentro de la secuencia de la proteína N, también se ha descrito que la proteína P participa durante el desnudamiento del VSR ya que podría estar disociando a la proteína M durante la entrada. Adicionalmente se han identificado de 10 a 12 sitios de fosforilación dentro de la secuencia de la proteína P, estos sitios podrían ser accesibles para diversas cinasas celulares. La mayoría de las actividades de esta proteína podrían estar reguladas por una dinámica de fosforilación-desfosforilación (Collins *et al.*, 2013).

### Proteína polimerasa (L)

La proteína L tiene un peso aproximado de 250 kDa y está constituida por 2165 aminoácidos es la proteína más conservada entre los *paramyxovirus*, además, comprende el 43 % del genoma viral, sin embargo, es la menos abundante dentro de las proteínas estructurales del VSR. La proteína L es la única que comparte una relación entre su secuencia con la familia de *Rhabdoviridae*.

A esta proteína se le atribuye la actividad de ARN polimerasa dependiente del ARN. 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 polimerasa (Collins *et al.*, 2013).

Para realizar la transcripción de ARN mensajeros, la polimerasa inicia la síntesis de ARN desde la posición 3' del *promotor líder* (le) en el extremo 3 del genoma, esto da como resultado la síntesis de un pequeño ARN. Este ARN es más corto que el *promotor le* pero diferente en longitud, ya que varía entre 20 a 30 nucleótidos. Esta heterogeneidad sugiere que la polimerasa no libera el ARN en respuesta a una señal específica, promotora y libera el ARN después de que se ha alejado del promotor central. La polimerasa luego escanea al primer gen en la posición 45 y transcribe el genoma al responder a señales que actúan en *cis* que flanquean cada uno de los genes (Tiong-Yip *et al.*, 2014).

El oligómero formado por las proteínas N, P y L es suficiente para la replicación viral; sin embargo, el factor de antiterminación M2-1 es necesario que forme parte del complejo, con el fin de obtener una máxima eficiencia en la transcripción (Collins *et al.*, 2013).

Otras actividades conocidas que lleva a cabo la proteína L es el capping, la metilación y la poliadelinación de ARN mensajeros, además de actividad de proteína quinasa. Todas estas actividades pueden estar interaccionando con proteínas estructurales y no estructurales del VSR (Tiong-Yip *et al.*, 2014).

### Proteína M2-1

La proteína M2-1 tiene un peso aproximado de 22 kDa y está constituida por 194 aminoácidos, es un factor esencial de procesividad de la transcripción. M2-1 se acumula en formas fosforiladas y no fosforiladas y forma un homotetrámero a través de un dominio de oligomerización en los residuos 32-63 (Collins *et al.*, 2013).

Es relativamente hidrofílica. Se localiza junto con las proteínas N y P en los cuerpos de inclusión citoplasmáticos presentes en células infectadas por el VSR. El gen M2 contiene dos marcos de lectura que se solapan en 32 nucleótidos. El producto del primer marco de lectura da lugar a una proteína, denominada M2-1 (ORF-1). La segunda fase de lectura, M2-2 (ORF-2), codifica para una proteína que se ha encontrado en los extractos de las células infectadas. La proteína M2-1 es un antiterminador de la transcripción, y es esencial para la viabilidad del virus. La M2-2 actúa como un factor regulador, implicado en el equilibrio entre la replicación y la transcripción del ARN. M2-1 es exclusivo de *Pneumovirinae* (Collins *et al.*, 2013).

### Proteína M2-2

La proteína M2-2 tiene un peso aproximado de 11 kDa y está constituida entre 88 a 90 aminoácidos, dependiendo del sitio de inicio, se expresa en un nivel bajo en las células infectadas, esta proteína tiene un papel importante ya que cambia el balance del complejo de polimerasa de modo transcripcional a modo replicativo teniendo un papel en la modulación de la síntesis de ARN (Collins *et al.*, 2013).

### Proteínas No Estructurales.

Las proteínas NS1 y NS2 con un peso aproximado de 139 kDa y 124 kDa respectivamente, se consideran no estructurales porque no se han encontrado en viriones maduros, aunque abundan en células infectadas. Se ha visto que estas proteínas están implicadas en la evasión de la respuesta inmune innata durante la infección por VSR. Se ha notado que dichas proteínas están implicadas en la disminución de la expresión de interferones (IFNs.) tipo I, debido a que bloquean la activación del factor 3 regulador del IFN. Esto sugiere, que, en un hospedero natural, el antagonismo de la respuesta del IFN por estas proteínas incrementa el balance de Th2/Th1. No obstante, Bossert y Conzelmann en 2002 demostraron que ambas proteínas bloqueaban preferentemente la respuesta de los IFNs tipo I

[interferon alfa (IFN $\alpha$ ) e IFN $\beta$ ]. Esto fue corroborado con las investigaciones realizadas por Elliott y cols. en 2007 las cuales demostraron que el VSR es capaz de bloquear la respuesta de los IFNs. tipo I provocando infección en células humanas *in vitro* (Collins *et al.*, 2013).

También inhiben la apoptosis de manera temprana mediante la posible activación de AKT ya que esta proteína promueve un estado antiapoptótico y de supervivencia además de activar a NF- $\kappa$ B que conduce a la transcripción de la familia IAP de los factores antiapoptóticos, prolongando así la vida de la célula y aumentando el rendimiento viral durante la infección con el VSR (Bitko *et al.*, 2007).

### Ciclo de Infección del VSR.

Se ha definido que el VSR puede ingresar directamente al cuerpo del hospedero por las vías aéreas y acceder a las células epiteliales del tracto respiratorio donde comienza su proceso de internalización. El cual consiste en la unión de las proteínas G y F a la superficie apical de las células del epitelio pulmonar. Específicamente, mediante la unión con algunos receptores que incluyen a la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), la heparina, la anexina II, los receptores tipo Toll (TLR4), el receptor de fractalquina y la nucleolina principalmente. Además, se identificó que los microdominios lipídicos participan en el proceso de entrada viral ya que se ha demostrado que la unión entre la partícula viral a la nucleolina es dependiente de estos microdominios y la agregación de estos sirve como plataforma para la fusión a la membrana (Chang *et al.*, 2012; Mastrangelo y Hele, 2013).

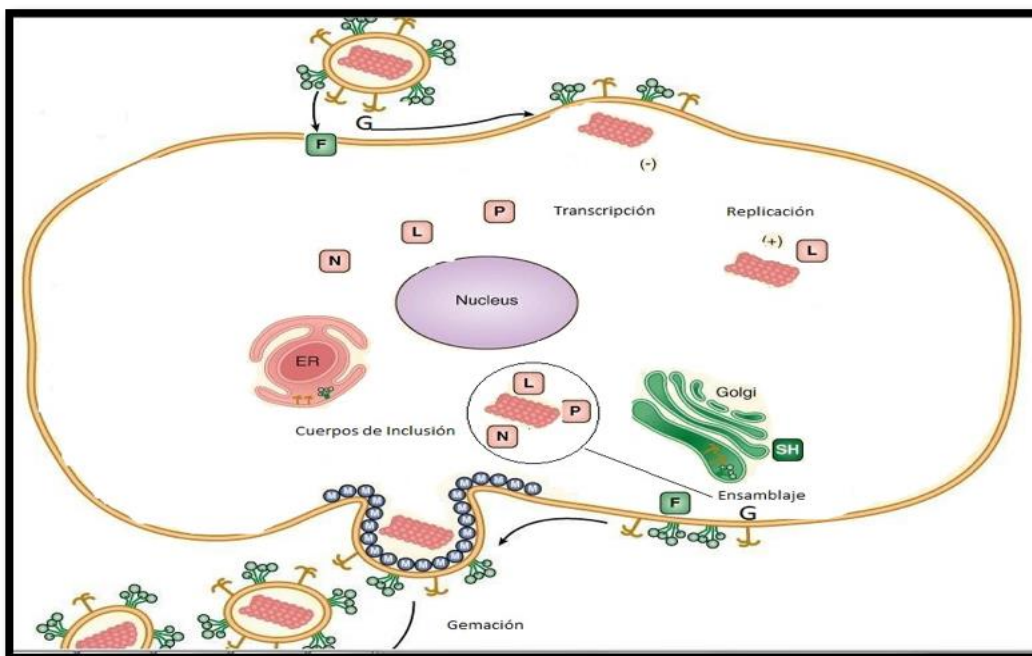
La adhesión y fusión del virus están mediadas por las proteínas G y F respectivamente. La entrada ocurre gracias a la fusión de la membrana del virus con la membrana de la célula. Ya fusionada la membrana viral con la membrana celular, el complejo de RNP viral se disocia de la matriz y se libera al citoplasma (Shaikh y Crow, 2013).

Una vez que el complejo se localiza en el citoplasma inicia la transcripción del genoma y la replicación que ocurren simultáneamente y 4-6 horas después de la infección del virus ya se detectan mRNA y proteínas del VRS a nivel intracelular. Las células así infectadas desarrollan cuerpos de inclusión citoplasmáticos (CI) que se hacen visibles a las 12 horas posteriores a la infección. La formación de cuerpos de inclusión puede ser inducida a través de la expresión de las proteínas N y P (Cervantes *et al.*, 2016). Evidencias sugieren que los cuerpos de inclusión son lugares donde se sintetiza el mRNA y recientemente se ha demostrado que los CI son capaces de inhibir la respuesta inmune frente a la infección (Lifland *et al.*, 2012). Además, los CI contienen los receptores de reconocimiento del ácido

retinoico inducible I (RIG-I) y la proteína de diferenciación asociada al melanoma (MDA5), que detectan intermediarios de replicación virales para activar la respuesta inducida por interferón (Shaikh and Crowe, 2013).

La formación de las partículas del VRS en la superficie celular también requiere interacciones virales con la membrana lipídica de la célula hospedera. La membrana plasmática contiene regiones en las que los lípidos y la composición de proteínas se diferencian del resto de la membrana plasmática (Shaikh y Crowe, 2013). Estos microdominios pueden servir como plataformas para la señalización celular, el tráfico de proteínas y otras funciones celulares. Durante el ensamblaje, la proteína M se asocia con la membrana localizándose en las balsas lipídicas posiblemente como una señal para el reclutamiento de las proteínas virales (Shaikh and Crowe, 2013).

Por último, el complejo RNP se asocia con las balsas lipídicas, en conjunto con M2-1, lo que indica que las proteínas virales se localizan en microdominios lipídicos específicos que pueden facilitar su distribución en la superficie celular para conformar al virión en el proceso de ensamblaje (Shaikh y Crowe, 2013). Para formar una partícula libre, debe ocurrir un evento de escisión de la membrana, actina probablemente participa en este proceso favoreciendo el ensamblaje del virus y la liberación del virión. Por último, la salida de los viriones a la superficie de la célula infectada se produce por el mecanismo de reciclaje de la endosoma apical y es independiente del mediado por la vía del transporte ESCRT (Lay *et al.*, 2013).



**Figura 4. Esquema del ciclo de infección del VSR en una célula.** Distribución de las proteínas virales, transcripción y replicación del ARN, formación de cuerpos de inclusión, ensamblaje del virión y gemación de la partícula viral madura. Tomado y modificado de Jawetz *et al.*, 2010.

## Importancia de los lípidos en infecciones virales.

Las funciones biológicas de los lípidos son muy variadas; dentro de estas se encuentran funciones como el almacenamiento de energía, la arquitectura celular y en procesos de señalización. Por ello diversos patógenos aprovechan estas moléculas con el fin de hacer eficiente el proceso de patogénesis o evadir la respuesta inmunológica del hospedero. En este sentido, los lípidos son uno de los factores celulares requeridos por los virus, ya que juegan un papel importante dentro del ciclo de infección viral (Heaton y Randall, 2011).

Durante la infección con ciertos virus se puede inducir la síntesis de lípidos por cambios en el metabolismo de las células huésped de forma que se desregulan los procesos anabólicos para facilitar la producción viral (Heaton y Randall, 2011). En el caso de los virus de RNA, como el virus del oeste del Nilo, virus del Dengue, hepatitis C y virus de DNA como adenovirus, existe una manipulación de la biosíntesis de colesterol para hacer eficiente la replicación, así relocalizan enzimas como la sintasa de ácidos grasos (FAS) a los sitios de replicación viral; trayendo como consecuencia cambios en la composición lipídica en estas zonas (Heaton y Randall, 2011, Whang *et al.*, 2012).

