



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

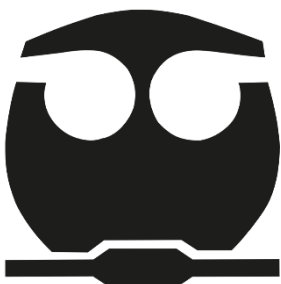
Evaluación del tipo de infección persistente establecida por
el virus sincicial respiratorio en un modelo *in vitro* y análisis
de la distribución intracelular de las proteínas virales

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PRESENTA

XIMENA RUIZ GÓMEZ



Ciudad de México

2019



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Rocío Tirado Mendoza**
VOCAL: **Profesor: Rosa Camacho Sandoval**
SECRETARIO: **Profesor: Evelyn Rivera Toledo**
1er SUPLENTE: **Profesor: Genaro Jiménez Reyes**
2° SUPLENTE: **Profesor: Tanya Plett Torres**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Inmunomodulación y Agentes Patógenos, Facultad de Medicina, UNAM.

Asesor del tema:

Dra. Evelyn Rivera Toledo

Supervisor técnico:

M en C. Carlos Alberto Santiago Olivares

Sustentante:

Ximena Ruiz Gómez

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS | 1 |
| I. RESUMEN | 3 |
| II. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 2.1. Virus sincicial respiratorio | 5 |
| 2.1.1 Clasificación | 5 |
| 2.1.2 Estructura | 5 |
| 2.1.3 Genoma | 6 |
| 2.1.4 Proteínas virales | 7 |
| 2.1.5 Ciclo de replicación | 9 |
| 2.2 Localización intracelular de las proteínas del RSV | 11 |
| 2.3 Relevancia de la infección por el RSV | 15 |
| 2.4 Epidemiología de la infección por el RSV | 16 |
| 2.5 Infección persistente causada por el RSV | 17 |
| 2.6 Persistencia viral | 18 |
| 2.7 Mecanismos de persistencia viral | 20 |
| 2.8 Modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> para el estudio de la persistencia del VSR | 24 |
| 2.9 Tipos de persistencia <i>in vitro</i> | 25 |
| III. ANTECEDENTES | 27 |
| 3.1. Modelo de persistencia del RSV en macrófagos | 27 |
| VI. JUSTIFICACIÓN | 29 |
| V. HIPÓTESIS | 29 |
| VI. OBJETIVOS | 30 |
| • Objetivo general | 30 |
| • Objetivos particulares | 30 |
| VII. MATERIALES Y METODOS | 31 |
| 7.1. Cultivos celulares..... | 31 |
| 7.2. Infección aguda de macrófagos y de células HEp-2 con el RSV | 31 |
| 7.3. Inmunofluorescencia directa | 32 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 7.4. | Separación de células positivas y negativas para proteínas virales mediante citometría de flujo | 32 |
| 7.5. | Extracción de RNA viral | 33 |
| 7.6. | Cuantificación de copias de genoma viral por RT-PCR cuantitativo | 33 |
| 7.7. | Titulación del RSV por el método del TCID ₅₀ | 34 |
| 7.8. | Fraccionamiento celular | 34 |
| 7.9. | Western Blot | 35 |
| 7.10. | Determinación de la densidad boyante de las partículas virales | 36 |
| VIII. | RESULTADOS | 38 |
| 8.1. | Determinación del tipo de persistencia establecida por el RSV | 38 |
| 8.2. | Determinación de la presencia de partículas virales defectuosas | 44 |
| 8.3. | Localización intracelular de las proteínas virales | 47 |
| XI. | DISCUSIÓN | 50 |
| X. | CONCLUSIONES | 56 |
| XI. | PERSPECTIVAS | 56 |
| XII. | REFERENCIAS | 57 |
| XIII. | ANEXOS | 66 |
| A1. | Densidad de las fracciones de sacarosa negativas para proteínas virales | 66 |
| A2. | Reactivos y soluciones | 69 |
| A3. | Patrón de distribución de bandas para la identificación de proteínas del RSV en Western blot..... | 74 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------|--|
| MΦ | Macrófago |
| MΦN | Macrófagos no infectados |
| MΦP | Macrófagos infectados de manera persistente |
| MΦA | Macrófagos infectados de manera aguda |
| SN | Sobrenadante |
| SN- MΦP | Sobrenadante de cultivo de infección persistente |
| CMV | Citomegalovirus |
| HPV | Virus del papiloma humano |
| HIV | Virus de la inmunodeficiencia adquirida |
| HBV | Virus de la hepatitis B |
| HCV | Virus de la hepatitis C |
| HSV | Virus del herpes simple |
| LCMV | Virus de la coriomeningitis linfocítica |
| EBV | Virus del Epstein barr |
| SeV | Virus sendai |
| RSV | Virus sincicial respiratorio |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-1 | Interleucina 1 |
| IP-10 | Proteína-10 inducible de interferón gama |
| RANTES | Quimiocina regulada, expresada y secretada durante la activación de células T normales |
| NO | Óxido nítrico |
| Jak | Cinasa Janus |
| STAT | Transductor de señal y activador de la transcripción |
| IFN I | Interferón tipo I |
| IFN-β | Interferón β |
| MHC | Complejo principal de histocompatibilidad |

| | |
|-------|---|
| RNA | Ácido ribonucleico |
| mRNA | RNA mensajero |
| miRNA | microRNA |
| GVDs | Genomas virales defectuosos |
| RLRS | Receptores tipo RIG-I |
| RIG-1 | Gen inducible por ácido retinoico |
| MDA5 | Factor asociado a la diferenciación del melanoma |
| MAVS | Señalización antiviral mitocondrial |
| NF-κB | Factor de transcripción nuclear kappa B |
| IRF3 | Factor 3 regulador de la producción de interferón |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| TNFR1 | Receptor 1 del factor de necrosis tumoral |
| TNFR2 | Receptor 2 del factor de necrosis tumoral |
| GAGs | Glicosaminoglucanos |
| PAK-1 | Proteína cinasa de serina y treonina |
| IMP-β | Importina tipo beta |
| CRM1 | Exportina tipo 1 |
| FcγR | Receptor Fc gamma |
| IATRI | Infecciones agudas del tracto respiratorio inferior |
| EPOC | Enfermedad pulmonar obstructiva crónica |
| Le | Secuencia líder |
| Tra | Secuencia tráiler |
| gs | Señal de transcripción de inicio de un gen |
| ge | Señal de transcripción de término de un gen |
| TAP | Transportador asociado con el procesamiento de antígeno |
| kDa | Kilodaltones |
| pb | Pares de bases |
| rpm | Revoluciones por minuto |

I. RESUMEN

Las infecciones virales persistentes están definidas como aquellas en las que un virus no es eliminado completamente del organismo, permaneciendo en células específicas por tiempo indefinido. Esto, debido a la desregulación de la respuesta inmune del hospedero y a mecanismos propios del virus para evadir los mecanismos de respuesta antiviral, así como para inhibir la muerte de la célula hospedera. Los virus con genomas de RNA tienen un alto índice de mutación lo cual puede llevar a la producción de virus con genomas defectuosos, mismos que pueden contribuir al establecimiento o mantenimiento de las infecciones persistentes. La persistencia del virus sincicial respiratorio (RSV) se ha observado de manera circunstancial en humanos y se ha asociado con el desarrollo de enfermedades crónicas respiratorias. En nuestro grupo de investigación contamos con un modelo *in vitro* para estudiar los mecanismos de persistencia del VSR que consiste de una línea de macrófagos murinos infectada persistentemente con este virus respiratorio. Considerando que la persistencia viral *in vitro* puede ser de tipo real latente o real en estado estacionario, en la que el genoma del virus está presente en todas las células del cultivo o de tipo acarreadora, que se mantiene por la liberación de virus infecciosos a partir de una pequeña población de células infectadas que producen virus con capacidad para infectar *de novo* a las células vecinas, el objetivo de este proyecto fue evaluar el tipo de persistencia establecida por el RSV. Asimismo, se evaluó la producción de virus defectuosos y localización intracelular de las proteínas virales. El tipo de persistencia se estudió separando por citometría de flujo a las células de los cultivos infectados persistentemente por el RSV, de acuerdo con la presencia o ausencia de proteínas virales, obteniendo dos poblaciones, la que no expresó proteínas virales y la población que sí expresó proteínas virales. El cultivo independiente de cada población mostró que después de 3–6 pases, todas las células expresaban proteínas virales, aún aquellas que eran negativas al momento de la separación. Además, mediante RT-PCR cuantitativo se encontró que el genoma viral estaba presente en las dos poblaciones celulares, sugiriendo que el VSR establece una persistencia de tipo real en estado estacionario, con producción abundante de partículas virales defectuosas, ya que las densidades calculadas por análisis en gradientes de sacarosa indicaron

que los virus detectados tenían densidades menores a las reportadas para los virus completos. Finalmente, las proteínas estructurales M, N, P , F y L se encontraron en el citoplasma y núcleo de los macrófagos infectados de forma persistente, con mayor abundancia en el compartimento nuclear, y de manera similar, las proteínas M, F, N y P se encontraron en núcleo en tiempos tempranos después de una infección aguda, sin embargo, solo las proteínas F y P se encontraron en citoplasma en este caso. Estos resultados son novedosos, ya que no existen reportes anteriores acerca de la ubicación nuclear de las proteínas N, P, F y L durante la infección del RSV en macrófagos o en células epiteliales.

2.1 Virus sincicial respiratorio

2.1.1 Clasificación

El virus sincicial respiratorio (RSV) pertenece al género *Orthopneumovirus*, subfamilia *Pneumovirinae*, familia *Pneumoviridae* y orden *Mononegavirales* (Comité Internacional de Taxonomía de Virus, 2015). Tiene dos grupos antigénicos, A y B, clasificados de acuerdo a la variación en la secuencia de nucleótidos del gen G.

2.1.2 Estructura

Los viriones pueden tener una forma esférica de 100-350 nm de diámetro, o bien, forma de filamentos largos con diámetro de 50 nm y hasta 10 µm de longitud, siendo esta última la forma predominante en cultivos celulares (Collins, Fearn, & Graham, 2013; Utle et al., 2008). El virión está compuesto de una nucleocápside cubierta por una capa proteica denominada matriz formada por la proteína M y recubierta a su vez por una envoltura lipídica proveniente de la membrana plasmática de la célula hospedera.

La nucleocápside es un complejo de ribonucleoproteína formado por el genoma viral codificado en una cadena sencilla de RNA de polaridad negativa, asociado a la nucleoproteína (N), a la fosfoproteína (P), a la proteína M2-1 y finalmente a la RNA polimerasa dependiente de RNA (L) (Figura 1). La envoltura del virión tiene insertadas 3 proteínas virales altamente glucosiladas, que son la glicoproteína G, la proteína de fusión F y la proteína pequeña hidrofóbica SH. Estas glicoproteínas se proyectan como espículas en la superficie del virus, que son pequeñas proyecciones de 11-16 nm de longitud (Figura 1) (Collins et al., 2013).

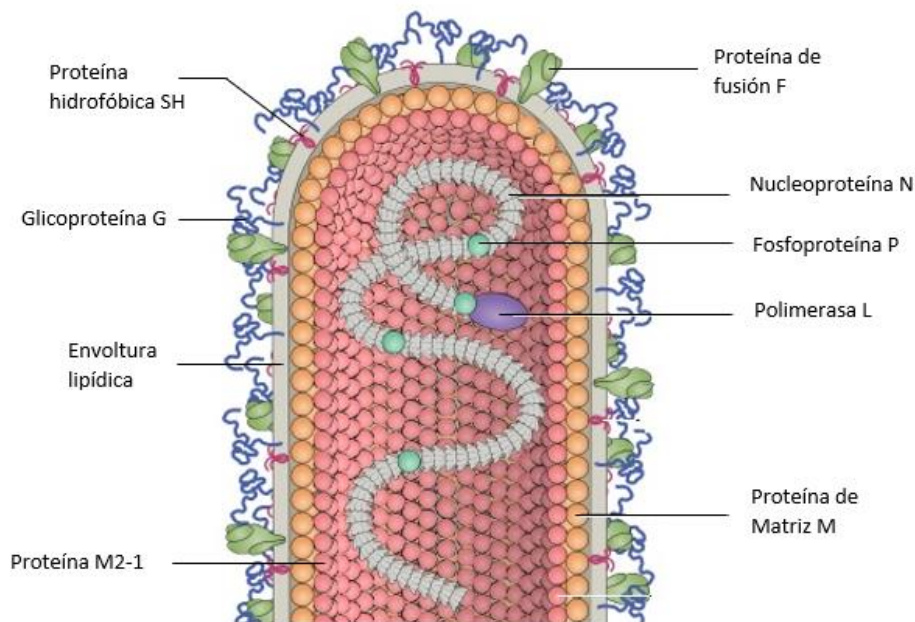


Figura 1. Esquema de la estructura filamentosa del virus sincicial respiratorio. Tomado y modificado de (Battles, et al., 2019).