La importancia de los lípidos en coordinar diversos eventos de tráfico endosomal ha sido ampliamente estudiada. En este sentido, existen evidencias de que el fosfatidilinositol (PI) es el fosfolípido menos abundante en la membrana celular, pero también es una de las moléculas más versátil para la señalización en las células y tiene un papel central durante la infección en la interacción con actina, en el tráfico endosomal y su maduración, además de establecer sitios de replicación (Mercer y Mazzon, 2014).

## Importancia de los lípidos en infecciones por VSR.

En el caso del VSR, una serie de evidencias han establecido que los lípidos celulares participan durante la infección. Esto se ha demostrado cuando existe una infección en células HEp-2 ya que se ha identificado un cambio global de la composición lipídica en las células infectadas específicamente en las balsas lipídicas las cuales están enriquecidas de manera normal por colesterol y glicolípidos como lo son, cerebrósidos, globósidos y gangliósidos (Yeo *et al.*, 2009).

En otros estudios han definido que las balsas lipídicas son necesarias para la completa fusión del virión con la membrana celular, sirven como plataformas de unión en la superficie apical de las células alveolares (San Juan Vergara, *et al.*, 2012). Además, utilizando fármacos como Lovastatina que inhiben la síntesis de colesterol conducen a la pérdida drástica de la infectividad por VSR, debido a una disminución en la producción de partículas virales (Gower y Graham, 2001; Chang *et al.*, 2012).

De acuerdo con el estudio realizado por Yeo en el 2009, se evaluó el papel del colesterol durante la infección del VSR, mediante la implementación de un fármaco conocido como metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) el cual elimina el colesterol de las membranas lipídicas. Los resultados mostraron que aquellas células tratadas con el fármaco e infectadas con el VSR hubo una reducción drástica de la señal del antígeno viral en la superficie celular, no siendo así en células no tratadas e infectadas. Adicionalmente no se identificó algún efecto sobre los cuerpos de inclusión viral, ni en la expresión de genes virales. Sugiriendo que el efecto inhibitorio de M $\beta$ CD podría estar implicado en el transporte de proteínas virales en los sitios de ensamble en la membrana plasmática (Yeo *et al.*, 2009).

Finalmente, la inhibición de otras enzimas necesarias para el anabolismo de lípidos *de novo*, como lo es la FAS trae consigo una abolición de la síntesis de palmitato por fármacos como el TVB-3166; esto reduce significativamente la progenie del VSR tanto *in vitro* como *in vivo*. Por lo que la inhibición de la FAS puede alterar la composición de regiones de la membrana de la célula hospedera donde se produce el ensamble de los viriones o la replicación del genoma viral (Ohol *et al.*, 2015).

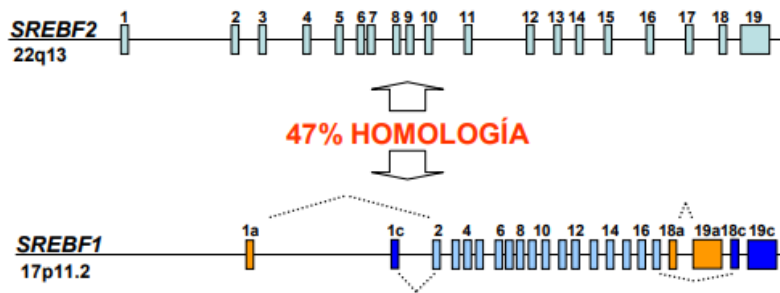
## Proteínas celulares que modulan la síntesis de lípidos.

### Familia SREBP.

Considerando la importancia y el papel que juegan los lípidos en las infecciones virales y en particular cuando existe una infección con VSR, existe una familia de proteínas que actúan como factores de transcripción para modular la síntesis de enzimas lipogénicas cuando existe una baja en el nivel de esteroides, la cual es conocida como familia SREBP (Sterol-Regulatory Element Binding Proteins) las cuales son capaces de unirse al elemento regulador de esteroides (SRE) en el ADN (Shimano *et al.*, 1997).

La familia SREBP está constituida por tres miembros: SREBP1a, SREBP1c y SREBP2. En humanos, SREBP2 está codificado por el gen SREBF2, localizado en el cromosoma 22q13. Los otros dos miembros, SREBP1a y 1c son productos de un gen común (SREBF1) localizado en el cromosoma 17p11.2. Los genes

SREBF1 y SREBF2 en humanos tienen un 47% de homología (Figura 5). Debido a la existencia de dos promotores independientes y al uso de distintos sitios de inicio de la transcripción, las isoformas SREBP1a y 1c difieren en su primer exón, que codifica el dominio de transactivación que debe interactuar con coactivadores de la transcripción. Este exón codifica 24 aminoácidos más en la forma -1a, lo que la hace mucho más activa transcripcionalmente comparado con la isoforma -1c. En humanos, estas isoformas también difieren en sus extremos 3' por la existencia de un procesamiento alternativo, aunque la importancia de esta divergencia es desconocida (Shimano *et al.*, 1997).



**Figura 5. Estructura y localización cromosómica de los genes SREBF1 y SREBF2.** El gen SREBF1 produce las isoformas SREBP1a y SREBP1c por el uso de distintos promotores y por procesamiento alternativo en su región 3'. Los exones específicos de la isoforma 1a se muestran en naranja, y los específicos de la isoforma 1c en azul oscuro. Tomado de Vernia 2007.

Las proteínas SREBP son sintetizadas como formas inactivas que se encuentran ancladas a la membrana del retículo endoplásmico (RE) y a la membrana nuclear (Figura 6). Están organizados en tres dominios: (i) el dominio aminoterminal que está orientado hacia el citosol y consta de unos 480 aminoácidos, en los que se encuentra una región de carácter ácido y una región de carácter básico con una topología de la clase hélice-bucle-hélice (bHLH) las cuales participan en la dimerización y en la unión del ADN. (ii) el segundo dominio tiene unos 90 aminoácidos y consiste en dos  $\alpha$ -hélices transmembranales, estas tienen un perfil hidrofóbico que están unidas por un bucle de unos 30 aminoácidos que se orienta hacia el lumen del RE y (iii) el tercer dominio es la región reguladora carboxilo terminal de unos 590 aminoácidos, la cual se encuentra orientada hacia el citosol. Este dominio carboxilo terminal interactúa con la proteína SCAP (SREBP cleavage-activating protein) que actúa como sensor del nivel de esteroides y como "escolta" para SREBP durante su activación postraduccional. A su vez, el complejo SREBP-SCAP interactúa con las proteínas INSIG (Insulin induced gene) la cual funciona como un represor del complejo en el retículo endoplásmico (Brown and Goldstein, 1997).





**Figura 6. Representación de la disposición en la membrana del retículo endoplásmico (RE) de las proteínas implicadas en el transporte y maduración de los factores SREBP.** Región hélice bucle hélice, proteína chaperona de SREBP (SCAP), proteína de unión al RE (INSIG). Tomado de Vernia 2007

Una vez que los niveles de colesterol caen o existe una privación de lípidos, las proteínas SREBP se translocan al Golgi, donde su dominio se libera mediante un mecanismo de escisión proteolítica en dos pasos. El dominio activo resultante se transloca al núcleo para asociarse a promotores de genes implicados en el metabolismo de los lípidos (Figura 7). Por lo tanto, la activación de SREBP acopla la síntesis lipídica de novo a las necesidades metabólicas celulares (Vernia, 2007).

#### Proteína 1 de unión al elemento regulador de esteroides. (SREBP1)

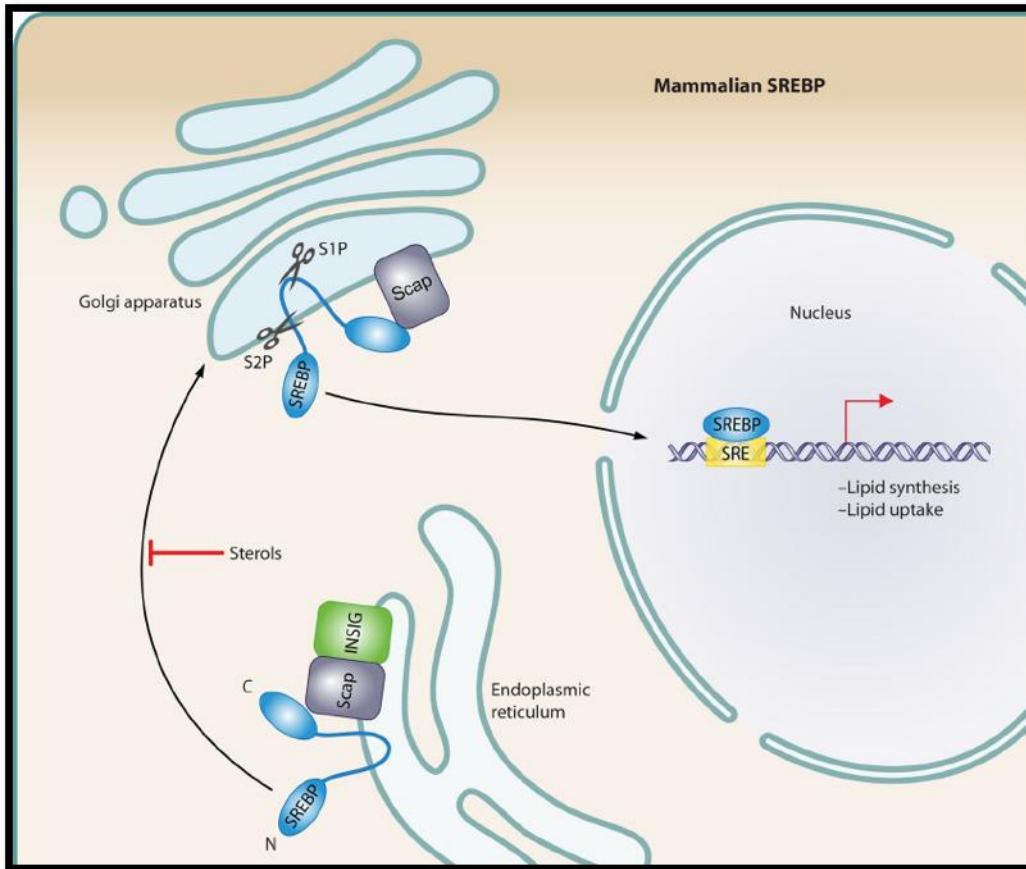
La proteína 1 de unión al elemento regulador del esteroide (SREBP1) es un factor de transcripción, como se mencionó previamente existen dos formas producidas por un mismo gen SREBP1 y SREBP1c las cuales son clave para regular los genes de lipogénesis y glucólisis como lo son las enzimas Acetil CoA Sintasa (ACS), la Acetil CoA Carboxilasa (ACC), la Sintasa de Ácidos Grasos (FAS), la L-piruvato quinasa (Pklr), estearoil-CoA desaturasa (Sdc1), glicerol-3fosfato acetiltransferasa mitocondrial (Gpam) todas estas enzimas regulan la biogénesis de ácidos grasos cuando existe una baja en la célula (Eberle *et al.*, 2004).

#### Proteína 2 de unión al elemento regulador de esteroides. (SREBP2)

La proteína SREBP2 juega un papel importante en la biosíntesis del colesterol ya que cuando las células se ven privadas del mismo por diversos procesos las proteínas SREBP2 modulan enzimas para la síntesis de colesterol como lo son el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL), 3-hidroximetil-3-glutaril- (HMG), CoA-sintasa, y HMG-CoA-reductasa (HMGCR). Por lo tanto, la activación del gen SREPB2 conduce a una mejor absorción y biosíntesis del colesterol (Miserez *et al.*, 2002).

Por lo tanto, la activación de la escisión de SREBP2 da como resultado un aumento de la captación de colesterol plasmático mediado por el receptor de LDL y una mayor biosíntesis del colesterol. Por otro lado, cuando el colesterol se

acumula en la célula, se inhibe la primera escisión sensible a esterol, se liberan SREBP menos maduros y disminuye la transcripción, evitando así la acumulación excesiva de colesterol en la célula (Miserez *et al.*, 2002).



**Figura 7. Esquema de la actividad de la proteína SREBP.** Se encuentra anclada al RE, al existir una baja de esteroides en la célula se transloca a Golgi en donde es escindida y translocada al núcleo en donde funge como factor de transcripción para modular enzimas involucradas en la síntesis de lípidos. Tomado y modificado de Bien y Espenshade 2010.