2.1.3 Genoma

El genoma del RSV consiste de 10 genes codificados en una cadena de RNA polaridad negativa no segmentada de 15,222 nucleótidos de longitud y carece de la 7-metilguanosa (CAP) en su extremo 5' y de secuencias poliadeniladas (poliA) en su extremo 3', lo que lo hace muy susceptible a la degradación por nucleasas celulares (Collins et al., 2013). El orden de los genes virales en el sentido 3' -> 5' es NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L (Figura 2). Durante el proceso de transcripción, el genoma original sirve como templado para la síntesis de los RNA mensajeros (mRNA) y cada uno de ellos es traducido en una proteína, excepto en el caso del mRNA del gen M2, que contiene dos marcos de lectura superpuestos, lo que resulta en la traducción de las proteínas, M2-1 y M2-2 (Collins et al., 2013). El extremo 3' del genoma contiene una región extragénica de 44 nucleótidos que precede al gen NS1, mientras que el extremo 5' contiene una región extragénica de 155 nucleótidos cuya secuencia sigue a la del gen L. Cada gen comienza con una secuencia conservada de 9 nucleótidos llamada señal de inicio (gs), y termina con una secuencia moderadamente conservada de 14 nucleótidos llamada señal de término (ge) (Figura 2). Los primeros nueve genes se encuentran separados por regiones intergénicas de 1-58 nucleótidos

Tabla 1. Proteínas virales estructurales y no estructurales.

| Proteína | Función | Referencia |
|-------------|--|--|
| NS1 y NS2 * | Inhiben la inducción de la producción de interferón alfa y beta (IFN α/β), mediante la supresión de la traslocación a núcleo del regulador de IFN, IRF-3, y la apoptosis en células infectadas | (Spann, Tran, & Collins, 2005) |
| M2-2 * | Se encarga del cambio función de la polimerasa viral de transcriptasa a replicasa. | (Collins et al., 2013) |
| G ~ | Ayuda al anclaje del virus a la membrana de la célula hospedera mediante la unión del motivo CX3C de su ectodominio con el receptor CX3CR1 que ha sido identificado como el receptor para el VSR. La forma soluble G interfiere con la actividad neutralizante de los anticuerpos específicos para G. | (Battles & McLellan, 2019; Johnson et al., 2015) |
| F ~ | Media la entrada del virus a la célula hospedera, al promover la fusión entre la envoltura viral y la membrana plasmática celular, induciendo la fusión con células vecinas y formando sincicios. | (Tayyari et al., 2011) |
| SH ~ | Retarda la apoptosis en células infectadas, modifica la permeabilidad de la membrana. Inhibe la señalización de la citocina TNF- α al inhibir la traslocación de NF- κ B al núcleo en células infectadas | (Fuentes, et al., 2007; Sakamoto et al., 2018) |
| M ~ | Es encargada de la formación de nuevas partículas virales ya que se encuentra asociada a la membrana plasmática de las células infectadas mediante balsas lipídicas, sirviendo de esqueleto para el ensamblaje de nuevos viriones. | (Reena Ghildyal, Ho, & Jans, 2006; Marty, Meanger, Mills, Shields, & Ghildyal, 2004) |
| N ~ | Se asocia en forma monomérica al RNA viral formando cápsides helicoidales que protegen al genoma de la degradación por nucleasas. Interfiere en el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa, al debilitar las funciones de células presentadoras de antígeno. | (Canedo-Marroquín et al., 2017; Collins et al., 2013) |
| P ~ | Actúa como proteína chaperona al formar un complejo soluble con los monómeros libres de N (N0-P), previniendo | (Castagné et al., 2004; |

| | | |
|--------|--|--------------------------|
| | que se agreguen entre sí y, evitando su unión a RNA no viral; además es cofactor de la polimerasa L. | Esneau et al., 2019) |
| L ~ | Es una RNA polimerasa dependiente de RNA que se encarga de la replicación y traducción del RNA viral. | (Carromeu, et al., 2007) |
| M2-1 ~ | Es un factor de procesividad y un factor anti-terminación, permitiendo la síntesis de mRNAs monocistrónicos completos. | (Cartee & Wertz, 2002) |

*Proteínas no estructurales ~ Proteínas estructurales

2.1.5 Ciclo de replicación

El VSR tiene tropismo por células epiteliales y macrófagos del tracto respiratorio humano. La unión del virión a la célula blanco durante una infección, puede ocurrir a nivel de las microvellosidades y cilios de la zona apical (Lay et al., 2013). El mecanismo de entrada a la célula hospedera ocurre mediante dos pasos: 1) adhesión por medio de interacciones de los dominios tipo mucina de la proteína G, con los glucosaminoglucanos (GAGs) presentes en la membrana de las células hospederas, y 2) fusión de la envoltura viral con la membrana celular mediante la proteína F. La unión de la proteína G a la célula, permite que la proteína F se una a la nucleolina expresada en la membrana celular y esta a su vez se ancle en los microdominios ricos en colesterol de la membrana plasmática celular (Cha et al., 2011); esta interacción induce una cascada de señalización para la proteína cinasa de serina y treonina, PAK-1 (Cha et al., 2011), que se encarga de activar el citoesqueleto y la reorganización de los filamentos de actina, que favorece el inicio de la fusión entre ambas membranas para la liberación de la nucleocápside en el citoplasma celular (Figura 3).

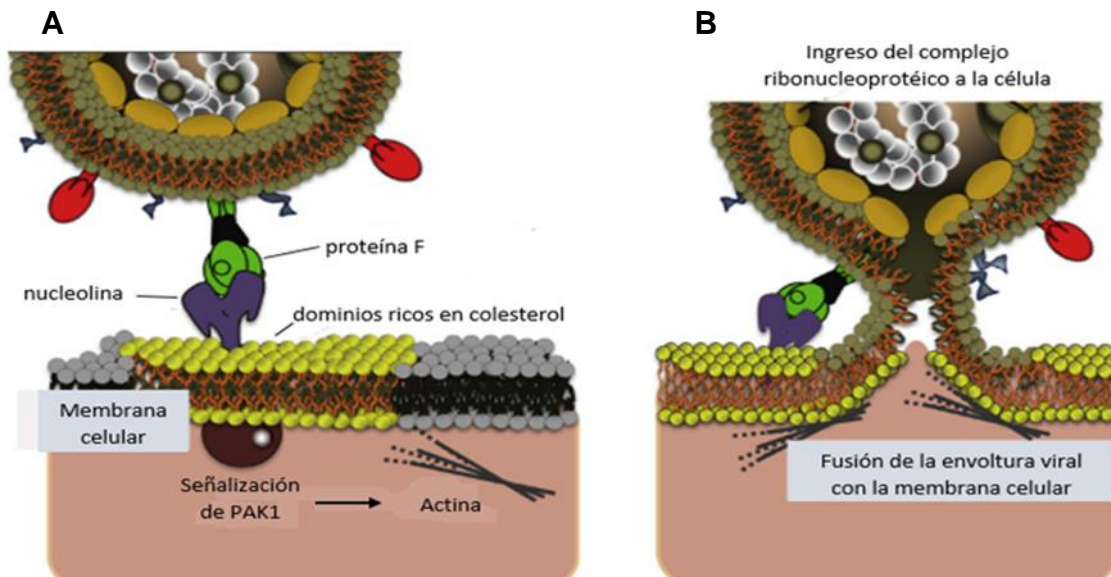


Figura 3. Entrada del virus a la célula hospedera. A) La proteína F se une a su receptor primario, nucleolina, expresada en la membrana de la célula hospedera. B) La unión de la proteína F y nucleolina desencadena una cascada de señalización para la reorganización del citoesqueleto para dar lugar a la fusión de la envoltura viral con la membrana celular. Tomado y modificado de Lay, et al., 2013.

Una vez que la nucleocápside se localiza en el citoplasma de la célula hospedera, se disocia parcialmente y se reclutan proteínas celulares formando cuerpos de inclusión (García, García-Barreno, Martínez, & Melero, 1993). De esta manera, los cuerpos de inclusión son sitios en donde ocurre la replicación viral, y además contiene a las proteínas pertenecientes al complejo ribonucleoprotéico viral (RNP) (García et al., 1993; Rincheval et al., 2017), almacenan mRNAs virales recién sintetizados (Rincheval et al., 2017), de tal manera que el RSV no depende del compartimiento nuclear para llevar a cabo la replicación y transcripción de su genoma.

El proceso de transcripción inicia con el reconocimiento de la región promotora Le (leader) en el extremo 3' por la polimerasa viral, la cual se desplaza a lo largo del genoma, al mismo tiempo que los monómeros de la proteína N son desplazados y reemplazados, una vez que la polimerasa ha pasado (Noton & Fearn, 2015); de esta manera, el genoma viral nunca está expuesto directamente al ambiente intracelular. La polimerasa responde a las señales gs y ge de cada gen mientras se desplaza en dirección 3'-5', lo que resulta en la síntesis de un mRNA con CAP y poli-A independiente, de tipo monocistrónico,

para cada uno de los 10 genes codificados en el genoma. Finalmente, los mRNA maduros son dirigidos hacia la maquinaria de traducción de proteínas perteneciente al hospedero.

La replicación del genoma viral requiere de un intermediario de RNA con polaridad positiva 5'-3' llamado antígenoma, el cual es sintetizado por la polimerasa viral, a partir del RNA genómico 3'-5'. La polimerasa inicia la síntesis del antígenoma en la misma región Le, pero en este caso, genera una cadena completa de RNA de polaridad positiva, ignorando las señales gs y ge (Collins et al., 2013). El antígenoma funciona como templado para la síntesis de nuevas copias de RNA con polaridad negativa, que serán ensambladas como complejos nuevos de ribonucleoproteína o nucleocápsides que serán recubiertas posteriormente por debajo de la membrana plasmática con la proteína M y finalmente serán liberadas por gemación para obtener la envoltura lipídica con las proteínas transmembranales.

La síntesis de las proteínas virales se lleva a cabo en los ribosomas de la célula hospedera y de manera particular, las proteínas transmembranales F, G y SH son dirigidas hacia regiones ricas en colesterol (balsas lipídicas) de la membrana plasmática celular en donde se forma una plataforma para el ensamblaje de nuevos viriones. Se ha descrito que la proteína M2-1 se une al complejo de RNP sirviendo como chaperona para la dirección de la nucleocápside hacia la membrana plasmática para formar parte de los nuevos viriones (Lay et al., 2013). Asimismo, la proteína celular HSP90 es importante para la maduración de los viriones al ser un puente de unión de las proteínas virales con la actina para favorecer su transporte y ensamble a nivel de la membrana plasmática (Brown et al., 2010; Latorre, Mattenberger, & Geller, 2018). Finalmente, los virus son liberados por un proceso de gemación a nivel de las balsas lipídicas, de tal manera que son recubiertos por una porción de la membrana celular en donde ya se encontraban ancladas las proteínas transmembranales, dando lugar a virus maduros con capacidad para infectar a nuevas células.

2.2 Localización intracelular de las proteínas virales

La mayoría de los virus con genoma de RNA llevan a cabo los procesos de replicación y transcripción en el citoplasma celular (Audsley, Jans, & Moseley,

2016), sin embargo, con frecuencia se observan proteínas virales que experimentan un tráfico núcleo-citoplasma activo. Las proteínas no estructurales que tienen efecto en la modulación de la transcripción de mensajeros celulares y en la respuesta inmune antiviral, son las que generalmente tienen la capacidad para ingresar al compartimiento nuclear, aunque podrían tener otras funciones particulares, de acuerdo a la especie viral. En células eucariotas, la doble membrana nuclear restringe el paso de grandes moléculas en ambos sentidos, es decir, de citoplasma a núcleo y viceversa por lo que el transporte ocurre a través de los poros nucleares formados por porinas que permiten la difusión pasiva de proteínas menores a 40-50 kDa (Lim, Aebi, & Fahrenkrog, 2008). Por el contrario, el transporte de proteínas de alto peso molecular requiere de un transporte activo mediado por proteínas nucleares llamadas importinas y exportinas que controlan el tráfico núcleo-citoplasma, tal es el caso de las proteínas virales (Lim et al., 2008), que requieren de este mecanismo para ser importadas al núcleo de la célula hospedera.

Durante la infección del RSV se ha descrito la ubicación intranuclear en de las proteínas M, NS1 y NS2; sin embargo, aún no queda clara su función en este compartimiento ni las posibles consecuencias de la inhibición de su transporte, lo cual podría ser importante para la identificación de posibles blancos terapéuticos.

Lo descrito hasta ahora en cuanto a la ubicación intracelular de las proteínas del RSV es lo siguiente:

Proteína M: Es la proteína con más estudios sobre su localización intracelular. Posterior a la entrada del virus a la célula hospedera, la proteína M es transportada hacia el núcleo. Esto ocurre mediante el receptor de importinas IMP- β (Reena Ghildyal et al., 2005) que se une a la proteína M y mediante un transporte activo es translocada hacia el núcleo a través de los nucleoporos. Una vez dentro del núcleo, la proteína M se disocia del IMP- β y es retenida en este compartimiento mediante su interacción con el DNA del hospedero probablemente inhibiendo su transcripción (R Ghildyal, Baulch-Brown, Mills, & Meanger, 2003).

Cuando M es fosforilada se disocia del DNA y se une al receptor o exportina CRM1 (Ghildyal et al., 2006) para su exportación del núcleo. Una vez en el citoplasma, M se disocia del CRM1 y dada su forma fosforilada, es capaz de unirse a los nuevos RNA virales provenientes de la transcripción, además de unirse a N en la nucleocápside para dirigirla hacia la membrana plasmática para la formación de viriones (Figura 4).