## Blancos enzimáticos de la familia SREBP.

### Sintasa de ácidos grasos. (FAS)

La sintasa de ácidos grasos (FAS) con un peso aproximado de 273kDa, es una enzima que es modulada por la proteína 1 de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP1). La sintasa de ácidos grasos cataliza la síntesis de novo del palmitato, un ácido graso utilizado para la síntesis de ácidos grasos más complejos el cual se utiliza tanto para la modificación postraducciónal de proteínas específicas por las proteínas aciltransferasas (PAT), como para la síntesis de ácidos grasos y lípidos más complejos por múltiples enzimas río abajo, incluidas

acil-coA sintetetasas (ACSL), estearil-coA desaturasa (SCD1) y elongases (Ohol *et al.*, 2015).

Fisiológicamente se ha descrito que la sintasa de ácidos grasos es una enzima que se encuentra principalmente en la parte citosólica y está encargada de producir precursores de ácidos grasos de cadena larga a partir de sustratos como acetil CoA y malonil CoA. Además, se ha descrito que se encuentra en pulmones, hígado, próstata y cerebro (Ohol *et al.*, 2015).

La sintasa de ácidos grasos se expresa en células sensibles a hormonas y células con alto metabolismo lipídico, sin embargo, en la mayoría de las células normales, la síntesis de ácidos grasos de novo raramente se necesita y, por lo tanto, los niveles de FAS son generalmente bajos (Gang *et al.*, 2016).

Existen dos tipos principales de sintasa de ácidos grasos: FAS I la cual utilizan una cadena peptídica larga y multifuncional, y son comunes tanto en mamíferos como en hongos (a pesar de que sus estructuras son diferentes). Este tipo de sintasa también se ha encontrado en el grupo CNM de bacterias (corinebacteria, micobacteria y nocardia). En estas bacterias, el sistema de tipo I produce ácido palmítico, y coopera con el sistema de tipo II para producir una mayor diversidad de productos lipídicos y la FAS II la cual se encuentra en arqueas y bacterias, y se caracteriza por el uso de enzimas monofuncionales para la síntesis de ácidos grasos (Jenke-Kodama *et al.*, 2005).

#### HMG-Coenzima A Reductasa. (HMGCR)

Existe una enzima cuya expresión es modulada por la proteína 2 de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP2) es el caso de la HMG-CoA reductasa (HMGCR) con un peso aproximadamente de 90 kDa, la cual regula la síntesis de colesterol y sus intermediarios isoprenoides, geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) y farnesil pirofosfato (FPP).

Esta enzima se regula a través de un mecanismo de retroalimentación negativa, la modificación por GGPP y / o FPP es esencial para la función de pequeñas GTPasas, y otras proteínas con funciones clave en la proliferación, supervivencia, invasión, metástasis, inflamación y respuesta inmune. La HMG-CoA reductasa se encuentra anclada a la membrana del retículo endoplásmico, y posee siete dominios transmembranales, con el sitio activo localizado en un gran dominio carboxilo terminal localizado en el citosol. Sin embargo, evidencias más recientes parecen indicar que esta proteína contiene ocho dominios transmembranales (Wong *et al.*, 2009).

La HMGCR cataliza la conversión del HMG-CoA a ácido mevalónico (MVA) que es el paso limitante en la biosíntesis del colesterol, la reacción catalizada por la HMG-CoA humana requiere de NADPH como fuente de equivalentes de reducción, las enzimas de otras especies pueden hacer uso de NADH (Wong *et al.*, 2009).

La función adecuada de HMGCR es esencial bajo condiciones fisiológicas normales, y se ha informado que su desregulación está asociada con muchas enfermedades (Huang *et al.*, 2018).

## Papel de las proteínas y enzimas lipogénicas en infecciones virales.

### Actividad de SREBP en infección con Citomegalovirus.

Las proteínas de la familia SREBP al ser fundamentales para regular la expresión de enzimas lipogénicas, se ha evaluado su participación durante la infección con otros patógenos como lo es el Citomegalovirus humano (CMV) el cual se ha determinado que requiere de ciertos eventos lipogénicos para su replicación lo cual se evalúa en el trabajo presentado por Yu en el 2012 en donde muestran que al existir una infección con CMV hay una correlación con un mayor procesamiento de los precursores SREBP1 para formar los factores de transcripción activos o maduros que entran en el núcleo para activar transcripcionalmente genes lipogénicos. La escisión de SREBP1 normalmente se inhibe por el aumento de los niveles de esterol (Yu *et al.*, 2012).

Al analizar por ensayos de Western Blot células de prepucio humano (HF) infectadas simuladamente se detectó la forma total o no procesada de la proteína SREBP1, la cual se observó fácilmente y su forma procesada o madura se detectó en muy bajo nivel. Sin embargo, al analizar las células infectadas y evaluar la forma procesada o madura esta se detectó fácilmente y con una mayor expresión en comparación con las células infectadas simuladamente lo que sugiere que la infección por CMV activó el mecanismo de maduración de SREBP1 (Yu *et al.*, 2012).

Para confirmar lo anterior se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en células infectadas y no infectadas para analizar la distribución intracelular de la proteína SREBP1 en donde se observó que en células no infectadas la distribución de la proteína es citoplasmática, sin embargo al analizar las células infectadas se observó que existe una translocación al núcleo con lo que se confirma que existe una activación de la forma madura de la proteína SREBP1 al existir infección por CMV y por ende una mayor síntesis de lípidos (Yu *et al.*, 2012).

Por último se evidenció la importancia que juega la proteína SREBP1 dentro de la infección con CMV en donde se utilizaron siRNAs para el silenciamiento de

SREBP y su proteína de escisión (SCAP) en células infectadas con CMV, los resultados mostraron que existió una disminución significativa de la progenie viral al silenciar el procesamiento de SREBP1 (Yu *et al.*, 2012).

En conclusión, los datos muestran que la infección mediada por CMV puede inducir la lipogénesis a través de una mayor división del precursor SREBP1, el proceso de escisión inducido por CMV requiere SCAP, la chaperona de SREBP que acompaña a SREBP al aparato de Golgi y a través de la escisión al factor de transcripción maduro lo que sugiere que el virus posiblemente ha eludido el mecanismo normal de control del esterol (Yu *et al.*, 2012).

#### La sintasa de ácidos grasos (FAS) y su efecto al inhibirla en infección con VSR.

Debido a la dependencia que tiene el VSR de las balsas lipídicas y las proteínas palmitoiladas para formar virus filamentosos, la sintasa de ácidos grasos puede desempeñar un papel esencial en el ciclo de replicación del VSR ya que se ha demostrado que las principales moléculas que conforman a las balsas lipídicas son el colesterol y los esfingolípidos, se ha demostrado que el silenciamiento o la inhibición química de FAS suprime la replicación de múltiples virus, incluidos el virus de la hepatitis C (VHC), el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus del dengue (Ohol *et al.*, 2015).

De acuerdo al trabajo de Ohol en el 2015 en donde utilizaron tres líneas celulares diferentes (A549, Hep-2 y Hela) las cuales fueron infectadas con VSR posteriormente se utilizó directamente en las células el fármaco TVB-3166 el cual inhibe la actividad de FAS, al realizar los ensayos se demostró que la inhibición de FAS redujo significativamente la progenie viral y las partículas infectivas del VSR con lo que se demuestra que la sintasa de ácidos grasos no solo juega un papel importante en infecciones virales sino que también lo hace en la infección por el VSR (Ohol *et al.*, 2015).

#### El papel de HMG-CoA Reductasa (HMGCR) en infecciones virales.

De acuerdo al trabajo de Soto-Acosta en el 2017 en donde utilizan células de hepatocitos humano (Huh7) las cuales infectan con DENV y en donde utilizan ensayos enzimáticos, así como técnicas de ELISA y Western Blot en donde observan un aumento de HMGCR en células infectadas asociadas a la inactivación de AMPK, los resultados sugieren que la infección por DENV aumenta la actividad de HMGCR la cual conduce a niveles de colesterol más altos en el retículo endoplásmico necesarios para la formación de complejos replicativos. Además, se observó una co-localización entre el colesterol y HMGCR con proteínas virales como NS3, NS4A y E, lo cual sugiere que la HMGCR juega un papel importante en el desarrollo de complejos de replicación del Dengue (Soto-Acosta *et al.*, 2017).

Este estudio respalda la idea de que el colesterol es importante para mantener la arquitectura y estabilidad de los cuerpos replicativos en la infección con Dengue y sugiere que la modulación de AMPK y HMGCR son las vías principales que utiliza el Dengue para modular los cambios en el metabolismo lipídico del huésped durante la infección (Soto-Acosta *et al.*, 2017).

Existe otro estudio realizado por Fujino en el 2010 en donde se toman biopsias de hígado de pacientes diagnosticados con virus de la hepatitis (HCV) en donde por medio de RT-PCR identificaron una mayor amplificación de genes de algunas proteínas lipogénicas entre ellas SREBP2 y HMGCR en comparación con los controles de hígados de pacientes sanos lo cual indica que al existir una infección con HVC la expresión de genes involucrados en la síntesis de lípidos juega un papel importante para el ciclo de replicación del HVC (Fujino *et al.*, 2010).

Ambos estudios aportan evidencias que apoyan la idea de que la producción del colesterol es importante para que los virus cumplan con un ciclo de replicación exitoso en el caso del Dengue es necesario para el desarrollo de los cuerpos de replicación y en el caso del HCV se menciona que es parte al ser el principal compuesto de las balsas lipídicas las cuales fungen como andamio para la entrada y ensamblaje de partículas virales.

### **Infeción Vertical: Método de transmisión de algunos agentes virales.**

Las infecciones verticales se definen como aquéllas adquiridas por el neonato como consecuencia de padecerla su madre durante la gestación. Pueden ser transmitidas por la vía transplacentaria, por ruta ascendente a través de la vagina, al paso del neonato por el canal del parto, o después del nacimiento y todas estas son la principal causa de morbilidad y mortalidad neonatal en el mundo (Jasso, 2011).

Existen algunos agentes virales que ya se han descrito que pueden transmitirse de forma vertical tal es el caso del Citomegalovirus el cual tiene una elevada potencialidad de transmisión de la madre al feto. Algunos otros agentes virales que se han documentado que se transmiten de forma vertical son el VIH, Hepatitis B y C, el virus de la Rubéola, virus del papiloma humano (VPH), Adenovirus (Ad36), Enterovirus, Varicella Zoster, Retrovirus (HERV), Parvovirus B19 y recientemente Zika (Chu *et al.*, 2016).

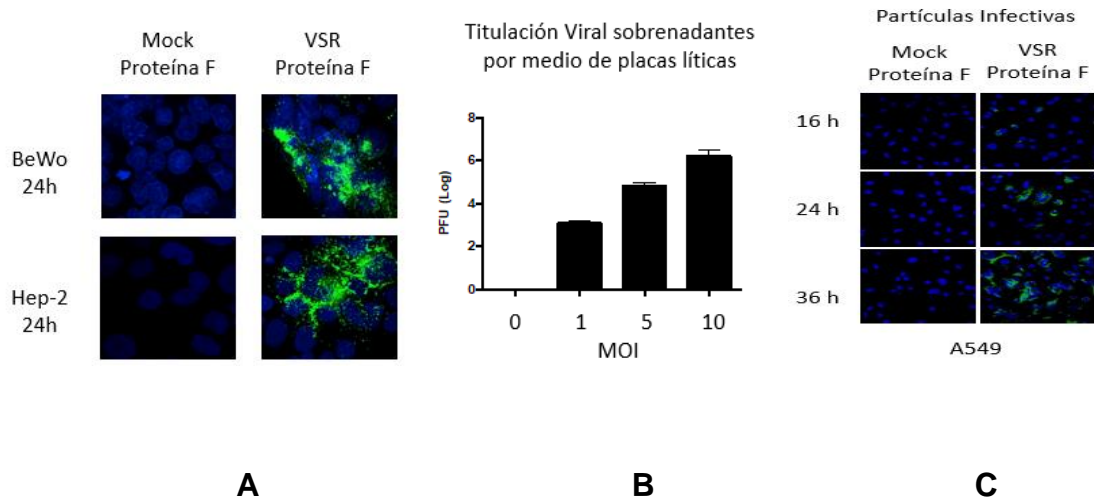
## Estudios que sugieren la infección vertical del VSR.