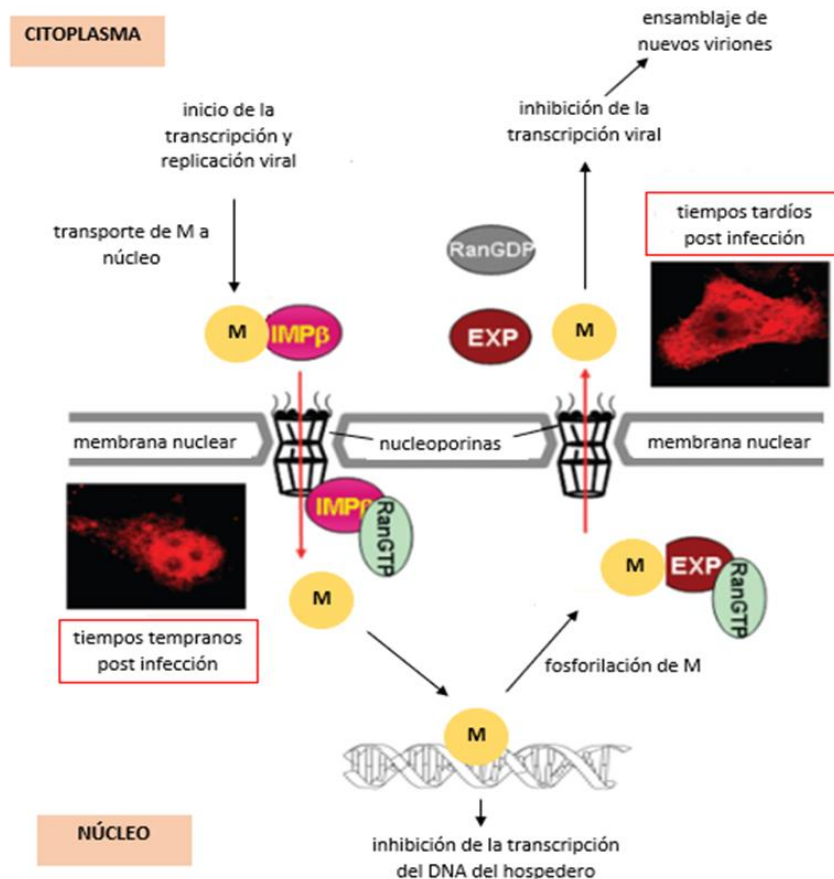


Figura 4. Modelo del transporte núcleo-citoplásmico de la proteína M en células infectadas. Tomada y modificada de (Ghildyal et al., 2006).

La localización nuclear de M es transitoria por lo que se piensa que su función es la inhibición de los procesos nucleares del hospedero durante un periodo corto en infecciones tempranas, lo que ayuda a que el virus utilice estos mecanismos para su propia transcripción y expresión de sus proteínas.

Proteína N: Esta proteína ha sido reportada en la literatura como componente principal de los cuerpos de inclusión en el citoplasma de células infectadas, sin

embargo, se ha observado que, a pesar de tener un papel importante en este compartimento, puede tener funciones extras que involucran un cambio en su localización intracelular.

La proteína N ha sido detectada junto al RNA viral dentro de gránulos de diferentes tamaños cerca de la membrana plasmática posterior a 6 horas de infección en células epiteliales (Lifland et al., 2012) los cuales van madurando al incrementar el tiempo post infección. Su abundancia es menos frecuente dentro de cuerpos de inclusión citoplásmicos maduros en los cuales la proteína N se encuentra frecuentemente en la parte externa formando una estructura de anillo visible con tinciones con anticuerpos específicos (Lifland et al., 2012). Además, se ha demostrado que en tiempos tempranos post infección, N se expresa en la superficie de células epiteliales y células dendríticas y se cree que ocurre por un transporte vesicular del aparato de Golgi, ya que al inhibir este proceso, se observa una reducción significativa de la expresión de N en la superficie celular (Cespedes et al., 2014).

El tráfico intracelular y la expresión de N en la superficie de células infectadas es un proceso que requiere una regulación estricta para mantener la cantidad necesaria de monómeros en el citoplasma para continuar con el ciclo de replicación, mientras que otra cantidad es expresada de manera constante en la superficie celular probablemente con funciones de evasión de la respuesta inmune.

Proteína P: Los estudios que se tienen sobre la localización de esta proteína, concuerdan en que es observada únicamente en cuerpos de inclusión citoplásmicos formando parte del complejo RNP. P se localiza en estos cuerpos de inclusión desde etapas tempranas post infección cuando la transcripción y replicación del genoma viral se encuentran activos y es localizada mayoritariamente en la periferia de estos compartimentos formando un patrón de anillos visible por inmunofluorescencia (Carromeu et al., 2007; Rincheval et al., 2017).

Proteína L: La proteína L ha sido localizada únicamente en el citoplasma de las células infectadas dentro de cuerpos de inclusión junto con las proteínas restantes que forman parte del complejo de replicación. Con tinciones

específicas, se observa como un patrón característico de anillos donde esta proteína es retenida para llevar a cabo sus funciones enzimáticas en el ciclo de replicación viral (Carromeu et al., 2007).

Proteínas NS-1 y NS-2: Dado que estas proteínas están involucradas en la desregulación de la respuesta antiviral, se ha propuesto que pueden tener funciones intranucleares (Chatterjee et al., 2017). La presencia de NS-1 en núcleo ha sido confirmada en células epiteliales bronquiales, en donde tiene interacción directa con las proteínas histonas H2BD y H4F (Tan, Peng, Chen, & Qin, 2013), teniendo un papel epigenético ya que induce la ubiquitinación de las proteínas histonas y bloqueo de factores de transcripción para la respuesta antiviral. A pesar de tener un papel importante del núcleo de células infectadas, también tiene una importante distribución en el citoplasma (Chatterjee et al., 2017). Por el contrario, la proteína NS-2 es localizada mayoritariamente en el citoplasma de células infectadas (Tan et al., 2013) ya que se une por lo menos al receptor RIG-1 para el bloqueo de la transcripción de IFN- β (Ling, Tran, & Teng, 2009).

2.3 Relevancia de la infección por el RSV

El RSV es transmitido por vía aérea a través pequeñas gotas producidas al estornudar o toser y por contacto con superficies contaminadas o fómites (Junge, Nokes, Simões, & Weber, 2016), por lo tanto, la vía de entrada más común es la respiratoria y tiene un periodo de incubación de 4 a 6 días. Una vez dentro, su replicación inicia en la nasofaringe, donde puede ocasionar enfermedad leve del tracto respiratorio superior en algunos casos asociada a otitis media (Borchers, Chang, Gershwin, & Gershwin, 2013); sin embargo, en algunos casos puede afectar el tracto respiratorio inferior por la diseminación de fluidos. Las infecciones agudas del tracto respiratorio inferior (IATRI) causadas por el RSV pueden tener complicaciones dentro de las cuales se encuentran: bronquitis, bronquiolitis y sibilancias (Junge et al., 2016). La bronquiolitis es la complicación más común en una infección por el RSV, que es una enfermedad respiratoria aguda que afecta a la vía aérea pequeña particularmente a los bronquiolos; caracterizada por inflamación aguda, edema y necrosis de las células epiteliales

de las vías aéreas pequeñas que aumenta la producción de moco y origina broncoespasmo (Diagnóstico y Manejo en Niños con Bronquiolitis en Fase Aguda, 2008) y generalmente es el cuadro clínico que ayuda a un diagnóstico de infección por RSV.

La relación entre la infección severa durante los primeros meses de vida por el RSV y el desarrollo de sibilancias y síntomas de asma crónica se ha observado hasta en un 40% de los casos (Junge et al., 2016). Asimismo, las reinfecciones con el RSV ocurren en el 30-75% de niños menores de dos años y durante sus primeros meses de vida.

2.4 Epidemiología de la infección por el VSR

El RSV es considerado un virus estacional y aunque se encuentra distribuido en todo el mundo, los brotes que ocasiona van de acuerdo con el clima de la región en la que se encuentre. En regiones con clima templado hay altas tasas de infección durante el invierno (Bloom-Feshbach et al., 2013), se ha reportado que los brotes comienzan a finales del otoño, con un pico máximo a mediados de Diciembre y terminan a principios de la primavera (Borchers et al., 2013). En las regiones con climas tropicales, el patrón es menos predecible y las tasas de infección son constantes durante todo el año (Borchers et al., 2013).

Las infecciones respiratorias agudas son un problema de salud a nivel mundial. De acuerdo con la OMS (Repositorio de datos del Observatorio Mundial de la Salud, 2017), en el 2017 se reportaron en todo el mundo 155,249 muertes de neonatos (de 0-27 días), y 808,694 muertes en niños de 0-4 años, todos estos casos fueron debidos a infecciones agudas del tracto respiratorio inferior (IATRI). Las IATRI son ocasionadas generalmente por virus tales como RSV, rinovirus, coronavirus, adenovirus, influenza y metapneumovirus. En el 2005, se registraron 33.8 millones de episodios de IATRI asociado a RSV en niños menores de 5 años, representando un 22% de los episodios de IATRI en el mundo (Nair et al., 2010) con al menos 3.4 millones de episodios graves que requirieron ingreso hospitalario. De esta cifra, 66 000 a 199 000 niños menores de 5 años murieron de IATRI asociadas a RSV (Nair et al., 2010). Cifras más

actuales provenientes de estudios aislados en diferentes regiones del mundo, han puesto al VSR como el primer agente causal de IATRI.

En México, de acuerdo con la Secretaría de Salud (Anuario de Morbilidad, 2017), en el 2017 las infecciones respiratorias agudas fueron la primera causa de morbilidad en el país, con 1,837,617 casos en niños menores de un año, y 4,764,653 casos en niños de 1-4 años. Hasta el 70% de estas infecciones en México son causadas por virus.

Actualmente, se tienen muy pocos estudios epidemiológicos acerca de la infección causada por el VSR en México. El estudio más reciente se realizó en pacientes de 11 hospitales diferentes a lo largo de la República Mexicana y se reportó que el 81.6% de IATRI habían sido ocasionadas por virus, de las cuales, el 23.6% fueron asociadas al RSV, seguido de rinovirus, metapneumovirus, adenovirus e influenza, en niños menores de 5 años (Wong-Chew et al., 2017).

2.5 Infección persistente causada por el RSV

Como se mencionó, existe una asociación entre la infección severa por el RSV en infantes menores de un año y el desarrollo de padecimientos crónicos respiratorios, que podría ser causada por la persistencia del virus en el tracto respiratorio.

Aunque la persistencia del RSV no ha sido demostrada, existe evidencia circunstancial que apoya esta hipótesis: 1) en estudios post mortem, se ha detectado el genoma del RSV en tejidos pulmonares de niños que no mostraban síntomas de padecimientos respiratorios (Cubie, Duncan, Marshall, & Smith, 1997), 2) se ha realizado el aislamiento continuo del virus (durante más de 5 meses), a partir lavados de nasofaringe provenientes de niños aparentemente sanos (Isaia et al., 1985). Asimismo, aunque el desarrollo de asma en la niñez e incluso en la adultez no requiere un antecedente de infección viral, se ha demostrado que mediante la prevención de la infección por RSV con anticuerpos monoclonales como el palivizumab durante la etapa gestacional de 33 a 35 semanas, se reduce en más del 10% el desarrollo de asma durante los primeros 6 años de vida (Simões & Liu, 2018) en comparación con aquellos neonatos que recibieron solamente placebo.

Existen diferentes estudios que han sugerido a la infección por el RSV como un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), que se caracteriza por la obstrucción de las vías respiratorias como consecuencia de un proceso inflamatorio crónico mediado por la producción de citocinas y quimiocinas (Barnes, 2008). Se ha sugerido que la persistencia del RSV en el tejido respiratorio, puede ser una de las causas por las que el sistema inmune se encuentra produciendo de manera crónica citocinas proinflamatorias, favoreciendo episodios de EPOC (Homaira & Briggs, 2018; Sigurs et al., 2010). Por otro lado, los episodios recurrentes de EPOC exacerbada contribuyen sustancialmente a la morbilidad y mortalidad de esta condición y puede deberse a infecciones virales. En estudios realizados en voluntarios con EPOC diagnosticada y controlada de manera adecuada, se ha encontrado al RSV en el 28% de los casos mediante detección de genoma viral mediante RT-PCR (Falsey et al., 2019). En tanto, durante los episodios de exacerbación, el RSV ha sido detectado en el 63% de las muestras de esputo y secreciones nasales de pacientes que recurren a hospitalización por crisis de esta enfermedad (Kokturk et al., 2015), lo que indica que el RSV contribuye no solo al desarrollo de este padecimiento si no que su reactivación está involucrada en episodios de crisis por exacerbación de la enfermedad.

Otra evidencia de la persistencia del RSV *in vivo*, es la detección de genomas defectuosos en muestras de secreciones de pacientes pediátricos hospitalizados, los cuales fueron generados naturalmente durante el curso de la infección (Sun et al., 2015).

2.6 Persistencia viral

Las infecciones virales pueden desarrollarse de forma aguda o persistente. Una infección aguda se caracteriza por una replicación viral activa que está asociada directamente a la aparición de síntomas y a la subsecuente activación de la respuesta inmune que conlleva a la eliminación completa del virus del organismo. Por el contrario, una infección persistente ocurre cuando el virus no puede ser eliminado del organismo a pesar de que existan mecanismos de defensa mediados por la respuesta inmune del hospedero, permaneciendo en células o

tejidos específicos por tiempo indefinido (Boldogh, Albrecht, & Porter, 1996). Con frecuencia, las infecciones persistentes inician como una infección aguda, y posteriormente el virus llega a un estado de equilibrio, limitando su tasa de replicación para evitar la muerte de su hospedero y evadiendo los mecanismos de respuesta antiviral.

La persistencia puede existir como una infección silenciosa o no productiva, en donde hay un estado de latencia con potencial de reactivación, o bien, como una infección productiva con replicación viral continua (Kane & Golovkina, 2010); estos dos tipos de persistencia se clasifican como latente y crónica, respectivamente.