Para el caso del VSR aún se desconoce si existe una transmisión de forma vertical pero algunos estudios sugieren que éste patógeno podría ser transmitido por esta vía. A este respecto, el primer estudio que plantea esta idea es el presentado por Manti en el 2017 en donde un recién nacido de 35 semanas de gestación presentó problemas respiratorios, al momento de realizar la prueba de TORCH resulta negativo para todos los patógenos pero al realizar pruebas serológicas en sangre del recién nacido como en la madre se identificaron inmunoglobulinas anti-VSR en bajos niveles para confirmar estos resultados se realizaron pruebas por RT-PCR en donde encontraron secuencias virales. El caso descrito en este informe puede ser el primer caso clínico donde se muestra una transmisión vertical del VSR en un recién nacido (Manti *et al.*, 2017).

Se han realizado estudios acerca de la capacidad del VSR para invadir tejido intrauterino y así transmitirse verticalmente. En uno de ellos se utilizó un modelo de ratas gestantes que fueron inoculadas con el VSR, un 30% de los fetos se infectaron a partir de madres expuestas al virus y de los mismos un 40% fueron positivos para la presencia del VSR en pulmones. Además, sobrenadantes de los pulmones de los fetos fueron co-incubados con células humanas y se encontraron partículas infectivas en el cultivo celular (Piedimonte *et al.*, 2013).

De acuerdo con las evidencias anteriores se sugiere que durante el embarazo el VSR es diseminado desde el tracto respiratorio o tejido pulmonar hacia la circulación fetal a través de la placenta, y con ello promover la infección en el feto aumentando la probabilidad de presentar cuadros clínicos prematuros e inflamación crónica de las vías aéreas desde las etapas tempranas de la vida (Piedimonte y Pérez, 2014).

Recientemente nuestro grupo de trabajo mostró la susceptibilidad de la línea celular BeWo la cual posee características bioquímicas y fisiológicas similares a los trofoblastos de placenta de primer trimestre a la infección por VSR y la cual demostró que existe un ciclo completo de en este modelo celular (Velázquez *et al.*, 2017).



**Figura 8. Permisividad de las células BeWo a la infección por VSR.** A) **Entrada viral.** IF para la detección de proteína F de VSR en células BeWo y Hep-2 como control positivo de infección y Mock control negativo de infección. B) Titulación por medio de placas líticas de los sobrenadantes para obtener las unidades formadoras de placa (PFU). C) **Salida viral** IF para la identificación de proteína F de VSR en células A549 y Mock como control negativo de infección a 16, 24 y 36 hpi. Tomado de Velázquez *et al.*, 2017.



## Justificación.

En México uno de los principales patógenos que provoca infecciones respiratorias agudas e infecta a una población de 0 a 5 años es el Virus sincitial respiratorio, recientemente se ha descrito que este virus puede llevar a cabo el proceso de infección vertical, esto se ha demostrado utilizando un modelo animal y antecedentes en nuestro grupo de trabajo han demostrado que una línea celular de placenta de trofoblastos puede ser susceptible a la infección. Adicionalmente este virus emplea los lípidos celulares para completar su ciclo de infección, sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado si las proteínas SREBP, así como proteínas lipogénicas reguladas por estos factores de transcripción están siendo moduladas durante la infección por el VSR. Por lo cual es importante generar conocimiento acerca de esto ya que con ello se pueden generar futuras estrategias para el desarrollo de terapias antivirales.

## Hipótesis.

El VSR emplea a los lípidos durante su ciclo de infección por lo que es posible que los factores de transcripción de la familia SREBP se encuentren activos por lo que las enzimas involucradas en la síntesis de lípidos como FAS y HMGCR aumenten su expresión durante la misma.

## Objetivo General:

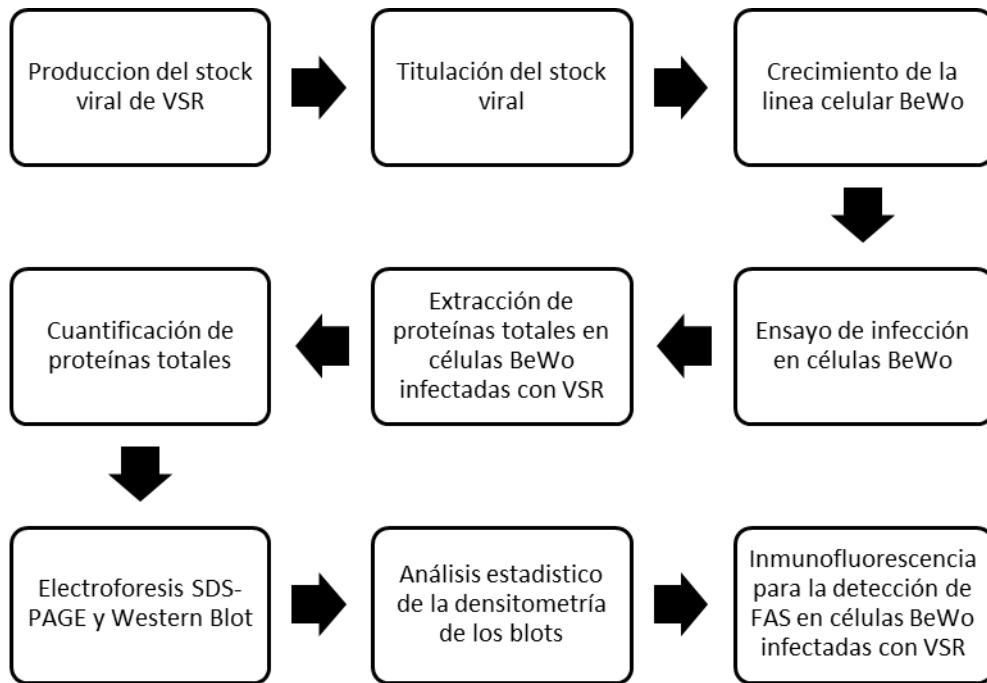
- Evaluar la activación de la familia de SREBP además de la actividad de proteínas involucradas en la síntesis de lípidos como FAS y HMGCR durante la infección con VSR en células BeWo.

## Objetivos particulares:

- Generar un stock viral a partir de células Hep-2.
- Evaluar la activación de SREBP1 y SREBP2 por medio de Western Blot en células infectadas por VSR.
- Evaluar la expresión de las proteínas FAS y HMGCR por medio de Western Blot e inmunofluorescencia en células infectadas por VSR.

## Diseño experimental.

En el siguiente diagrama se muestra el esquema general que se desarrollo a lo largo del trabajo experimental el cual fue dividido en 9 actividades diferentes las cuales se describen detalladamente en la metodología. Además, se muestran las líneas celulares utilizadas en el trabajo.



## Líneas celulares utilizadas.

|                     |                                                                                                                                                           |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Línea celular Hep-2 | Línea carcinoma epitelial humano susceptible a la infección por VSR y ampliamente utilizada para la propagación viral                                     |
| Línea celular BeWo  | Línea de coriocarcinoma humano la cual tiene características bioquímicas y endócrinas similares a los trofoblastos de placenta humana de primer trimestre |

## Método.

### Producción del Stock viral de VSR.

Para obtener el stock viral de VSR se utilizaron células Hep-2 las cuales ya se ha demostrado que son susceptibles a la infección por VSR además de ser una línea celular utilizada para la propagación viral. Para ello se cultivaron células en una botella T75 con medio DMEM (Dulbecco) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (GIBCO®) al 10% y antibiótico antimicótico al 1%. Las células fueron crecidas hasta tener una confluencia del 90% para después inocular el virus, posteriormente las células fueron incubadas por 2 horas con intervalos de agitación cada 15 minutos. Finalizado el tiempo de incubación se retiró el inóculo y se agregó medio suplementado, las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y se monitorearon por algunos días hasta observar el efecto citopático característico que es la formación de sincitios. Al observar un 80% de estas estructuras se procedió a recuperar el sobrenadante, para ello las células fueron despegadas mecánicamente con ayuda de un scraper. El sobrenadante fue sometido a 3 ciclos de 5 segundos a 4°C con un sonicador con el fin de lisar las células y recuperar las partículas virales que se encuentran dentro de ellas. El sobrenadante fue recuperado y se centrifugo a 3500 rpm por 7 minutos a 4°C. Alícuotas del sobrenadante fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

### Titulación del stock viral de VSR.

Para determinar el título viral de estos sobrenadantes, se realizaron ensayos de titulación por placas líticas y con ello determinar las unidades formadoras de placa (UFP) y estimar la multiplicidad de infección (MOI) que se utilizaron en los experimentos. Para ello se cultivaron 1, 500,000 células Hep-2 en una placa de 6 pozos, en medio DMEM (Dulbecco) con 10% de SFB y 1% de antibiótico-antimicótico. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas del abasto viral, para ello se adiciono a cada tubo 900 µl de DMEM base, posteriormente se le agrego 100 µl del virus al primer tubo y se agito con vortex, se hicieron 5 diluciones seriadas a la original y se usó un control sin infectar. A cada pozo se le adiciono 800 µl de cada dilución. Las células se incubaron durante 2 horas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% con intervalos de agitación cada 15 minutos y aproximadamente 30 minutos antes que termine la incubación del inóculo se preparó una mezcla de 1 parte de agarosa al 3%, previamente fundida en parrilla de calentamiento y 9 partes de DMEM con 2% SFB (la concentración total de agarosa fue de 0.3% P/V) la mezcla se mantuvo a baño maría a 60°C hasta su uso. Finalizado el tiempo de incubación se le adicionó 3 ml a cada pozo de la solución de agarosa al 0.3% P/V. Posteriormente, las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y se dejaron por 5 días para la formación de placas líticas. Finalizado el tiempo de incubación, se agregó 3 ml de

formaldehído (3.65% V/V) para fijar la capa celular sin quitar la agarosa y se dejó incubando por 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se retiró el formaldehído de los pozos a chorro de agua, la agarosa se quitó sumergiéndola en un recipiente con agua y por último se agregó 5 ml a cada pozo del colorante cristal violeta al 0.5% (SIGMA), acetato de sodio 1.36%, ácido acético glacial al 6% durante 30 minutos, los pozos fueron lavados con agua y las placas líticas fueron calculadas con la siguiente fórmula:

$$UFP = (\bar{x} \text{ de placas}) (\text{disolucion}) / \text{volumen inoculado}$$

#### Crecimiento de la línea celular BeWo.

Las células BeWo representan una línea celular obtenida a partir de trofoblasto humano, reportada en cultivos celulares continuos por Pattillo y Gey en el año 1968. Estas células mantienen propiedades bioquímicas y morfológicas similares a las reportadas para el citotrofoblasto proliferativo in útero durante el primer trimestre de embarazo. Presentan los requerimientos mínimos para células trofoblásticas, expresan la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG de sus siglas en inglés), lactógeno placentario progesterona y estrógeno, y se caracterizan por los siguientes marcadores: CK7+, HLA-I+, CD9+. A su vez, pueden ser sincicializadas in vitro como ocurre con los cultivos primarios de citotrofoblasto (son fusigénicas), y generan una polarización de la expresión de marcadores de membrana apical/basolateral con la presencia de uniones estrechas (Al-Nasiry *et al.*, 2006).

Para el crecimiento de esta línea celular se descongeló un vial y se hicieron dos lavados con medio base F12K (Dulbecco) de 5 ml cada uno con el fin de eliminar el medio de congelamiento (10% DMSO 20% SFB y Medio F12K). Posteriormente se colocaron en una caja T25 con medio de cultivo (Medio Base F12K 10% de SFB y 1% antibiótico antimicótico) aproximadamente 4 ml por caja y se incubaron a 37°C en una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Se cambió el medio de cultivo cada tercer día y se monitorearon las células hasta obtener una confluencia del 90%. Finalmente, las células fueron tripsinizadas y centrifugadas para seguir propagando la línea celular para los diferentes experimentos.