Durante la latencia, existe un estado quiescente del ciclo de replicación viral en el que la expresión de la mayoría o todas las proteínas virales se encuentra inhibida, pero puede reactivarse durante procesos de inmunosupresión, cambios hormonales, efectos farmacológicos, edad, etc. (Virgin, Wherry, & Ahmed, 2009). Esto se traduce en la falta de producción de partículas virales infecciosas, aun cuando el genoma se encuentre presente. No existe un mecanismo por el cual el sistema inmune pueda reconocer a las células infectadas en un estado latente, por lo que no pueden ser eliminadas, a menos que se induzca la expresión transitoria de proteínas. Los virus latentes generalmente tienden a permanecer en células con tiempos de vida media prolongados, como las neuronas, células hematopoyéticas y células basales epiteliales, mismas que son susceptibles a la infección por alfa-herpesvirus, CMV y HPV, respectivamente (Virgin et al., 2009). Por otro lado, durante las infecciones persistentes de tipo crónicas la replicación viral es continua, con constante producción de partículas virales infecciosas o también de tipo defectuosas, independientemente de que exista una respuesta inmune antiviral (Virgin et al., 2009). Las células infectadas de manera crónica expresan todo el tiempo proteínas virales para el ensamblaje de nuevos viriones, lo que resulta en una continua estimulación de la respuesta inmune con procesos inflamatorios. El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), el de la hepatitis B (HBV) y el de la hepatitis C (HCV) son ejemplos clásicos de este tipo de persistencia.

2.7 Mecanismos de persistencia viral

Los virus establecen infecciones persistentes como consecuencia de su capacidad para regular funciones biológicas de su hospedero y las suyas propias, a fin de coexistir a lo largo del tiempo (Randall & Griffin, 2017). La persistencia viral ha sido estudiada bajo muchas situaciones, sin embargo, algunos de los mecanismos mediante los cuales se establece son los siguientes:

a) Evasión de la respuesta inmune

Los virus deben impedir su eliminación completa por parte de la respuesta inmune del hospedero, mientras que el sistema inmune debe habituarse a la continua presencia de proteínas y ácidos nucleicos virales. Esto ocurre a través de la regulación negativa de mediadores inflamatorios al mismo tiempo que el virus reduce su tasa de replicación a niveles en los cuales no puede provocar daño severo celular y tisular.

Dado que cuando existe una infección viral temprana predomina un ambiente de citocinas de tipo proinflamatorio, los virus que establecen persistencia pueden inducir un cambio en la producción de citocinas, polarizando la respuesta hacia un perfil antiinflamatorio, mediante la interleucina-10 (IL-10) y la IL-4 (Oldstone, 2009). Por otro lado, los virus persistentes tienen la capacidad para evitar la presentación de antígenos, a fin de prevenir la activación de linfocitos T citotóxicos. Esto lo logran mediante el desarrollo de mecanismos que inhiben la presentación antigénica mediante las moléculas del MHC, como moléculas que se unen al complejo TAP que transportan antígenos desde el complejo de Golgi hasta la superficie celular, previniendo la carga de los péptidos antigénicos en el MHC I. Asimismo, existen proteínas virales que pueden dirigir a las moléculas de MHC I y II hacia el proteasoma para su degradación (Kane & Golovkina, 2010).

Además de la evasión de la respuesta inmune adaptativa, los virus deben superar a la respuesta inmune innata para persistir y uno de los blancos principales es el interferón tipo I (IFN). En etapas tempranas de las infecciones agudas, los virus patógenos activan mecanismos que abaten la producción de interferón tipo I (IFN-I) en la célula hospedera, (López & Hermesh, 2011) mediante proteínas especializadas que se encargan de antagonizar las vías de señalización correspondientes (Randall & Griffin, 2017) dentro de las cuales se

encuentran el bloqueo de la translocación a núcleo de factores de transcripción para la síntesis de interferón y genes antivirales. Por otro lado, también se ha observado que cuando se establece una infección persistente, existe una alteración en la producción de especies reactivas de oxígeno, como se ha descrito durante la infección por los virus HBV y EBV (Long, Li, Yang, Huang, & Gong, 2016; Yu et al., 2016) que al inhibir la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B inhiben también la producción de estos radicales, favoreciendo la persistencia del virus al no poder ser eliminado mediante el estrés oxidativo.

Por otro lado, un virus persistente debe desarrollar mecanismos para suprimir la apoptosis celular, a fin de evitar la destrucción de su célula hospedera. (Kane & Golovkina, 2010). Cada especie de virus lleva a cabo la inhibición de la apoptosis mediante diferentes mecanismos, sin embargo, la mayoría de ellos expresan moléculas que interfieren con las proteínas de la cascada de señalización apoptótica. Por ejemplo, las proteínas vMIA y vICA del CMV inhiben la apoptosis celular al mimetizar a la proteína antiapoptótica BCL-2 del hospedero que evita la activación de la caspasa 8 (Kane & Golovkina, 2010).

b) Selección de compartimentos celulares favorables para la persistencia

Los virus que establecen infecciones persistentes utilizan células específicas como un compartimento en el que su genoma es resguardado (Virgin et al., 2009), aprovechando características como tiempo de vida largo y ubicación en tejidos inmunoprivilegiados. Por ejemplo, el HSV infecta tejido epitelial durante la fase aguda, pero también logra infectar a las células nerviosas que inervan ese tejido; siendo el sistema nervioso un sitio inmunoprivilegiado, el sistema inmune únicamente logra eliminar al virus de las células epiteliales, permitiendo una infección persistente de tipo latente en las neuronas afectadas (Kane & Golovkina, 2010).

El epitelio mucoso también se considera como un sitio de difícil inducción de la inmunidad adaptativa con capacidad protectora a largo plazo, razón por la que es común padecer múltiples reinfecciones con el mismo agente infeccioso en el tracto respiratorio, (Randall & Griffin, 2017), como ocurre con el virus sincicial respiratorio.

c) Modulación de la expresión de genes virales

Generalmente, cuando se establece una infección persistente los virus regulan negativamente la expresión de sus genes, para asegurar la supervivencia de la célula hospedera y evitar su reconocimiento por parte del sistema inmune. En el caso de los virus que tienen una fase de replicación en el núcleo celular como el HSV o los virus que integran su genoma en el genoma del hospedero como el HIV la regulación de la expresión génica pueden ocurrir mediante acetilación y metilación de las histonas asociadas al genoma viral (Kane & Golovkina, 2010).

Asimismo, los virus pueden impedir la traducción de genes ya transcritos mediante RNAs pequeños no codificantes como los miRNAs que pueden ser de naturaleza propia o del hospedero (Kane & Golovkina, 2010). En el caso de los virus de RNA cuyo genoma permanece en el citoplasma, la regulación de la expresión génica también puede ser mediada por miRNAs, así como por la producción de genomas virales defectuosos.

d) Producción de genomas virales defectuosos

Los genomas virales defectuosos (GVDs) son formas truncadas del genoma viral generadas como subproductos de la replicación cuando el virus se encuentra en títulos muy altos y cuando se realizan infecciones *in vitro* a multiplicidades de infección de altas. Los GVDs carecen de genes esenciales por lo que no pueden propagarse ni reproducirse en ausencia de virus ayudadores o virus completos (Lopez, 2014), ya que estos le proporcionan los elementos necesarios para el proceso de replicación, como la polimerasa viral. Los GVDs pueden ser de dos tipos principalmente (Lopez, 2014): 1) los deletados, que son formas truncadas del genoma original que comparten los extremos 3' y 5' con respecto al virus silvestre y son generados cuando la polimerasa viral se desprende del templado y vuelve a unirse a él más adelante río abajo, resultando en una secuencia no copiada, que es deletada del genoma recién replicado; y 2) los GVDs con secuencias repetidas en el extremo 5', que consisten en un segmento del genoma viral flanqueado por su secuencia complementaria del extremo 5'. Su síntesis ocurre cuando la polimerasa viral se desensambla del templado y se une a la cadena recién sintetizada, copiando nuevamente el extremo 5' del genoma original.

Las partículas virales defectuosas han sido encontradas como parte de suspensiones virales y presentan una tasa de sedimentación menor que aquellas caracterizadas como partículas virales completas. Se ha descrito que los GVDs pueden tener un efecto de inmunomodulación, interferir con la replicación de los genomas de virus completos y participar en el establecimiento de la persistencia.

Con respecto a la estimulación al sistema inmune, los GVDs estimulan a la respuesta antiviral mediada por la expresión de IFN tipo I y citocinas proinflamatorias (Lopez, 2014). La síntesis de IFN-I se induce en células infectadas por el reconocimiento del RNA viral mediante receptores citoplásmicos tipo RIG, como RIG-1 y MDA5, promoviendo la fosforilación de los mismos y la posterior señalización a través de la proteína adaptadora de señalización antiviral mitocondrial (MAVS), promoviendo la activación de los factores de transcripción NF- κ B e IRF3, los cuales al translocarse al núcleo inducen la expresión de genes antivirales entre los cuales se encuentra el IFN- β (López & Hermesh, 2011; Randall & Goodbourn, 2008). Los GVDs también promueven la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 α , TNF e IL-6 (Manzoni & López, 2018). Aunque los genomas completos son capaces de inducir una respuesta antiviral, se ha visto que los GVDs tienen una mayor capacidad para la estimulación de la respuesta inmune (Manzoni & López, 2018).

Por otro lado, los GVDs pueden ser ensamblados para dar lugar a partículas virales defectuosas que son capaces de interferir con la replicación de virus completos (Pathak & Nagy, 2009). Se ha descrito que las regiones promotoras presentes en los GVDs unen con mayor afinidad a la polimerasa viral que las regiones promotoras presentes en los genomas completos (Manzoni & López, 2018). Además, los GVDs tienen menor longitud, por lo que son sintetizados y acumulados con mayor rapidez. La combinación de una transcripción acelerada y una mayor afinidad de la polimerasa viral por los genomas defectuosos hace que superen en cantidad a los genomas completos, interfiriendo continuamente en el proceso de replicación de los mismos.

Finalmente, se ha descrito que las partículas virales defectuosas conteniendo GVDs, tienen un papel determinante en el establecimiento de infecciones persistentes, con base en un modelo con ciclos alternados para la producción de

virus completos y de virus defectuosos. En este modelo se propone, que las partículas virales defectuosas son liberadas lentamente durante la replicación viral hasta alcanzar números elevados convirtiéndose en la especie predominante, por encima de los virus completos, interfiriendo con la replicación de éstos últimos. Cuando los factores virales necesarios para la replicación se agotan por no estar codificados en los genomas virales defectuosos, los virus completos remanentes pueden reiniciar su ciclo en el que se producen nuevamente los elementos necesarios para que los genomas defectuosos se incrementen de manera gradual, en una segunda fase de acumulación (Lopez, 2014; Manzoni & López, 2018). Existe evidencia de que las células con genomas de virus defectuosos logran mantener su viabilidad por tiempo prolongado, a diferencia de las células con genomas completos.

La supervivencia de las células con alto contenido de GVDs, es dependiente de la señalización de MAVS, con la subsecuente producción de IFN-I y citocinas proinflamatorias como el TNF α . El TNF α producido actúa de manera autocrina y paracrina y su función depende de la vía de señalización que active a través de su unión a receptores celulares como TNFR1 y TNFR2 (Varfolomeev & Vucic, 2016). Particularmente, las células con genomas completos mueren ante el estímulo por el TNF α mediado por la activación del receptor TNFR1, que conlleva a la activación de los dominios de muerte y en consecuencia a la apoptosis celular (Varfolomeev & Vucic, 2016; Xu et al., 2017). Por el contrario, las células con GVDs, son capaces de regular la expresión y la actividad de un programa de supervivencia mediada por la activación del TNFR2 que carece de dominios de muerte, brindan a la célula un estado de protección (Varfolomeev & Vucic, 2016; Xu et al., 2017).

2.8 Modelos *in vivo* e *in vitro* para el estudio de la persistencia del RSV

Si bien la persistencia del RSV en el humano se fundamenta en hallazgos circunstanciales, existen modelos animales y cultivos de células *in vitro* en los que se ha demostrado que el RSV tiene capacidad para establecer infecciones persistentes y han sido una herramienta invaluable para el estudio de este tipo de infección. En los modelos murinos, el RSV induce enfermedad de vías

respiratorias a largo plazo caracterizada por inflamación crónica e hiperreactividad aérea, con detección del genoma viral hasta 77 días después de la inoculación (Mejías et al., 2008). Sin embargo, la especificidad del RSV por su hospedero que es el humano, hace difícil trasladar los resultados de investigaciones en estos modelos hacia el contexto en una infección humana. Recientemente se ha establecido un modelo de estudio en corderos recién nacidos, ya que la infección por el RSV en este hospedero cursa con un proceso patológico similar al observado en humanos, de tal manera que se desarrolla bronquiolitis con degeneración y desprendimiento de células epiteliales e infiltrados intraluminales de neutrófilos (Van Drunen Littel-Van Den Hurk & Watkiss, 2012).

Entre los modelos *in vitro* para el estudio de la persistencia del RSV se ha reportado un cultivo de infección crónica en la línea de células epiteliales humanas HEp-2 y en la línea epitelial de pulmón H358 que se encuentran enriquecidas con partículas virales defectuosas; los cultivos fueron mantenidos por más de 3 años sin efecto citopático aparente (Romero Valdovinos & Gómez, 2003). Otro modelo en células HEp-2, fue desarrollado al recuperar un porcentaje de ellas que sobrevivieron a la infección aguda y al proceso lítico; las células en este cultivo fueron heterogéneas con respecto a la expresión de antígenos virales, desde niveles altos hasta niveles indetectables y su tiempo de duplicación fue menor al de las células no infectadas, además de no producir virus infecciosos (Domínguez et al., 2009). Además de células de origen epitelial, se han empleado líneas celulares de macrófagos (Sarmiento, Tirado, & Gómez, 2002).