#### Ensayo de infección en células BeWo.

Para el ensayo de infección 1,500,000 de células BeWo fueron cultivadas en botellas T-25, bajo las mismas condiciones de cultivo mencionadas anteriormente. Posteriormente, las células fueron infectadas a 5 MOI, y como control negativo células fueron infectadas con un virus inactivado por calor (Mock). Ambos inóculos fueron incubados durante 2 horas a 37°C en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> con intervalos de agitación de 15 minutos. Finalizado el tiempo de incubación se retiró el inóculo en ambas cajas y se agregó medio de cultivo (Medio F12K, 5% de SFB

y 1% de Antibiótico antimicótico) y se incubaron a 37°C en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

#### Extracción de proteínas totales en células BeWo.

Finalizado el tiempo de infección las cajas T25 las cuales contienen las células BeWo infectadas y falsamente infectadas se despegaron utilizando 2 ml Tripsina-EDTA al 0.025% y se incubaron a 37°C por 2 minutos. Después se recuperaron los sobrenadantes y se colocaron en tubos Falcon de 15 ml los cuales se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, finalizado el tiempo de centrifugado se decantaron los sobrenadantes y se suspendieron los botones celulares en 1ml de PBS 1x con la finalidad de eliminar los residuos de medio de cultivo y de Tripsina-EDTA y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml los cuales nuevamente se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente posteriormente se decantó el sobrenadante y se agregaron 100 ul del amortiguador RIPA 1x (20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 150 mM NaCl, 1 mM de Na<sub>2</sub> EDTA 1 mM EGTA, 1% de Deoxicolato de sodio 2.5 mM, Pirofosfato de sodio 1 mM b-glicerofosfato) con una mezcla de inhibidores de proteasa y de fosfatasa 1x (ROCHE). Posteriormente los extractos fueron incubados durante 1 hora en agitación a 4°C. Al finalizar el tiempo de incubación del amortiguador RIPA se centrifugaron ambos tubos eppendorf a 13,000 rpm durante 20 minutos a 4°C con la finalidad de obtener 2 fases en el botón se encontrarán las células lisadas y en el sobrenadante las proteínas totales. Para finalizar la extracción de las proteínas se recuperaron los sobrenadantes y se guardaron a -70°C hasta su uso.

#### Cuantificación de proteínas totales.

Al obtener los extractos de las proteínas totales de células infectadas con VSR y células falsamente infectadas se realizó la cuantificación de estas, para ello se utilizó el método de cuantificación de Lowry, lo primero que se realizó fue una curva de calibración con un rango de concentraciones de 0.5mg/ml a 8mg/ml, se utilizó como calibrador albumina sérica bovina (BSA) para interpolar las muestras problema de los extractos.

Al tener la curva de calibración con BSA se agregaron 10 ul de cada extracto con las células infectadas con y las falsamente infectadas interpolándolas a la curva de calibración de esta manera se asegura que los datos de nuestras muestras aparezcan dentro del intervalo de la curva de calibración, posteriormente por separado se hizo una mezcla de la solución A (500-0113) y la solución S (500-115) del kit de cuantificación por Lowry (Bio Rad) utilizando 490 ul y 10ul respectivamente, se utilizó el vortex para garantizar la correcta dilución de los reactivos, después se adicionó 50 ul de ésta solución a los tubos donde se incluye la curva de calibración con las cantidades de proteína conocidas y las muestras

problema, enseguida se adicionaron a cada tubo 400 ul de la solución B (500-114) del mismo kit y se utilizó el vortex para mezclar las soluciones, se dejaron las muestras incubando a temperatura ambiente en oscuridad por 10 minutos para garantizar el correcto funcionamiento del kit, finalizado el tiempo de incubación se utilizó una placa de 96 pozos en donde fueron colocadas las muestras por triplicado aproximadamente 100 ul por pozo y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro Synergy™ HT (BioTek) a 725 nm.

Al obtener las absorbancias de nuestras muestras problema (Células infectadas y no infectadas) se interpolaron los datos en una gráfica en Excel para conocer la cantidad de proteína obtenida por ml.

#### Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot.

Teniendo en consideración la cantidad de proteínas totales que se obtuvieron en ambos extractos se realizó la electroforesis SDS-PAGE. Se utilizaron 50ug de cada extracto (células infectadas y no infectadas) los cuales fueron suspendidos en amortiguador Laemmli (2-mercaptoetanol, SDS y Azul de bromofenol) y calentados a 95°C por 10 minutos con la finalidad de desnaturalizar las proteínas. Posteriormente se hicieron dos geles de poliacrilamida el primero al 12% y el segundo al 6%, el primer gel se utilizó para la identificación y el análisis de la proteína de control de carga (GAPDH) y para la proteína viral como control de infección (M2-1) el segundo gel se utilizó para las proteínas de interés (familia SREBP, FAS y HMGCR). En este sentido al tener los porcentajes correspondientes de ambos geles se montaron las muestras de las proteínas desnaturalizadas en una cámara de electroforesis (Bio-Rad) con buffer de corrida (Tris Base 25mM, Glicina 192mM y SDS al 0.1%) y se corrió la electroforesis a 90 volts a 2 amperes durante 1 hora y 40 minutos. Finalizado el tiempo de corrida se prosiguió con la transferencia del gel a las membranas con la finalidad de tener en ella las proteínas y para ello se utilizaron membranas de PDVF y se transfirieron en la misma cámara (Bio-Rad) a 100 volts durante 2 horas a 4°C utilizando un buffer de transferencia (Tris Base 25mM, Glicina 192mM y Metanol 1:5). Al finalizar la transferencia se bloqueó la membrana con leche (Svelty descremada-PBS Tween 20 al 0.5%) durante una hora en agitación para garantizar el bloqueo de toda la membrana. Al finalizar el tiempo de bloqueo se lavó la membrana con PBS-Tween 3 veces durante 5 minutos. Al tener la membrana bloqueada se utilizaron los anticuerpos específicos para cada proteína primero para el control de carga y después para la proteína viral por lo cual se utilizaron las siguientes diluciones para cada anticuerpo, GAPDH (GTX627408) 1:8000, M2-1 (AB94805) 1:500 los cuales fueron incubados durante una hora y para la incubación del anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-mouse HRP a una dilución de 1:3000 el cual fue incubado durante una hora. Para la siguiente membrana en donde se

analizaron las proteínas de interés es decir la familia SREBP, FAS y HMGCR se utilizaron las siguientes diluciones de anticuerpos para SREBP1 (AB3259) 1:1000 overnight a 4°C en agitación, SREBP2 (AB30682) 1:1000 overnight a 4°C en agitación, FAS (AB99359) 1:1000 una hora y para HMGCR (AB174830) 1:1000 una hora. Para los anticuerpos secundarios se utilizaron HRP anti-rabbit 1:3000 y HRP anti-mouse 1:3000 ambos durante 1 hora. Cabe mencionar que entre cada anticuerpo se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20. Al finalizar el tiempo de incubación de los anticuerpos se realizó el revelado de membrana con la ayuda de un kit ultrasensible de quimioluminiscencia (SuperSignal™ West Femto Thermo Scientific 34095). Al obtener las bandas correspondientes de cada proteína se realizó el análisis densitométrico con ayuda de un software de computadora (ImageJ) expresando la densidad de bandas como unidades relativas y se normalizó respecto al control de carga.

#### Análisis estadístico de la densitometría de los blots.

Mediante las herramientas de análisis de datos de Excel se realizaron las pruebas estadísticas pertinentes. Para el caso del análisis de las diferencias en la densitometría de bandas para las proteínas de células infectadas o el control negativo, se realizó la prueba t- student para muestras independientes en la cual la variable aleatoria fue la razón de cambio entre la intensidad de las bandas de las proteínas en estudio y su normalización con el control de carga o su forma total. En todos los casos se consideró la significancia estadística, cuando el valor P fue menor a 0.05 ( $P < 0.05$ ) con una  $n=3$ .

#### Inmunofluorescencia para la identificación de FAS en células BeWo infectadas con VSR.

Para este ensayo se cultivaron 150,000 células BeWo en una placa de 24 pozos en la cual previamente se le colocó un cubreobjetos para que las células se adhieran a él. Posteriormente las células fueron infectadas con VSR a una multiplicidad de infección de 5 (MOI) y como controles negativos células infectadas con un virus inactivado, las células fueron incubadas bajo las condiciones descritas anteriormente. Finalizado el tiempo de incubación se retiró el inoculo y de dejo con medio de mantenimiento fresco, 24 horas post infección se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 30 minutos. Después se permeabilizaron las células con (PBS-Tritón Gelatina al 0.025%) durante 40 minutos. Posteriormente se bloquearon con (PBS-Tritón suero de chivo al 0.01%) durante 40 minutos. Al finalizar el bloqueo de las células se empleó el anticuerpo específico para la detección de la proteína FAS (AB99359) el cual se utilizó a una dilución de 1:200 en (PBS-Tritón Suero de chivo) durante 1 hora. Para el marcaje del anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo secundario FITC anti-mouse con una dilución 1:100 durante una hora, finalizado el tiempo de incubación de

anticuerpos se dieron 3 lavados con PBS-Tritón al 0.01% durante 5 minutos cada uno y uno más con agua destilada durante 10 minutos. Al tener las muestras con ambos anticuerpos se retiraron los cubreobjetos y se colocaron en un portaobjetos para el análisis en un microscopio confocal (Leica, TCS SP5).

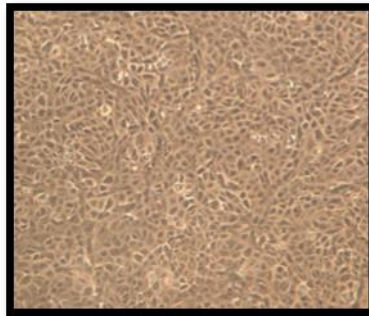


## Resultados.

### Obtención y propagación del stock viral de VSR.

Para obtener el stock viral de VSR se utilizaron células Hep-2 las cuales ya se ha demostrado que son susceptibles a la infección por VSR además de ser una línea celular utilizada para la propagación viral. En la figura A se observa la monocapa de células Hep-2 sin infección, en la figura B se observa el efecto citopático característico de las infecciones por VSR el cual es la formación de sincitios o células fusionadas y en la figura C se observa la placa de 6 pozos donde se incubaron por diluciones seriadas las partículas virales de VSR en donde se observan las placas líticas en una dilución  $10^{-3}$

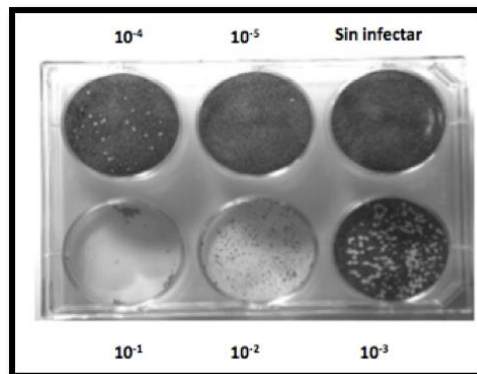
A) Células Hep-2 sin infectar



B) Células Hep-2 Infeccionadas VSR



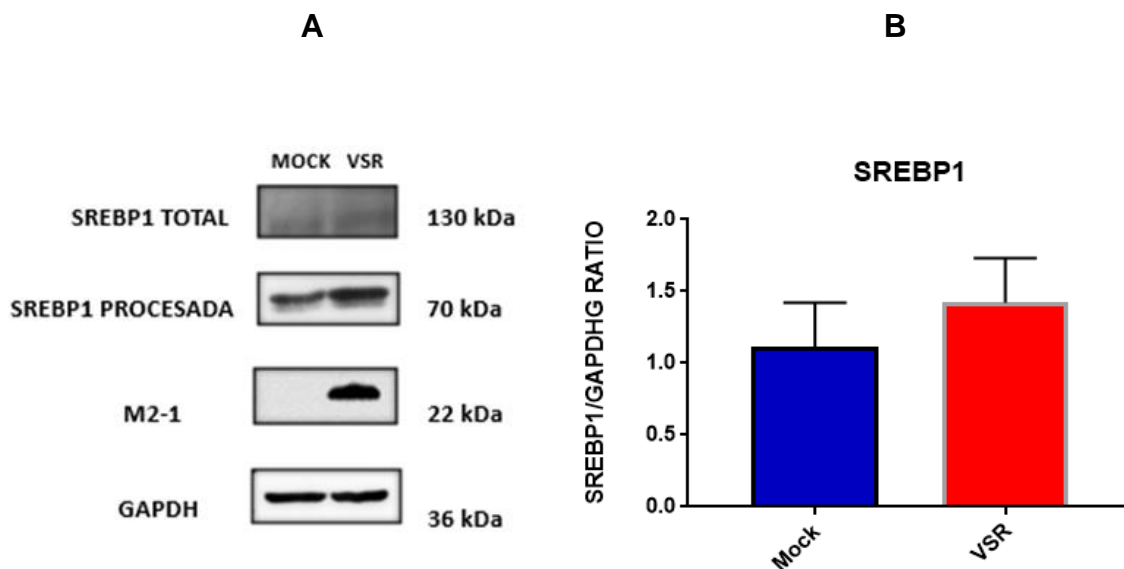
C) Placa de Titulación con diluciones seriadas de VSR



**Figura 9. Obtención y titulación del Stock de VSR.** A) Formación de la monocapa de células Hep-2 sin infección. B) Células Hep-2 infectadas por VSR a 48 horas observando el efecto citopático característico de la infección por VSR formación de sincitios. C) Placa de titulación por medio de placas líticas en donde se observan de manera concreta la formación de placas líticas en la dilución  $10^{-3}$ .

## Identificación de la forma activa de la proteína SREBP1 durante la infección con VSR en células BeWo.

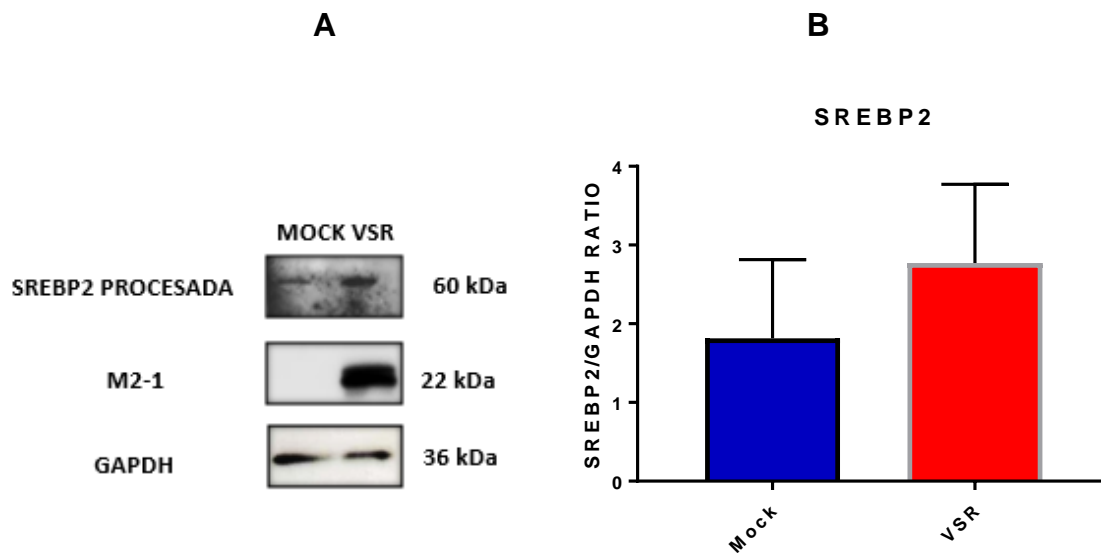
Considerando que los virus reclutan factores celulares para cumplir su ciclo de infección exitoso y los lípidos juegan un papel importante para ello, se decidió evaluar la expresión de SREBP1 que modula enzimas directamente relacionados con la biogénesis de ácidos grasos. Para ello un ensayo de Western Blot fue realizado en células BeWo infectadas con VSR a 5 MOI. Los datos obtenidos revelaron un aumento en la expresión de SREBP1 en su forma madura o escindida en células infectadas en comparación con el Mock (Figura 10 A). Adicionalmente, se observó un ligero cambio en la expresión de la forma total. Al realizar el análisis densitométrico (Figura 10 B), se confirmó que el aumento en la expresión de la forma madura fue del 20% y de la forma total de un 15%.



**Figura 10. Aumento en la expresión de SREBP1 en células BeWo infectadas con VSR.** A) Western Blot para el análisis de la forma total (130 kDa) y la forma procesada (70kDa) de la proteína SREBP1 en células BeWo infectadas y Mock, las células fueron infectadas con VSR a 5 MOI a 24 h. Expresión de la proteína M2-1 (22kDa) como control de infección y GAPDH (36kDa) como control de carga. B) **Análisis densitométrico de los blots.** Los valores densitométricos de SREBP1 Procesada se normalizaron con GAPDH y se calculó la razón. Los datos son medias  $\pm$  error estándar (S.E) de n = 3 experimentos independientes.

## Identificación de la forma activa de la proteína SREBP2 en infección con VSR en células BeWo.

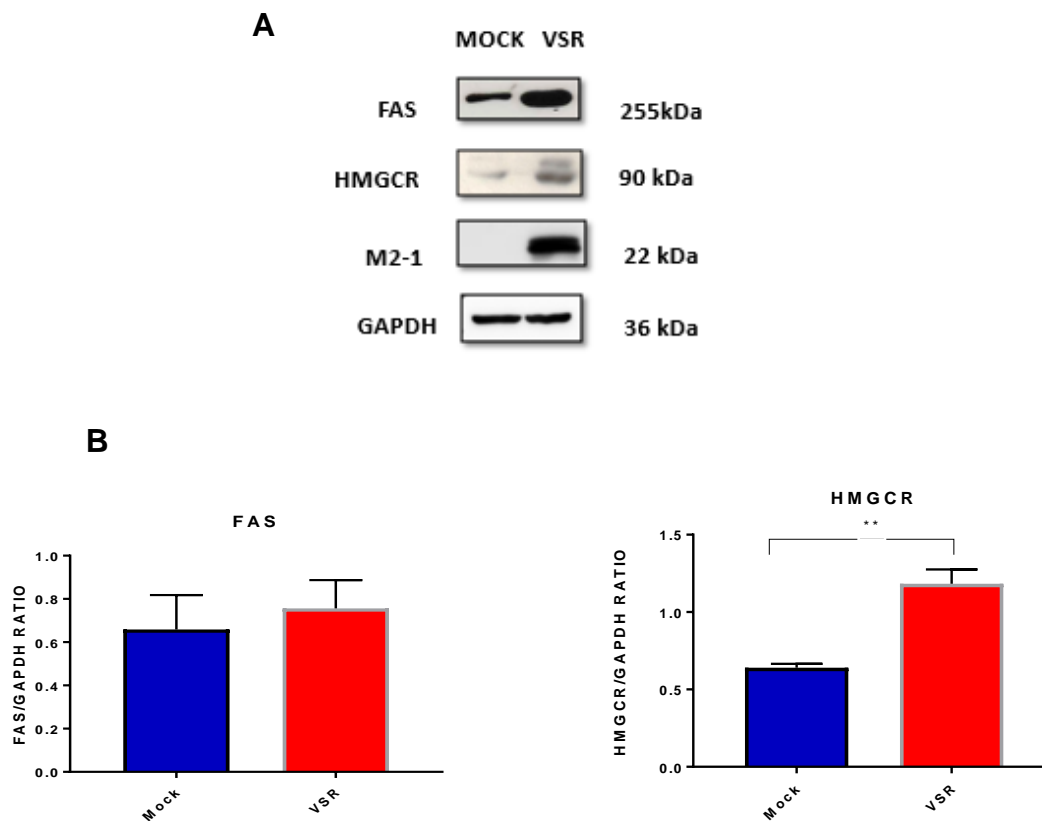
El factor de transcripción SREBP2 modula enzimas directamente relacionadas con la biogénesis del colesterol un ejemplo de ellas es la HMGCR. Considerando que la mayoría de las membranas celulares y balsas lipídicas están constituidas por colesterol, y que existe una interacción entre balsas lipídicas y proteínas virales del VSR se decidió también analizar la expresión de la proteína SREBP2 por medio de Western Blot en células BeWo infectadas con VSR (Figura 11 A). Los resultados obtenidos mostraron un aumento en la forma procesada de SREBP2, en las células infectadas, no siendo así en el control negativo de infección. Al realizar el análisis por densitometría (Figura 11 B). Se confirma un aumento del 38%.



**Figura 11. Aumento en la expresión de SREBP2 en células BeWo infectadas con VSR.** A) Western Blot para el análisis de la forma procesada de la proteína SREBP2 (60kDa) en células BeWo infectadas y Mock con VSR a 1 MOI a 24 h. Expresión de la proteína M2-1 (22kDa) como control de infección y GAPDH (36kDa) como control de carga. B) Análisis densitométrico de los blots. Los valores densitométricos de SREBP2 Procesada se normalizaron con GAPDH y se calculó la razón. Los datos son medias  $\pm$  error estándar (S.E) de n = 3 experimentos independientes.

## Análisis de la expresión de las proteínas FAS y HMGCR en infección con VSR en células BeWo.

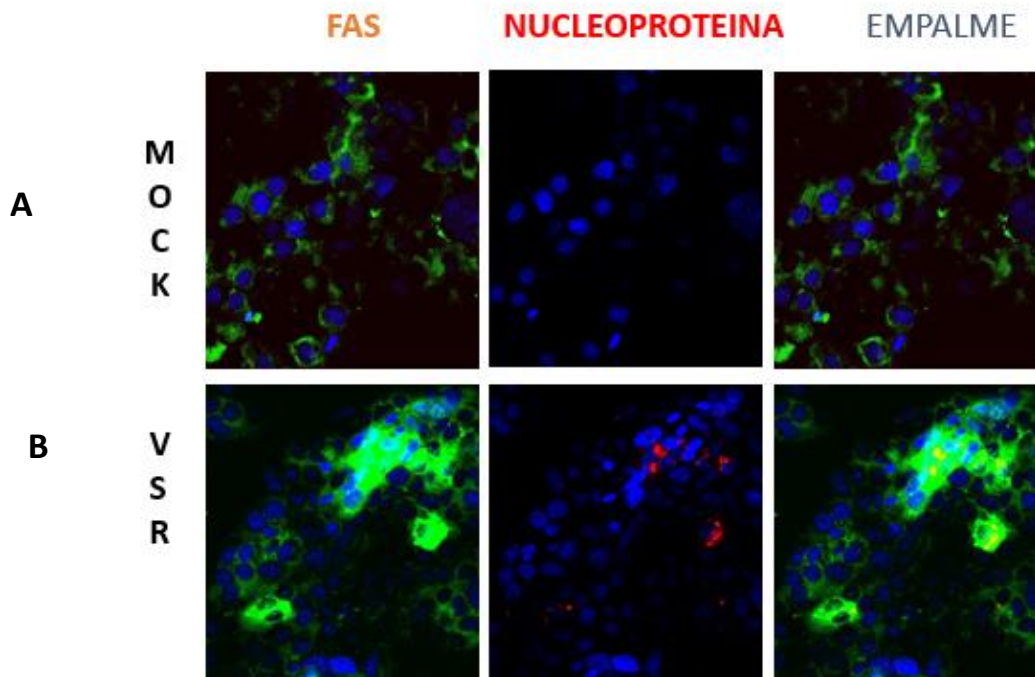
Al confirmar por Western Blot un aumento en las formas procesadas de la familia SREBP se decidió analizar los blancos enzimáticos lipogénicos de esta familia. Para ello ensayos de Western Blot fueron realizados en células BeWo infectadas y falsamente infectadas con VSR a 5 MOI por 24 horas. Para SREBP1 se analizó la sintasa de ácidos grasos (FAS) relacionada con la biogénesis de estos y para SREBP2 HMGCR la cual modula la biogénesis de colesterol (Figura 12 A). Nuestros datos experimentales detectaron un aumento en la expresión en ambas proteínas en células infectadas, al realizar el análisis por densitometría se confirmó un aumento del 28% para la sintasa de ácidos grasos y un 44% para HMGCR (Figura 12 B).



**Figura 12. Aumento en los blancos enzimáticos de la familia SREBP.** A) Western Blot para el análisis de la expresión de FAS (255 kDa) y HMGCR (90 kDa) en células BeWo y Mock infectadas con VSR a 5 MOI a 24 horas. M2-1 (22kDa) como control de infección y GAPDH (36 kDa) como control de carga. B) Análisis densitométrico de los Blots. Los valores densitométricos de FAS y HMGCR se normalizaron con GAPDH y se calculó la razón. Los datos son medias  $\pm$  error estándar (S.E) de n = 3 experimentos independientes.

### Cambio en la distribución de la sintasa de ácidos grasos (FAS) en infección con VSR en células BeWo.

Para confirmar el aumento observado por Western Blot por parte de la sintasa de ácidos grasos en células BeWo infectadas, se decidió realizar una inmunofluorescencia con el fin de observar la distribución celular de FAS durante la infección con el VSR (Figura 13). El análisis por microscopía mostro que existe una distribución homogénea de la sintasa de ácidos grasos en las células falsamente infectadas (Figura 13 A). Sin embargo, interesantemente en las células infectadas con VSR (Figura 13 B), se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia de la sintasa, así como un reclutamiento de esta enzima en regiones conocidas como cuerpos de inclusión, ya que se observó una co-localización entre la proteína viral N y la sintasa de ácidos grasos.