2.9 Tipos de persistencia *in vitro*

La persistencia viral establecida en cultivos celulares se puede clasificar de acuerdo con el comportamiento que el cultivo tenga en cuanto a la expresión de proteínas virales, producción de partículas virales y distribución del genoma viral en la población celular en: a) persistencia de tipo acarreadora y b) persistencia real que se divide en latente y en estado estacionario.

a) Persistencia acarreadora

También llamada infección crónica focal, ocurre cuando hasta un 10% de la población celular se encuentra infectada (Guo et al., 2018). Este porcentaje de células infectadas libera virus infecciosos al medio constantemente y por efecto de la infección llegan a morir. Los virus que son liberados en el medio son neutralizados gracias a las sustancias antivirales como IFN tipo I o anticuerpos presentes en el medio también; debido a esto, solamente un pequeño porcentaje de la población celular susceptible es infectada en cualquier momento. De esta manera, se mantiene un equilibrio en las poblaciones celulares infectadas y no infectadas (Boldogh et al., 1996). Este tipo de infección persistente puede ser eliminada al incrementar las concentraciones de sustancias antivirales o de anticuerpos en el medio.

b) Persistencia real

Dentro de la persistencia real se encuentran dos clasificaciones que son: 1) la persistencia real en estado estacionario, también llamada infección crónica difusa, es aquella en la que todas las células del cultivo se encuentran infectadas y la replicación viral y división celular ocurren sin que las células sean eliminadas (Boldogh et al., 1996). Los virus son continuamente liberados al medio y la infección no puede ser detenida o eliminada con sustancias antivirales o anticuerpos adicionados en el medio. Y 2) la persistencia real latente, es aquella en la que el genoma viral es replicado y segregado a las células hijas mediante su unión a cromosomas o de manera extracromosomal (Boldogh et al., 1996). Para este caso, no existe un mecanismo de control de la infección hasta el momento.

III. ANTECEDENTES

3.1 Modelo de persistencia del RSV en macrófagos murinos

En nuestro grupo de investigación, se estableció un modelo *in vitro* para estudiar la persistencia del RSV. Este modelo consiste en la línea celular murina P388D1 que tiene un fenotipo de macrófago, infectada de manera persistente con el RSV de la cepa Long (ATCC, VR-26) (Sarmiento et al., 2002). Este cultivo se estableció infectando a los macrófagos a una M.O.I de 1 y recuperando a las células sobrevivientes, hasta lograr un cultivo estable con esta población. A lo largo de más de 100 pases, este cultivo ha mantenido la expresión de proteínas virales y conservado el genoma, tal como se ha observado por monitoreo constante mediante inmunofluorescencia directa y RT-PCR (Gaona, Santiago-Olivares, Ortega, & Gómez, 2014). De manera interesante, hemos observado que el porcentaje de células infectadas puede oscilar entre 60% y 95% a lo largo de los pases, sin que se vea afectada la viabilidad celular.

A través de este modelo, encontramos que la persistencia del RSV induce cambios importantes en la biología de la célula hospedera, tales como la inhibición de la apoptosis por las vías intrínseca y extrínseca, por efecto de la fosfoproteína viral P (Nakamura, L, Villegas. S, & Gómez, 2015); aumento en la expresión de los receptores Fc-gamma (FcYR) con incremento subyacente en la fagocitosis mediada por este tipo de receptores (Gaona et al., 2014); una expresión constitutiva en cantidades elevadas, de citocinas y quimiocinas asociadas a una respuesta proinflamatoria como IL-6, IP-10 y RANTES; así como la escasa producción de óxido nítrico asociada a la sobre expresión de la enzima arginasa-1. De manera importante, la producción y secreción de IFN- β no está afectada en el cultivo persistente, sin embargo, las células infectadas no tienen la capacidad de responder al estímulo de esta citocina debido a que la vía de señalización Jak/STAT se encuentra alterada, de tal manera que la fosforilación de factores de transcripción como STAT1 no ocurre (Rivera-Toledo, Torres-González, & Gómez, 2015) y por lo tanto no hay expresión de genes antivirales, lo que contribuye al mantenimiento de la persistencia.

Como se mencionó anteriormente, la persistencia depende de adaptaciones no solo a nivel de la célula hospedera, sino del virus para su coexistencia a largo

plazo y en nuestro modelo se ha encontrado que el RSV persistente tiene baja capacidad para inducir efecto citopático, posiblemente por cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión F (Sarmiento et al., 2002). Asimismo, existe una baja producción de virus infecciosos, tal como se ha determinado mediante ensayos biológicos en los que se evalúa la destrucción celular y la formación de sincicios (efecto citopático), como consecuencia de la infección. De esta manera, los títulos virales se encuentran dentro del orden de 10^2 TCID₅₀/mL, en comparación con cultivos infectados de manera aguda en los que los títulos se encuentran entre 10^5 y 10^7 TCID₅₀/mL. Aunque en el cultivo persistente la producción de virus infecciosos es baja, se ha encontrado que las copias del genoma viral alcanzan valores de hasta 10^7 copias /100 ng de RNA total, lo que sugiere que en estos cultivos hay una alta producción de virus defectuosos.

IV. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones virales persistentes son relevantes a nivel de salud pública y cada vez es más larga la lista de virus con genoma de RNA, con capacidad para permanecer por tiempo prolongado en su hospedero. De manera particular, existe evidencia de tipo circunstancial y experimental que indica que el RSV tiene la capacidad para persistir en el humano, favoreciendo el desarrollo de padecimientos respiratorios crónicos, principalmente en pacientes pediátricos.

Hasta ahora, en nuestro modelo *in vitro* de persistencia del RSV, hemos observado alteraciones a nivel de la biología celular por efecto de la infección crónica, relacionadas con el desarrollo de respuestas proinflamatorias; sin embargo, los componentes virales y el nivel en el que éstos actúan para alterar el funcionamiento de su hospedero no han sido evaluados. Asimismo, es de interés determinar si el RSV establece persistencia de tipo real (latente o en estado estacionario) o de tipo acarreadora, ya que el porcentaje de células que expresan proteínas virales es variable y se desconoce la distribución del genoma del virus persistente en el cultivo. Con estos antecedentes, el presente trabajo se enfocó en la evaluación del tipo de persistencia establecida por el VSR en nuestro modelo *in vitro*, en la determinación de la presencia de partículas virales infecciosas y defectuosas, así como en el análisis de la expresión de proteínas virales estructurales y su respectiva localización intracelular (citoplásmica y nuclear), para evaluar en un trabajo posterior su interacción con componentes de cada uno de los compartimentos celulares.

V. HIPÓTESIS

El RSV establece persistencia de tipo real en estado estacionario en un cultivo de macrófagos, en el cual todas las células contienen el genoma viral, con producción de partículas defectuosas y expresión de proteínas virales con distribución citoplásmica y nuclear.

VI. OBJETIVOS

- Objetivo general

Determinar el tipo de persistencia que se establece en cultivos de macrófagos infectados persistentemente con el RSV y evaluar la localización intracelular de las proteínas virales.

- Objetivos particulares

1. Separar a las poblaciones positivas y negativas para la expresión de proteínas virales de un cultivo infectado persistentemente con el RSV, mediante citometría de flujo.
2. Realizar una cinética de los cultivos separados por citometría de flujo para evaluar el porcentaje de células infectadas durante 14 pases.
3. Extraer RNA total de las poblaciones positivas y negativas para la expresión de proteínas virales de un cultivo persistente, para evaluar cuantitativamente la presencia del genoma viral en cada población.
4. Realizar un gradiente de sacarosa a partir de sobrenadantes de cultivos de células infectadas de manera aguda y persistente, para evaluar la presencia de proteínas virales y determinar la densidad del RSV.
5. Obtener el título viral de sobrenadantes provenientes de infecciones aguda y persistente, para determinar la capacidad infecciosa de los virus presentes.
6. Extraer RNA total de sobrenadantes provenientes de infecciones aguda y persistente previamente ultracentrifugados, para cuantificar las copias de genoma viral.
7. Comparar la localización intracelular de las proteínas virales en células infectadas de manera aguda y persistente, a través de fraccionamiento celular y Western blot.

VII. MATERIALES Y MÉTODO

7.1 Cultivos celulares

Este trabajo se realizó con un modelo *in vitro* de macrófagos murinos de la línea celular P388D1, infectados persistentemente por el RSV (Sarmiento et al., 2002). Los cultivos de macrófagos infectados persistentemente (MΦP) se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Gibco), suplementado con suero fetal bovino al 5% (SFB; Biowest), penicilina/estreptomicina al 1% (Invitro), y β-mercaptoetanol 1μM (Bio-rad), a 37°C, con 5% de CO₂. Se realizaron pases de los cultivos cada 48 h conservando el 30% de las células en promedio para dar continuidad al cultivo. La línea celular P388D1 original, no infectada (MΦN), se mantuvo en cultivo bajo las mismas condiciones que los MΦP y se utilizó como control en los experimentos indicados.

Las células de la línea epitelial humana HEp-2, derivada de un carcinoma laríngeo se mantuvo en medio DMEM (Gibco) suplementado con 5% de SFB y 1% de penicilina-estreptomicina, a 37°C, con 5% de CO₂. Los pases se realizaron dos veces por semana despegando las células con una solución de tripsina-verseno 0.05% (Invitro).

7.2 Infección aguda de macrófagos y de células HEp-2 con el RSV

Se partió de un cultivo de aproximadamente 20x10⁶ MΦN que fue infectado a una M.O.I de 2 con un stock de VSR con un título de 31.7x10⁶ TCID₅₀/mL. El cultivo infectado (MΦA) fue incubado por 2 h a 37°C con 5% de CO₂ para favorecer la adsorción del virus a la monocapa. Posterior a eso, sin retirar el inóculo viral, se agregó medio RPMI suplementado con 2% SFB. El cultivo fue incubado por 48 h y posterior a este tiempo, la monocapa fue despegada; 1x10⁶ células fueron evaluadas por inmunofluorescencia directa (ver sección 7.3), para evaluar el porcentaje de infección, y 13x10⁶ células fueron tratadas para extracción de proteínas por fraccionamiento celular (ver sección 7.8).

Las células HEp-2 se infectaron a M.O.I de 0.2 con el RSV durante 72 h, posteriormente se colectaron los sobrenadantes con el virus infeccioso y se congelaron a -80° C hasta su uso.

7.3 Inmunofluorescencia directa

Los MΦP (1×10^6) se lavaron con PBS 1X y se fijaron con 200 μ L de paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a 4°C con agitaciones cada 5 minutos.

Posterior a este tiempo, las células se permeabilizaron con 300 μ L de saponina al 0.3% a temperatura ambiente durante 20 minutos. Pasado este tiempo, las células se incubaron en buffer de bloqueo inespecífico de con suero normal de cabra (Biowest) al 5% en PBS 1X durante 20 minutos en hielo. Posteriormente, las células se incubaron con 40 μ L de la mezcla de anticuerpos comerciales IMAGEN™ Respiratory Syncytial Virus, que contiene 2 anticuerpos monoclonales conjugados con FITC que detectan las proteínas estructurales F y N del VSR. La tinción se llevó a cabo en hielo por 30 minutos en ausencia de luz, con agitación cada 10 minutos. Las células se analizaron por citometría de flujo, adquiriendo 10,000 eventos en el equipo FACScan (Becton-Dickinson). Los datos de la adquisición fueron analizados en el software CellQuest (Becton-Dickinson), identificando a las células FITC+.

7.4 Separación de células positivas y negativas para proteínas virales mediante citometría de flujo

A partir de 7×10^6 células provenientes de 3 pases diferentes de MΦP, se realizó una tinción de inmunofluorescencia como se mencionó en la sección anterior, exceptuando los pasos de fijación y permeabilización para conservar la viabilidad celular. Asimismo, el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad, para poder cultivar a las células recuperadas.

Se separaron las poblaciones positivas y negativas para FITC, en el equipo FACSAria III (Becton Dickinson). Cada población fue recibida en una solución de medio RPMI 1640 con SFB en una proporción 1:1. Posteriormente, las células recuperadas de cada población se lavaron con medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% SFB, 1% de penicilina-estreptomicina y 1% de antimicótico. Finalmente fueron sembradas independientemente con medio RPMI suplementado como se indicó anteriormente. Las células en cultivo se dejaron en incubación a 37°C y 5% CO₂ por 3 días. Al tercer día, se retiró el antimicótico del medio de cultivo.

Una vez que los cultivos se encontraron en condiciones óptimas de crecimiento, se mantuvieron bajo las condiciones mencionadas en la sección 7.1 y cada 48 horas en promedio, se realizaron pases dejando aproximadamente el 50% de células para mantener los cultivos.

7.5 Extracción de RNA viral

Los sobrenadantes de MΦP incubados 48 h y de HEp-2 infectadas por 72 h con VSR a M.O.I de 0.2, se centrifugaron durante 2.5 h a 59,000 g a 4°C en un rotor 45TI (Beckman Coulter). El pellet obtenido se resuspendió en 500 µL de solución monofásica de fenol y sales de guanidina (RiboEx™). El RNA fue extraído empleando el kit Hybrid-R™ (GeneAll), según instrucciones del proveedor. Después de extraído, el RNA se cuantificó por espectrofotometría con un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y finalmente se almacenó a -80°C hasta su uso para RT-PCR.

7.6 Cuantificación de copias de genoma viral por RT-PCR cuantitativo

Para el RNA extraído se realizó un RT-PCR de un solo paso basado en un ensayo TaqMan. Para cada muestra, la reacción se llevó a cabo por duplicado, en un volumen total de 20 µL, conteniendo 50 ng de RNA, 5 µL de 4X TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems), 1 µL de RSVA specific primer/probe mix (Genesig) el cual contiene los primers y sonda marcada con 6-carboxifluoresceína (FAM) específica para el gen N del RSV.

Para conocer el número de copias de genoma viral presentes en la muestra, se realizó una curva estándar, incluida en el kit con número de copias del genoma conocido. Para cada punto de la curva se realizó una reacción en un volumen total de 20 µL, conteniendo 10 µL de 2X Precision MaterMix (Genesig), 1 µL de RSVA specific primer/probe mix (Genesig) y 5 µL de cada dilución de la curva.

La amplificación y detección se llevó a cabo en un termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 5 minutos a 50°C para llevar a cabo la transcripción reversa, 20 segundos a 95°C para el inicio de la actividad de polimerasa, y 40 ciclos de 3 segundos a 95°C y de 30 segundos a 60°C. El número de copias del genoma se determinó mediante la curva estándar de C_T (ciclo umbral) vs número de copias del genoma en la que se interpoló el C_T obtenido para cada muestra problema.

7.7 Titulación del RSV por el método del TCID₅₀

Se sembraron 45,000 células HEp-2 en una placa de 96 pozos durante 24 horas. Se prepararon por triplicado 8 diluciones seriadas 1:10 de los sobrenadantes de MΦP y HEp-2 infectadas por 72 h con M.O.I de 0.2, agregando 90 μL de medio de infección (DMEM sin SFB) y 10 μL de cada sobrenadante. Se lavaron las células con 200 μL de PBS 1X y se adicionaron 25 μL de las diluciones 1:10 de los sobrenadantes a cada pozo. La placa se incubó por 2 horas a 37°C y 5% CO₂, agitando cada 30 minutos para favorecer la adsorción viral homogénea. Pasado este tiempo, se agregaron 175 μL de DMEM + SFB al 2% a cada pozo y la placa se incubó por 4 días.

La monocapa fue teñida con una solución de cristal violeta a temperatura ambiente por 1 h y se observó el efecto citopático en cada pozo.

Para calcular el título viral se determinó la última dilución en la que se observó efecto citopático y se tomó en cuenta cuántos pozos de los triplicados fueron positivos. Finalmente, se calculó el TCID 50/25 μL de sobrenadante, de acuerdo con el siguiente algoritmo (Sun & López, 2016):

$$“+ + +” \text{ TCID}_{50} = 10^{x+0.7}/25 \mu\text{L}$$

$$“+ + -” \text{ TCID}_{50} = 10^{x+0.4}/25 \mu\text{L}$$

$$“+ - -” \text{ TCID}_{50} = 10^{x-0.1}/25 \mu\text{L}$$

Donde:

x= inverso de la última dilución donde se observó efecto citopático

7.8 Fraccionamiento celular

Se tomaron de 11–13x10⁶ células de cada cultivo de MΦP, MΦA y MΦN. respectivamente, considerando 4 pases diferentes del primero, 2 pases diferentes del segundo cultivo, y solamente un pase del cultivo no infectado como control negativo.

Las células fueron lavadas para eliminar restos de medio de cultivo. El pellet celular se resuspendió en 90 μL de buffer A para fraccionamiento celular, la suspensión celular se agitó en vórtex por 10 segundos para lisar la membrana plasmática y se incubó en hielo por 10 minutos. Pasado el tiempo de incubación, la suspensión se centrifugó a 3,000 rpm por 7 minutos a 4°C. El sobrenadante, que representó la fracción citoplásmica, se recuperó en un tubo limpio y se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos y se almacenó a -20°C hasta su uso. El

pellet nuclear restante, se lavó dos veces con 200 μ L de buffer de lavado para fraccionamiento celular, centrifugando a 3,000 rpm por 7 minutos. El pellet se resuspendió en 70 μ L de buffer B para fraccionamiento celular y se agregaron 7.7 μ L de NaCl 5M para alcanzar una concentración final de 500 mM. Se agitó en vórtex por 20 segundos y se colocó en agitación a 1,800 rpm por 25 minutos a 4°C. Pasado este tiempo, se agitó en vórtex por 10 segundos más, y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se etiquetó como fracción nuclear y se almacenó en alícuotas de 20 μ L a -20°C hasta su uso.

La proteína total obtenida de las fracciones citoplásmica y nuclear se cuantificó por el método modificado de Lowry con el kit DC Protein Assay de Bio-Rad, según instrucciones del proveedor.

7.9 Western blot

Se tomaron 30 μ g de las fracciones citoplásmica y nuclear obtenidas a partir de cada cultivo, se agregaron 5.4 μ L de buffer de Laemmli 5X adicionado con β -mercaptoetanol 20% (Bio-Rad), y se ajustaron a un volumen de 25 μ L con H₂O destilada. Posteriormente, las muestras fueron tratadas en un baño de agua a 90°C por 10 minutos para favorecer la desnaturalización de las proteínas, y analizadas en geles de acrilamida al 12% con condiciones de corrida de 80 volts durante 1:30 h. Las proteínas se transfirieron en cámara semi-seca (TE 70 ECL-SemiDry Transfer Unit, Amersham Biosciences) a una membrana de PVDF (Immobilon-P Transfer Membranes, EMD Millipore Corporation) activada previamente con metanol absoluto por 15 segundos, lavada en MiliQ H₂O por 2 minutos, e incubada en Buffer de Transferencia por 15 minutos. La transferencia se realizó bajo condiciones de 18 volts por 30 minutos. La membrana con las proteínas nucleares y citoplásmicas se incubó en solución de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente. Posterior al bloqueo, la membrana se incubó toda la noche a 4°C en agitación constante con el anticuerpo policlonal contra el VSR, anti-RSV (Abcam, AB1120) en una dilución 1: 1,000 en TBS-Tween con leche al 5% para detectar las proteínas virales en las fracciones nucleares y citoplásmicas de los cultivos M Φ P, M Φ N y M Φ A.

La membrana fue lavada con TBS-Tween 0.1% e incubada por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante con el anticuerpo secundario anti-cabra

acoplado a peroxidasa (Invitrogen, 611620) en una dilución 1: 10,000 en TBS-Tween con leche al 5%.

Las proteínas virales se detectaron por quimioluminiscencia con el kit EZ-EZCL para detección de la actividad de peroxidasa (Biological Industries). Como control de pureza de la fracción citoplásmica, se evaluó la presencia de β -tubulina en la misma membrana, después de despegar el anticuerpo anti VSR. El despegado se realizó incubando la membrana con 15 mL del buffer para despegar anticuerpos adicionado con 105 μ L de β -mercaptoetanol, a 58°C por 18 minutos. Después, la membrana se lavó 3 veces con TBS 1X - Tween 0.1%, y se bloqueó con solución de bloqueo 1 h. Una vez bloqueada, la membrana fue incubada a 4°C por toda la noche con el anticuerpo primario anti- β -tubulina (Santa-Cruz, SC-9104) en una dilución 1: 1,000 en TBS-Tween con leche al 5%. Después de 3 lavados, se adicionó el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories) en una dilución 1: 60,000 TBS-Tween con leche al 5%.

Como control de pureza de la fracción nuclear, se evaluó la presencia de histona-3 en la misma membrana, esta fue tratada para despegar el anticuerpo contra β -tubulina bajo las mismas condiciones que fueron mencionadas anteriormente. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario anti-histona 3 (Cell Signaling Technology, 97155) en una dilución 1:1,000 en TBS-Tween con leche al 5%. Posterior a la incubación con el anticuerpo primario, la membrana fue lavada con TBS 1X-Tween0.1%, e incubada con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa en una dilución 1:10,000. Las proteínas específicas fueron reveladas en la membrana por quimioluminiscencia.

7.10 Determinación de la densidad boyante de las partículas virales

Dos sobrenadantes de M Φ P cultivados por 48 h y 1 sobrenadante de HEp-2 infectadas a M.O.I de 0.2 por 72 h, fueron concentrados a 50X y 25X respectivamente, empleando un tubo con filtro Amicon Ultra-15 10K (Merck), a 4000g por 15 minutos.

Los sobrenadantes concentrados, fueron cargados en un gradiente discontinuo de sacarosa (18–60%). Los gradientes fueron centrifugados en un rotor SW28 a 25,000 rpm por 2h a 4°C. Posteriormente, se colectaron fracciones de 500 μ L de

cada gradiente, obteniendo de 43 a 45 fracciones por cada uno. Estas fracciones fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis por Western Blot.

Para identificar a las fracciones con partículas virales, se realizó un Western blot, para identificar a aquellas con proteínas virales. Para esto, se realizaron geles de acrilamida al 12% en donde se cargaron 15 µL de cada fracción previamente tratada con buffer de Laemmli 2X adicionado con 20% de β-mercaptoetanol y desnaturalización por calor en baño de agua a 90°C por 10 minutos. La corrida se llevó a cabo a 80 V por 2h. Posterior a esto, se realizó la transferencia y Western Blot para detectar proteínas virales con el anticuerpo anti RSV, de acuerdo con lo descrito en la sección 7.10.

La densidad boyante del VSR se evaluó en todas las fracciones obtenidas del gradiente de sacarosa. Para esto se usó un refractómetro manual (ATAGO, N1) el cual mide el porcentaje de sacarosa presente en la muestra. Los °Brix fueron convertidos a densidad boyante de acuerdo con la tabla de equivalencia de °Brix y densidad (USDA Technical Procedures Manual, 2011). La densidad obtenida para cada fracción equivale a la densidad boyante del virus contenido en ella.

VIII. RESULTADOS

8.1 Determinación del tipo de persistencia establecida por el RSV

Para determinar si el RSV establece una persistencia de tipo acarreadora o real *in vitro*, se seleccionaron tres pases diferentes del cultivo de macrófagos infectados de manera persistente (M ϕ P) y en primer lugar, se evaluó por inmunofluorescencia directa con un anticuerpo anti-VSR acoplado a FITC mediante citometría de flujo, el porcentaje de células infectadas en cada uno de ellos. El análisis se realizó construyendo gráficas de tamaño contra complejidad (FSC-H vs SSC-H), en las que se delimitó una región principal (R1) para descartar restos celulares (Figura 5A) y a partir de dicha región se construyeron histogramas para determinar el porcentaje de células FITC⁺, con respecto al control negativo (Figura 5B).

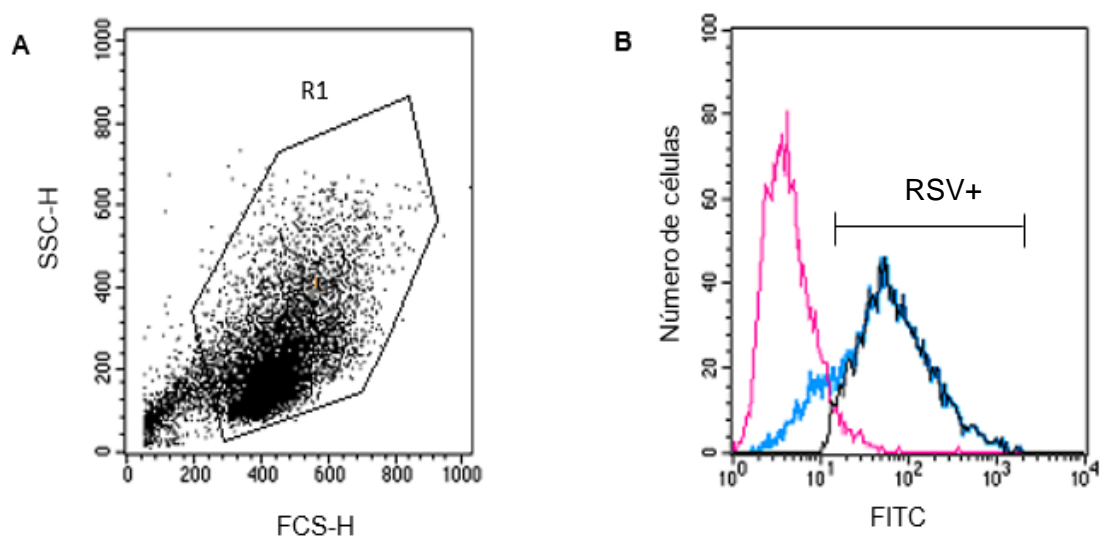


Figura 5. Expresión de proteínas virales en cultivos persistentes. La inmunofluorescencia se evaluó por citometría de flujo con un anticuerpo anti-RSV acoplado a FITC. A) Gráfica de puntos de complejidad contra tamaño (FSC-H vs SSC-H). B) Histograma de número de células positivas para el RSV. El histograma en color negro representa la resta del área bajo la curva de los histogramas rosa y azul que representan el control sin tinción y las células teñidas respectivamente.

En la tabla 2 se muestra el porcentaje de células infectadas en cada uno de los pases celulares evaluados.