**Figura 13. Aumento en la expresión de FAS en células BeWo infectadas con VSR.** A) IF Células BeWo infectadas con virus inactivado por calor “Mock” analizadas por microscopía confocal para la detección de FAS y Nucleoproteína (proteína de VSR) donde se observa la expresión de forma homogénea de FAS. B) VSR Células BeWo infectadas con VSR analizadas por microscopia confocal para la detección de FAS y Nucleoproteína de VSR en donde se observa un aumento o reclutamiento de FAS además de observar la detección de la Nucleoproteína, al realizar el empalme de imágenes se observa una co-localización entre proteínas (FAS y N)

## Discusión.

Para que los virus tengan un ciclo de infección exitoso reclutan ciertos factores celulares, entre ellos los lípidos juegan un papel importante para la entrada, ensamblaje y salida de la partícula viral. En el presente trabajo se evidenció que proteínas y enzimas involucradas en la síntesis de lípidos en específico ácidos grasos y colesterol se sobre expresaron al existir infección por VSR en una línea celular de trofoblastos y con ello respaldar la idea de que son fundamentales en la infección por VSR.

Teniendo en consideración la importancia de los lípidos en las infecciones virales, las primeras proteínas analizadas en el trabajo fueron las de la familia SREBP, primero fue analizada SREBP1 por medio de ensayos de Western Blot y densitometría. Los resultados obtenidos mostraron un aumento en la expresión del 20% de la forma activa o madura de ésta proteína en comparación con el control (Figura10) lo cual indica que al existir una infección con VSR posiblemente este patógeno utilice la síntesis de lípidos para cumplir con su ciclo de infección, además, se observó un aumento del 15 % de la forma total lo cual nos sugiere que hay un mayor procesamiento de ésta proteína en células infectadas con VSR estos datos respalda la idea presentada en el trabajo de Yu en el 2009 en donde células de prepucio humano (HF) fueron infectadas con citomegalovirus (CMV) en donde se observó un aumento por ensayos de Western Blot en la expresión de la forma activa o madura de SREBP1, también observaron un cambio significativo en la forma total de ésta proteína en donde se detecta una mayor expresión en células infectadas. Los resultados obtenidos en el presente trabajo se comportan de manera similar a los estudios realizados por Yu en el 2009 por lo cual se sugiere que tanto citomegalovirus como VSR utilizan la síntesis de lípidos para efectuar de manera correcta su ciclo de infección.

La siguiente proteína evaluada por ensayos de Western Blot y densitometría fue la proteína SREBP2, el análisis mostro un aumento del 38% en células infectadas (Figura 11) Se ha mostrado en la literatura que la proteína SREBP2 está directamente relacionada en la modulación de enzimas que regulan la síntesis de colesterol y este a su vez es el principal compuesto de los microdominios conocidos como “balsas lipídicas” las cuales fungen como andamio para que exista una entrada, ensamblaje y una salida de las partículas virales. En este sentido los datos obtenidos respaldan la idea de que el al existir una infección por VSR ocurre un mayor procesamiento de colesterol indispensable para la entrada y formación de la partícula viral. De acuerdo con algunos estudios, al inhibir la síntesis de colesterol por medio de fármacos se observa una disminución en la progenie viral con lo que se demuestra que para que el virus pueda cumplir con su

ciclo de infección el colesterol juega un papel importante dentro de la infección viral.

Al observar un aumento en las formas procesadas de la familia SREBP, se decidió evaluar los blancos enzimáticos lipogénicos de esta familia. Para ello ensayos de Western Blot densitométría fueron realizados en células BeWo infectadas y falsamente infectadas con VSR a 5 MOI por 24 horas. Para ello el primer blanco enzimático evaluado y modulado por SREBP1 fue la sintasa de ácidos grasos (FAS) que genera palmitato, un ácido graso de 16 carbonos saturado, precursor de lípidos complejos e insaturados. Los resultados obtenidos por Western Blot y densitométría (Figura 12) mostraron un aumento en la expresión de la proteína del 28% en células infectadas con VSR. Se ha demostrado que FAS es fundamental para el ciclo de replicación de algunos virus entre ellos el VSR, esto se demuestra ya que al utilizar el fármaco TVB-3166 que inhibe la actividad de FAS en células Hep-2 infectas por VSR se observa una disminución de la progenie viral, esto se da ya que la proteína viral F necesita del palmitato en la membrana celular para comenzar con el proceso reconocimiento e internalización para posteriormente cumplir con el ciclo de infección (Ohol *et al.*, 2015).

Como se mencionó con anterioridad SREBP2 juega un papel importante en la biosíntesis del colesterol ya que cuando las células se ven privadas del mismo por diversos procesos las proteínas SREBP2 modulan enzimas para la síntesis de colesterol como lo es HMGCR en este sentido HMGCR fue el segundo blanco enzimático evaluado en el trabajo modulado por la familia SREBP.

Los resultados obtenidos por ensayos de Western Blot y densitométría (Figura 12) mostraron un aumento del 44% en la expresión de la proteína HMGCR en células BeWo infectadas por VSR con respecto al control. Estos datos respaldan la idea y los resultados mostrados en el trabajo de Yeo en el 2009, en donde observan un incremento en los RNAm para la proteína HMGCR al existir infección por VSR y sugiere que los aumentos en la actividad transcripcional de los genes de la HMGCR y el LDLR indican una disminución en los niveles de colesterol libre en la célula que coincide con la generación de partículas virales filamentosas y un aumento de la presencia de colesterol libre durante la infección por el virus (Yeo *et al.*, 2009).

Adicionalmente se ha identificado en otros modelos virales que ocurre un aumento en la expresión de la enzima HMGCR durante la infección con el virus Dengue. Los resultados sugieren que la infección por DENV aumenta la actividad de HMGCR a través de la inactivación de AMPK que conduce a niveles de colesterol más altos en el retículo endoplásmico necesarios para la formación de complejos replicativos, (Soto-Acosta *et al.*, 2017). Adicionalmente, en nuestro grupo de

investigación se ha identificado que durante la infección con VSR la forma activa de AMPK se encuentra disminuida en comparación de células falsamente infectadas, lo cual podría impactar en la síntesis lipídica, favoreciendo la replicación viral como lo observado para el virus Dengue (González *et al.*, 2017).

Los datos obtenidos en el presente trabajo, así como los antecedentes que se tienen, dan evidencias del aumento de la proteína HMGCR en infecciones virales como Dengue, Hepatitis C y VSR. Sugiriendo que esta proteína es fundamental para que se cumpla un ciclo de infección exitoso ya que como se mencionó anteriormente las balsas lipídicas constituidas principalmente por colesterol son fundamentales para la entrada y ensamblaje viral.

Al observar que las proteínas de la familia SREBP, así como sus blancos lipogénicos incrementan durante la infección con VSR, se decidió evaluar la distribución celular de la Sintasa de ácidos grasos (FAS) bajo condiciones de infección o no, e identificar si un marcador de cuerpos de inclusión viral se encontraba colindado con esta enzima.

El análisis por microscopía mostro datos interesantes al observar la distribución de la sintasa de ácidos grasos en células infectadas con VSR. ya que se observó una co-localización entre la proteína viral N y la sintasa de ácidos grasos (Figura 13) lo cual nos sugiere que posiblemente ésta última juegue un papel importante en el ensamblaje de la partícula viral. Ya que esta proteína viral al formar parte del complejo de replicación del VSR y al observar su expresión y cercanía con la sintasa de ácidos grasos se puede sugerir que esta última sea necesaria para la replicación de la partícula viral. Este hallazgo se asemeja a lo que sucede con la infección con Dengue en células Huh-7.5 en donde se aprecia una co-localización entre FAS y la proteína viral NS3 (Tiong-Yip *et al.*, 2014). En el caso del VSR se observó una co-localización entre FAS y la proteína viral N además de un aumento en la expresión de la sintasa de ácidos grasos en la infección con VSR lo cual nos sugieren aspectos importantes al existir infecciones virales el primero es que existe un cambio en la distribución en la expresión de FAS en ambos casos tanto en Dengue como en VSR el segundo aspecto muestra que FAS en condiciones normales se distribuye intracelularmente en el citoplasma pero al existir infecciones virales esta se puede translocar de forma perinuclear en el caso del Dengue y de forma nuclear en el caso del VSR por último es que FAS favorece la replicación viral en el caso de la infección con Dengue esto se observó al encontrar una co-localización con marcadores de replicación y en el caso del VSR al inhibirla con algunos fármacos disminuye la progenie viral.

De acuerdo a algunos estudios con diferentes virus se demuestra la importancia que tiene la Sintasa de ácidos grasos dentro de las infecciones virales, tal es el



caso de la infección con VIH-1 en una línea celular transformada (TZM-bl) en donde aumentaron los niveles de FAS significativamente pero al utilizar siRNAs y herramientas farmacológicas como es el caso de Fasnall un inhibidor directo de la sintasa de ácidos grasos disminuyó la progenie viral (Kulkarni *et al.*, 2017). Adicionalmente, se observó que normalmente la distribución intracelular de la sintasa de ácidos grasos es citosólica pero al existir infecciones virales como en el caso de Hepatitis B y VIH-1 se efectúa un reclutamiento nuclear y en el caso del Dengue una distribución perinuclear y una mayor expresión de la misma lo que respalda los datos obtenidos en la (figura 13) demostrando el papel que tiene dentro de las infecciones virales (Kulkarni *et al.*, 2017).

Con los datos obtenidos en el presente trabajo y teniendo en consideración los antecedentes, se puede afirmar que el metabolismo de lípidos es un mecanismo celular que actualmente se ha identificado que los virus pueden usurpar para llevar a cabo sus procesos de infección. Enzimas, factores transcripcionales y estructuras celulares involucradas en este evento juegan un papel clave para la entrada, replicación, ensamble y salida viral. Los estudios con VSR sugieren que estructuras como las balsas lipídicas y FAS participan para algunos eventos durante la infección con este patógeno. Nuestras evidencias, aportan elementos claves para comprender la biología del virus, ya que la activación de factores transcripcionales como la familia SREBP, promoverán la expresión de enzimas involucradas en la génesis de colesterol y ácidos grasos los cuales constituyen la materia fundamental para generar balsas lipídicas o cambiar el perfil lipídico dentro de una célula infectada. Finalmente, el identificar proteínas virales que se asocien o activen estos factores lipídicos durante la infección, son elementos claves para el diseño de futuras estrategias antivirales. Nuestros hallazgos sugieren que FAS se encuentra colindante con los cuerpos de inclusión viral, estructuras importantes durante la replicación y ensamble viral, es probable que VSR reclute a esta enzima para cambiar el perfil lipídico dentro de estas plataformas para participar en el ensamble del virión, o generar un microambiente con lípidos que funcionen como segundos mensajeros para reclutar estructuras celulares que faciliten el ensamble o replicación viral, son cuestiones que futuras investigaciones deben de contestar.

## Conclusiones.

- Las formas activas de SREBP se encuentran incrementadas durante la infección por VSR en células BeWo.
- Algunos blancos de la familia SREBP como FAS y HMGCR de igual manera se ven incrementados cuando existe una infección por VSR en células BeWo.
- Al evaluar por Inmunofluorescencia la proteína FAS se observó una distribución homogénea en las células falsamente infectadas no siendo así en células infectadas por VSR en donde se aprecia un reclutamiento de la proteína.
- Además, se observó una co-localización entre la proteína FAS y la nucleoproteína de VSR lo que sugiere que posiblemente juegue un papel importante en el ensamblaje del VSR.

## Prospectivas.

- Analizar en un fraccionamiento celular (Núcleo-Citoplasma) la expresión de la familia SREBP con infección de VSR
- Analizar la inhibición de los factores que promueven la escisión de SREBP en este caso utilizar un inhibidor específico para la proteína SCAP.
- Identificar el papel de la posible interacción de FAS con la nucleoproteína viral.