Tabla 2. Porcentaje de macrófagos infectados persistentemente.

| No. de pase de cultivo de MφP | Porcentaje (%) |
|-------------------------------|----------------|
| 109 | 75.9 |
| 110 | 83.5 |
| 120 | 73.1 |

De acuerdo a lo reportado, los cultivos persistentes acarreadores son aquellos en los que las células infectadas se encuentran en un porcentaje menor con respecto a las no infectadas (aproximadamente 10%) (Guo et al., 2018), por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el RSV podría establecer una infección persistente real en estado estacionario, ya que las células infectadas representan por lo menos el 70% del cultivo (tabla 2). Para sustentar esta hipótesis, se evaluó si efectivamente las células FITC⁻ que no expresaban proteínas virales ni eran portadoras del genoma del RSV. Para esto, en primer lugar, se realizó una inmunofluorescencia sin permeabilizar a las células (para mantener su viabilidad), utilizando el mismo anticuerpo anti-RSV que en el ensayo anterior y posteriormente, las células se separaron físicamente mediante citometría de flujo, en dos poblaciones: células FITC⁺ (infectadas) y células FITC⁻ (aparentemente no infectadas). Las células recuperadas por este medio, se cultivaron de manera independiente y se evaluó si el patrón de expresión de proteínas virales se modificaba a lo largo del tiempo. Cabe mencionar que para la selección de las poblaciones FITC⁺ y FITC⁻ en los cultivos teñidos con el anticuerpo anti- RSV, se consideró el histograma de las células no teñidas (control negativo) como el área de fluorescencia negativa (FITC⁻), mientras que la región de fluorescencia positiva (FITC⁺) se estableció dejando una ventana de células con fluorescencia intermedia, para descartar contaminación entre células de las dos poblaciones al momento de la separación (Figura 6). Las células separadas bajo estas condiciones, mostraron un 95% y 99% de pureza para las poblaciones FITC⁻ y FITC⁺, respectivamente.

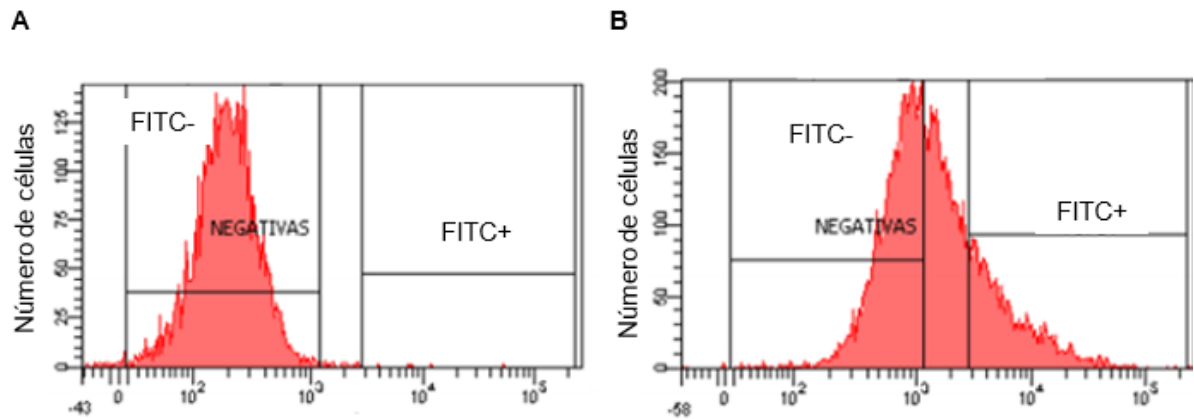


Figura 6. Estrategia de adquisición para la separación de células positivas y negativas para la expresión de proteínas virales. A) Control de MΦP sin teñir. B) MΦP teñidos con anti-RSV acoplado a FITC.

Las células se cultivaron de manera independiente en medio RPMI con 10% de SFB para optimizar su crecimiento después del estrés por su manipulación en el equipo de citometría de flujo y se monitorearon mediante inmunofluorescencia durante 14 pases para determinar el porcentaje de células con expresión de proteínas virales en cada cultivo (Figura 7). El pase cero representa el momento en el que las células fueron separadas de acuerdo a su fluorescencia, el pase número 1 se realizó una semana después de la separación, mientras que los pases consecutivos se realizaron cada 48 horas en promedio.

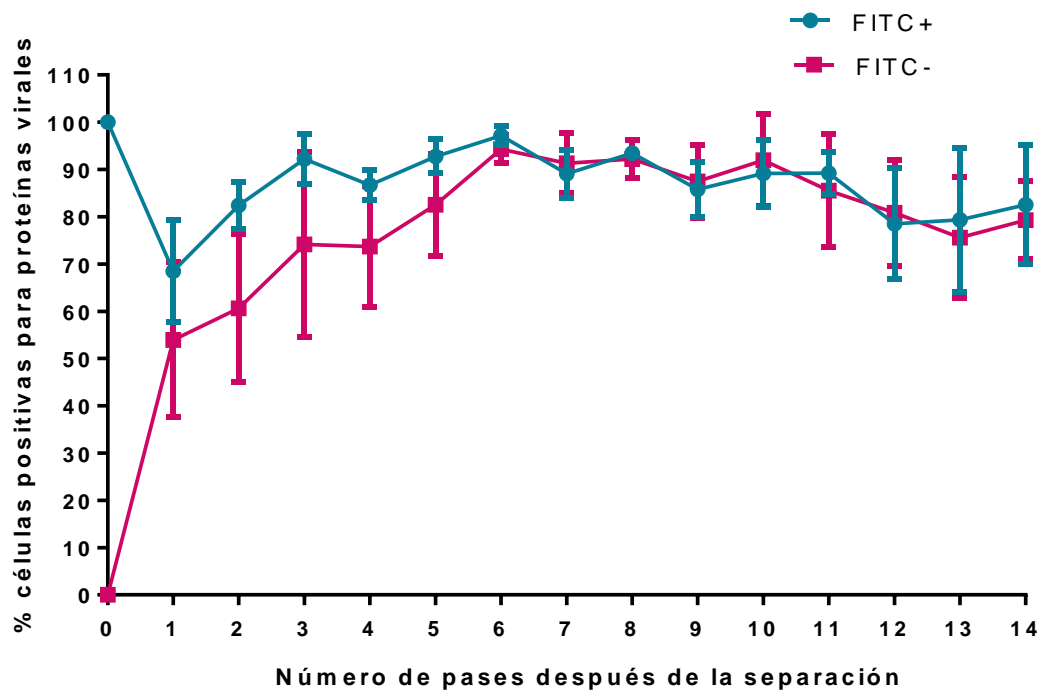


Figura 7. Cinética de expresión de proteínas virales en poblaciones separadas mediante citometría de flujo. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes, con su desviación estándar.

Para la población separada como FITC⁻ (gráfica en rosa), se observó desde el primer pase la presencia de aproximadamente 50% de células expresando proteínas virales y este porcentaje aumentó hasta llegar a ser mayor al 90% a partir del pase 6, este patrón se mantuvo constante en hasta el pase 10 y luego se observó una disminución hasta llegar a un 80% en el pase 14. Por otro lado, para la población separada como FITC⁺ (en azul), se observó en el pase 1 solo el 70% de células expresando proteínas virales, con un aumento en los pases siguientes, llegando al 90% en el pase 3. A partir del pase 6, las poblaciones FITC⁺ y FITC⁻ tuvieron un comportamiento similar en cuanto a la expresión de las proteínas del RSV ($p=0.2538$). Estos resultados sugieren que las células que aparentemente no estaban infectadas, tenían indetectable o nula expresión de proteínas virales.

Para evaluar la presencia del genoma viral en la población FITC⁻, se realizó nuevamente una separación celular por citometría de flujo del cultivo de MΦP de pase 117 (independiente de los cultivos provenientes de la primera separación

realizada) y se extrajo RNA total a partir de las poblaciones FITC⁺ y FITC⁻. Posteriormente, se cuantificó mediante RT-PCR el genoma del RSV y el resultado inicial se expresó como el número de copias de genoma por cada 50 ng de RNA total. Los resultados se resumen en la tabla 2, que consiste de un análisis numérico de las copias de genoma viral por cada célula de cada una de las dos poblaciones. Se encontró que cada célula FITC⁻ contiene en promedio 1.15 copias de genoma viral, mientras que cada célula FITC⁺ contiene en promedio 23.19 copias de genoma del RSV. Estos resultados apoyan nuestras conclusiones anteriores acerca de la presencia del genoma viral en las células FITC⁻, con niveles indetectables de proteínas del RSV.

Tabla 2. Cuantificación de las copias de genoma viral en poblaciones positivas y negativas para proteínas virales.

| | FITC- | FITC+ |
|---|----------------------|------------------------|
| Número de células recuperadas por citometría de flujo | 1,030,553 células | 521,269 células |
| RNA extraído después de la separación (ng/μL) | 10.6 | 18.4 |
| Volumen de elución RNA (μL) | 30 | 30 |
| RNA total en 30 μL (ng) | 318 | 552 |
| RNA empleado para qPCR (ng) | 50 | 50 |
| # copias de genoma viral por cada 50 ng de RNA | 204,814 ± 181 copias | 1,085,852 ± 479 copias |
| # copias en el RNA total | 1, 187,890 copias | 12, 101, 226 copias |
| # copias de genoma viral por cada célula | 1.15 copias / célula | 23.19 copias / célula |

Por otro lado, se evaluó la cantidad de virus infecciosos producidos por los cultivos FITC⁺ y FITC⁻, con pases 11 y 12 por titulación de los sobrenadantes para determinar el TCID₅₀, que indica la cantidad de virus necesaria para producir efecto citopático en el 50% de los cultivos infectados. Después de 96 horas de incubación, ninguno de los sobrenadantes recuperados de los 4 cultivos indujo formación de sincicios, es decir, el efecto citopático fue indetectable (Figura 8). Estos resultados se compararon con los sobrenadantes control de células HEp-2 infectadas de manera aguda con el RSV, en donde el efecto citopático fue muy evidente ya que se encontraron sincicios grandes y destrucción de la monocapa celular (Figura 8). El título del sobrenadante de la infección aguda en células HEp-2 fue de 3.17x10⁶ TCID₅₀/mL. Estos resultados indican que en los cultivos de MΦP, la producción de partículas virales infecciosas es de baja a nula. Sin embargo, aunque no pueden detectarse virus infecciosos mediante este método, se ha descrito previamente la presencia de partículas virales defectuosas en estos cultivos (Sarmiento et al., 2002).

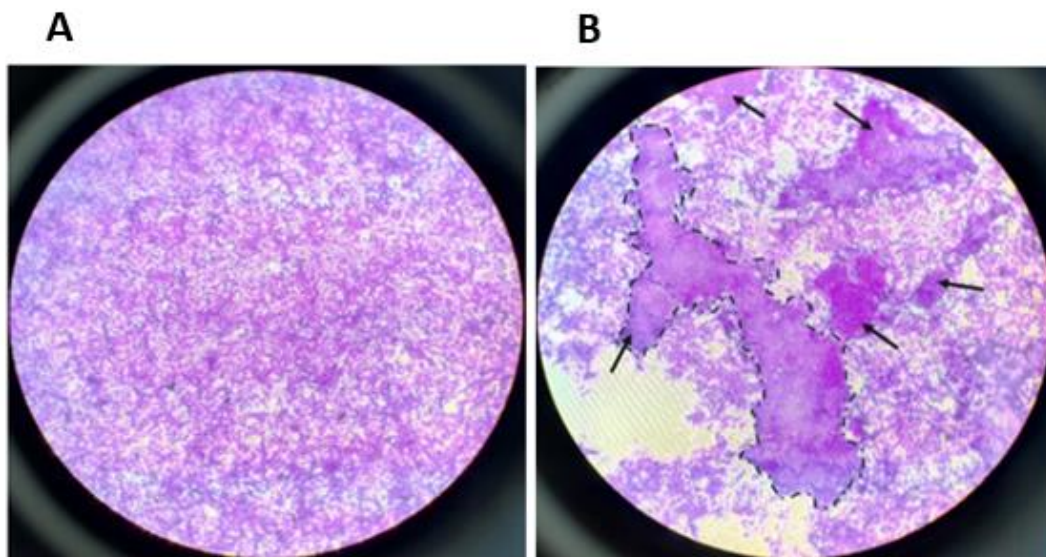


Figura 8. Efecto citopático observado en A) sobrenadantes de infección persistente provenientes de los pases 11 y 12 de los cultivos FITC⁺ y FITC⁻, y B) sobrenadante control positivo de células HEp-2. Células epiteliales teñidas con cristal violeta y observadas en microscopio óptico. Aumento 40X. Los sincicios se encuentran delimitados con línea punteada y señalados con flecha.

8.2 Determinación de la presencia de partículas virales defectuosas

Para evaluar cualitativamente la presencia de virus defectuosos en los sobrenadantes de MΦP (SN-MΦP), se realizaron gradientes de sacarosa de los sobrenadantes de dos pases diferentes (100 y 107) para determinar la densidad de los virus presentes en cada una de las fracciones. De acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, la densidad reportada para el RSV es de 1.18–1.20 g/mL y son conocidas como partículas virales completas, por lo tanto, todas las partículas virales con una densidad menor son consideradas como partículas defectuosas (ICTV,2009). Los gradientes de sacarosa fueron de tipo discontinuos (20–60%) y después del proceso de ultracentrifugación con los sobrenadantes, se colectaron fracciones de 500 µL, dando 42 en total para cada uno de los dos SN-MΦP. Posteriormente, cada fracción se analizó por Western blot para la determinar la presencia de proteínas virales con un anticuerpo policlonal contra el RSV. La densidad de cada fracción fue determinada con un refractómetro. Como control, se evaluó a la par un sobrenadante de células HEp-2 infectadas de manera aguda con el RSV, a partir del cual se obtuvieron 43 fracciones de 500 µl a partir del gradiente de sacarosa.