## Referencias.

1. Al-Nasiry S, Spitz B, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R (2006). Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells. *Hum reprod* 21: 193-201.
2. Bawage SS, Tiwari PM, Pillai S, Dennis V, Singh SR1. (2013). Recent advances in diagnosis, prevention, and treatment of human respiratory syncytial virus. *Adv Virol*. 2013:595768.
3. Bien, C.M., and Espenshade, P.J. (2010). Sterol Regulatory Element Binding Proteins in Fungi: Hypoxic Transcription Factors Linked to Pathogenesis. *Eukaryot. Cell* 9, 352–359.
4. Bitko, V., Shulyayeva, O., Mazumder, B., Musiyenko, A., Ramaswamy, M., Look, D.C., and Barik, S. (2007). Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF-kappaB-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth. *J. Virol.* 81, 1786–1795.
5. Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331–340.
6. Carter, S.D., Dent, K.C., Atkins, E., Foster, T.L., Verow, M., Gorny, P., Harris, M., Hiscox, J.A., Ranson, N.A., Griffin, S., et al. (2010). Direct visualization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus reveals the structural basis for membrane permeability. *FEBS Lett.* 584, 2786–2790.
7. Cervantes-Ortiz SL, Zamorano-Cuervo N, Grandvaux N. (2016). Respiratory Syncytial Virus and Cellular Stress Responses: Impact on Replication and Physiopathology. *Viruses*. 8(5): E124.
8. Chang A. y Dutch R. E. (2012). Paramyxovirus Fusion and Entry: Multiple Paths to a Common End. *Viruses*. 4: 613-636.
9. Chang TH, 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.
10. Chu HY, Katz J, Tielsch J, Khatry SK, Shrestha L, LeClerq SC, Magaret A, Kuypers J, Steinhoff M, Englund JA. (2016). Respiratory syncytial virus infection in infants in rural Nepal. *Virology*. 73(2):145-54.
11. Collins PL, Fearn R, Graham BS. (2013). Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 372: 3-38.
12. Corzo-López M, Valdés-Ramírez O. (2013). El Virus Sincitial Respiratorio Humano Una Panorámica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 44 (2): 1-13

13. Drexler JF, Corman V. M, Muller MA, Maganga GD, Vallo P, Binger T, Gloza R. F, Rasche A, Yordanov S, Seebens A, Oppong S, Sarkodie YA, Pongombo C, Lukashev AN, Schmidt CJ, Stocker A, Crnaeiro AJ, Erbar S, Maisner A, Fronhoffs F, Buettner R, Kalko EK, Kruppa T, Franke CR, Kallies R, Yandoko ER, Herrler G, Reusken C, Hassanin A, Kruger DH, Matthee S, Ulrich RG, Leroy EM, Drosten C. (2012). Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat Commun* 24; 3:796.
14. Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Foufelle F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*. 86(11): 839-48.
15. Efimova EV, Ricco N, Labay E, Mauceri HJ, Flor AC, Ramamurthy A, Sutton HG, Weichselbaum RR, Kron SJ. (2017). HMG-CoA reductase inhibition delays DNA repair and promotes senescence after tumor irradiation. *Mol Cancer Ther*. 17(2):407-418.
16. Elliott J, Lynch OT, Suessmuth Y, Qian P, Boyd CR, Burrows JF, Buick R, Stevenson NJ, Touzelet O, Gadina M, Power UF, Johnston JA. (2007). Respiratory syncytial virus NS1 protein degrades STAT2 by using the Elongin-Cullin E3 ligase. *J Virol*. 81(7): 3428-3.
17. Fernandes M. L., Monroy M. I. E., Angeles M. J., Sarquiz M. B., Pardavé A. H. D., Muñoz M. J. E. (2017). Prevalence of Non-influenza Respiratory Viruses in Acute Respiratory Infection Cases in Mexico. *PLoS ONE*. 12(5).
18. Ferreira-Guerrero E, Báez-Saldaña R, Trejo-Valdivia B, Ferreyra-Reyes L, Delgado-Sánchez G, Chilián-Herrera OL, Mendoza-Alvarado LR, García-García L. (2013) Infecciones respiratorias agudas en niños y signos de alarma identificados por padres y cuidadores en México. *Salud Publica Mex*. 55 supl 2: S307-S313.
19. Fujino, T., Nakamuta, M., Yada, R., Aoyagi, Y., Yasutake, K., Kohjima, M., Fukuizumi, K., Yoshimoto, T., Harada, N., Yada, M., et al. (2010). Expression profile of lipid metabolism-associated genes in hepatitis C virus-infected human liver: Lipid metabolism in HCV-infected liver. *Hepatol. Res*. 40, 923–929.
20. Gang X, Yang Y, Zhong J, Jiang K, Pan Y, Karnes RJ, Zhang J, Xu W, Wang G, Huang H. (2016). P300 acetyltransferase regulates fatty acid synthase expression, lipid metabolism and prostate cancer growth. *Oncotarget* 7(12):15135-49.
21. González-Reyes, L., Ruiz-Argüello, M.B., García-Barreno, B., Calder, L., López, J.A., Albar, J.P., Skehel, J.J., Wiley, D.C., and Melero, J.A. (2001). Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two

distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9859–9864.

22. Gower, T.L., and Graham, B.S. (2001). Antiviral activity of lovastatin against respiratory syncytial virus in vivo and in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1231–1237.
23. Heaton NS, Randall G. (2011). Multifaceted Roles for Lipids in Viral Infection. *Trends in Microbiology.* 19(7), 368–375.
24. Huang, J., Chen, S., Cai, D., Bian, D., and Wang, F. (2018). Long noncoding RNA IncARSR promotes hepatic cholesterol biosynthesis via modulating Akt/SREBP-2/HMGCR pathway. *Life Sci.* 203, 48–53.
25. Jasso GL. (2006). Infecciones congénitas poco habituales de transmisión vertical. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 63:55-63.
26. Jawetz, Melnick, & Adelberg's *medical microbiology* (2010) (New York: McGraw Hill Medical).
27. Jenke-Kodama, H., Sandmann, A., Müller, R., and Dittmann, E. (2005). Evolutionary Implications of Bacterial Polyketide Synthases. *Mol. Biol. Evol.* 22, 2027–2039.
28. Kulkarni, M.M., Ratcliff, A.N., Bhat, M., Alwarawrah, Y., Hughes, P., Arcos, J., Loïselle, D., Torrelles, J.B., Funderburg, N.T., Haystead, T.A., et al. (2017). Cellular fatty acid synthase is required for late stages of HIV-1 replication. *Retrovirology* 14, 45.
29. 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: 230-242
30. Manti, S., Cuppari, C., Lanzafame, A., Salpietro, C., Betta, P., Leonardi, S., Perez, M.K., and Piedimonte, G. (2017). Detection of respiratory syncytial virus (RSV) at birth in a newborn with respiratory distress. *Pediatr. Pulmonol.* 52, E81–E84.
31. Mastrangelo P, Hegele RG. (2013). RSV Fusion: Time for a New Model. *Viruses.* 5(3):873-85.
32. Mercer J, Mazzon M. (2014). Lipid interactions during virus entry and infection. *Cell Microbiol.* (10):1493-502.
33. Messenger K. (2008). Novedades en virus respiratorio sincicial (VRS) I: patogenia. 8(9):1713.
34. Miserez AR, Muller PY, Barella L, Barella S, Staehelin HB, Leitersdorf E, Kark JD, Friedlander Y. (2002). Sterol-regulatory element-binding protein (SREBP)-2 contributes to polygenic hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis.* 164(1):15-26.

35. Murata Y. (2008) Respiratory syncytial virus infection in adults. *Curr Opin Pulm Med.* 14(3):235-40.
36. Ohol YM, Wang Z, Kemble G, Duke G. (2015). Direct Inhibition of Cellular Fatty Acid Synthase Impairs Replication of Respiratory Syncytial Virus and Other Respiratory Viruses. *PLoS One.* 10(12): 0144648.
37. Piedimonte G, Walton C, Samsell L. (2013). Vertical Transmission of Respiratory Syncytial Virus Modulates Pre- and Postnatal Innervation and Reactivity of Rat Airways. *PLoS ONE*; 8(4): e61309.
38. Piedimonte G. y Perez M. K. (2014). Alternative Mechanisms for Respiratory Syncytial Virus (VSR) Infection and Persistence: Could VSR Be Transmitted Through the Placenta and Persist into Developing Fetal Lungs? *Current Opinion on Pharmacology.* 16:82-8.
39. Rey-Jurado, E., and Kalergis, A.M. (2017). Immunological Features of Respiratory Syncytial Virus-Caused Pneumonia—Implications for Vaccine Design. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
40. Ruiz R, Jideonwo V, Ahn M, Surendran S, Tagliabracci VS, Hou Y, Gamble A, Kerner J, Irimia-Dominguez JM, Puchowicz MA, DePaoli-Roach A, Hoppel C, Roach P, Morral N. (2014). Sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) is required to regulate glycogen synthesis and gluconeogenic gene expression in mouse liver. *J Biol Chem.* 28;289(9):5510-7.
41. Saravolatz LD, Empey KM, Peebles RS, Kolls JK. (2010). Pharmacologic advances in the treatment and prevention of respiratory syncytial virus. *Clinical infectious disease.* 50(9), 1258-1267.
42. Shaikh FY, Crowe JE Jr. (2013). Molecular mechanisms driving respiratory syncytial virus assembly. *Future Microbiol.* 8(1):123-31.
43. Shimano, H., Horton, J.D., Shimomura, I., Hammer, R.E., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J. Clin. Invest.* 99, 846–854.
44. Soto-Acosta, R., Bautista-Carbajal, P., Cervantes-Salazar, M., Angel-Ambrocio, A.H., and Del Angel, R.M. (2017). DENV up-regulates the HMG-CoA reductase activity through the impairment of AMPK phosphorylation: A potential antiviral target. *PLoS Pathog.* 13, e1006257.
45. Tabata T, Petitt, M, Puerta-Guardo H, Michlmayr D, Wang C, Fang-Hoover, J., Pereira, L. (2016). Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Y Microbe.* 20(2), 155–166.
46. Taleb, S.A., Al Thani, A.A., Al Ansari, K., and Yassine, H.M. (2018). Human respiratory syncytial virus: pathogenesis, immune responses, and current

- vaccine approaches. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.*
47. Tayyari, F., Marchant, D., Moraes, T.J., Duan, W., Mastrangelo, P., and Hegele, R.G. (2011). Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nat. Med.* 17, 1132–1135.
  48. Tiong-Yip, C.-L., Aschenbrenner, L., Johnson, K.D., McLaughlin, R.E., Fan, J., Challa, S., Xiong, H., and Yu, Q. (2014). Characterization of a respiratory syncytial virus L protein inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 3867–3873.
  49. Velázquez M, González D, Vargas T, Martínez CM, Castillo VE, García CJ, Helguera C, León M. (2017). A human placental choriocarcinoma cell line (BeWo) is susceptible to infection with Respiratory Syncytial Virus. Artículo en preparación.
  50. Vernia M. 2007. Estudio del factor de transcripción srebp1 en estados de resistencia a insulina. Instituto de Biomedicina de Valencia. Tesis Doctoral. España.
  51. Wong-Chew RM, Farfán-Quiroz R, Sánchez-Huerta JL, Nava-Frías M, Casasola-Flores J, Santos-Preciado JI. Frecuencia de virus respiratorios y características clínicas de niños que acuden a un hospital en México. *Salud Pública Mex* 2010; 52:528-532.
  52. Wong MM, Ronald MK. (2009). The role of HMGCR alternative splicing in statin efficacy. *Trends Cardiovasc Med.* 19(5):173-7.
  53. Yeo, D.S.-Y., Chan, R., Brown, G., Ying, L., Sutejo, R., Aitken, J., Tan, B.-H., Wenk, M.R., and Sugrue, R.J. (2009). Evidence that selective changes in the lipid composition of raft-membranes occur during respiratory syncytial virus infection. *Virology* 386, 168–182.
  54. Yin F, Sharen G, Yuan F, Peng Y, Chen R, Zhou X, Wei H, Li B, Jing W, Zhao J. (2017). TIP30 regulates lipid metabolism in hepatocellular carcinoma by regulating SREBP1 through the Akt/mTOR signaling pathway. *Oncogenesis.* 6(6):e347.
  55. Yu, Y., Maguire, T.G., and Alwine, J.C. (2012). Human cytomegalovirus infection induces adipocyte-like lipogenesis through activation of sterol regulatory element binding protein 1. *J. Virol.* 86, 2942–2949.
  56. Ziegler AB, Thiele C, Tenedini F, Mélisande R, Leyendecker P, Hoermann, A, Soba P, Tavosanis G. (2017). Cell-Autonomous Control of Neuronal Dendrite Expansion via the Fatty Acid Synthesis Regulator SREBP. *Cell Rep.* 21(12): 3346-3353.