De todas las fracciones evaluadas mediante Western blot en el sobrenadante control, se encontraron proteínas virales en fracciones ligeras con densidades de 1.050–1.082 g/mL (Figura 9A). Además, también se encontraron proteínas en las fracciones con densidades pesadas cuyas densidades son de 1.178–1.210 a g/mL (Figura 9B). Debido a lo anterior, se infiere que en una infección aguda hay presencia de partículas virales defectuosas y completas.

Los Western blot para las demás fracciones en donde no se detectaron proteínas virales para el gradiente de sacarosa del sobrenadante control se muestran en el Anexo I.

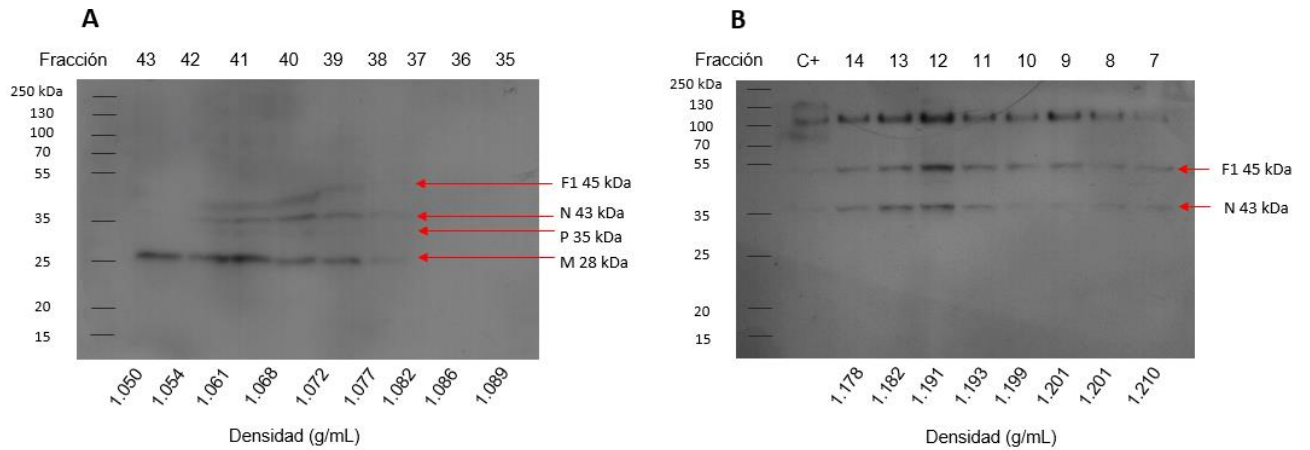


Figura 9. Presencia de partículas virales defectuosas y completas en células HEP-2 durante una infección aguda (sobrenadante control). A) La densidad de las fracciones ligeras (43 – 38) indica la presencia de partículas virales defectuosas. B) La densidad de las fracciones pesadas indica la presencia de partículas virales completas (14 – 7). El patrón de bandas revelado por Western blot se comparó con reportes previos del peso molecular de las proteínas virales (ver Anexo 3).

De manera contraria, en los SN-M ϕ P se observaron proteínas virales únicamente en las fracciones con densidades ligeras, con densidades de 1.049–1.085 g/mL y no se observaron proteínas virales en las fracciones 7 a 14, en donde se ubicaron a los virus completos en el sobrenadante control (Figuras 10 y 11). Los Western blot para las fracciones en donde no se detectaron proteínas virales para el gradiente de sacarosa de los SN-M ϕ P se muestran en el Anexo I.

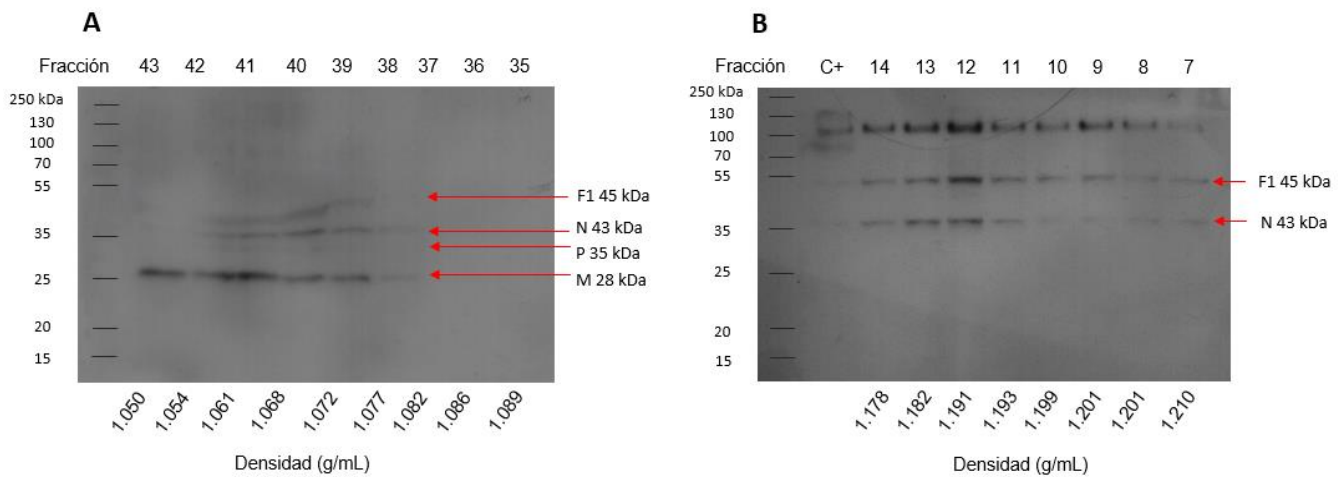


Figura 10. Presencia de partículas virales defectuosas en fracciones ligeras en sobrenadantes de cultivos infectados de manera persistente. La presencia de proteínas en fracciones ligeras indica la presencia de virus defectuosos. A) SN-M ϕ P pase 100 y B) SN-M ϕ P pase 107.

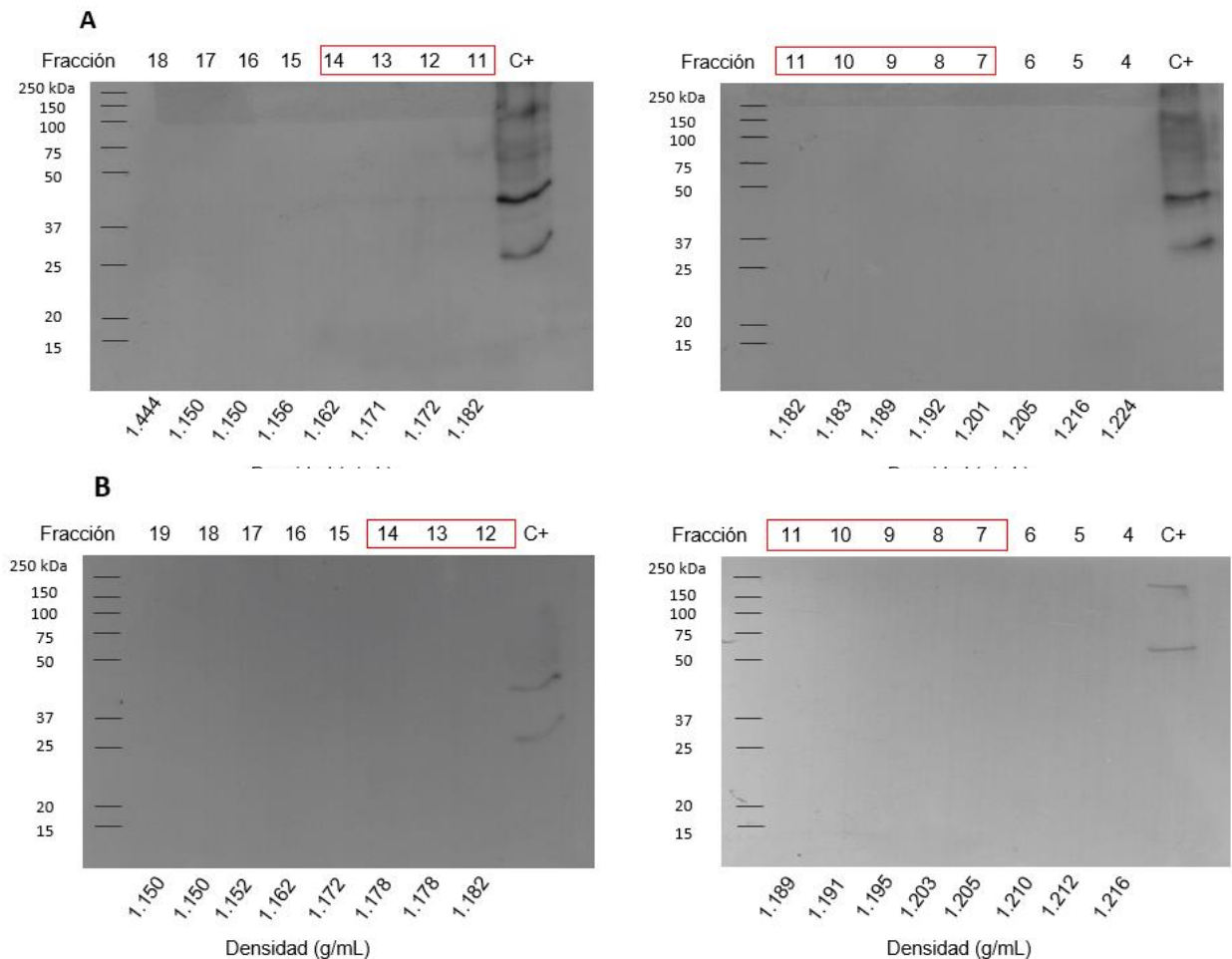


Figura 11. Ausencia de partículas virales defectuosas en fracciones pesadas (en recuadro) en sobrenadantes de cultivos infectados de manera persistente. La ausencia de proteínas en fracciones pesadas indica que no existen virus completos. A) SN-M ϕ P pase 100 y B) SN-M ϕ P pase 107.

Para descartar que en el análisis de las fracciones de los gradientes de sacarosa mediante Western blot, se estuvieran detectando únicamente proteínas del virus liberadas en los sobrenadantes de los cultivos y no virus ensamblados, se realizó una ultracentrifugación de los SN-M ϕ P (sin gradiente de sacarosa) a fin de precipitar el contenido y obtener RNA total para determinar la presencia de RNA genómico del VSR. La evaluación se llevó a cabo mediante RT-PCR cuantitativo y se comparó con respecto a un sobrenadante control de células HEp-2 infectadas de manera aguda. A partir de los SN-M ϕ P se cuantificaron cerca de 2,000 copias del genoma del virus/50 ng de RNA (tabla 4), mientras que los sobrenadantes de células HEp-2 infectadas de manera aguda, mostraron 100 veces más copias del genoma viral, sugiriendo que, en ambos casos, las proteínas detectadas en las fracciones de sacarosa realmente provienen de virus ensamblados, mismos que pueden ser completos o defectuosos.

Tabla 4. Número de copias de genoma viral presentes en SNs de infecciones aguda y persistente.

| | RNA extraído (ng/ μ L) | # copias de genoma viral |
|------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| SN-HEp-2 | 59.7 | 223,251 \pm 394 copias |
| SN-M ϕ P ₁₀₉ | 21.4 | 2,209 \pm 203 copias |

8.3 Localización intracelular de las proteínas virales

Para evaluar la localización intracelular de las proteínas virales de manera comparativa en una infección aguda y una infección persistente, se realizó un fraccionamiento celular para extraer proteínas citoplásmicas y nucleares. Las proteínas virales en las fracciones nucleares y citoplásmicas se evaluaron mediante Western blot y la pureza de cada uno de estos compartimentos fue evaluada mediante la presencia de β -tubulina como marcador citoplásmico y de histona 3 como marcador nuclear. La determinación se llevó a cabo por duplicado para la infección aguda y en 4 cultivos de M ϕ P con pases distintos.

La infección aguda se llevó a cabo en macrófagos de la misma línea en la que se estableció la infección persistente (macrófagos P388D1). La infección se realizó con una MOI de 2, durante 48 horas. Se confirmó mediante inmunofluorescencia directa la infección. Al cabo de las 48 horas, se observaron $38.15\% \pm 2.33\%$ de macrófagos infectados de forma aguda (M ϕ A) y a partir de estos cultivos se realizó la extracción de proteínas citoplásmicas y nucleares.

El análisis por Western blot indicó que después de 48 horas de infección aguda, las proteínas F, N, P y M estaban ubicadas con mayor abundancia en el núcleo, sin embargo, solo las proteínas F y P fueron detectadas en el citoplasma (Figura 12A). Por otro lado, se observó que en la infección persistente F, N, P y M se encuentran localizadas tanto en citoplasma como en núcleo, sin embargo, la abundancia de P y M es mayor en el núcleo, mientras que F se observó con mayor abundancia en el núcleo de los pases 103 y 121. En cuanto a la proteína N, se encontró con la misma abundancia en ambos compartimentos. Finalmente, la proteína L se localizó en ambos compartimentos (Figura 12B).

Con base en lo obtenido en los Western blot, observamos que, en ambos tipos de infección, las proteínas P y M se encuentran con mayor abundancia en el núcleo en todos los pases,

Nuestro resultados indican que las proteínas N, F, P y M son más abundantes en el núcleo de las células infectadas de manera aguda, mientras que solo P y M son más abundantes en el núcleo de las células infectadas de manera persistente; en tanto, la proteína L se detectó únicamente en los cultivos persistentes. Estos resultados dan pauta para el estudio de las interacciones de estas proteínas con los componentes nucleares de la célula hospedera y determinar su participación en el establecimiento de la persistencia del RSV.

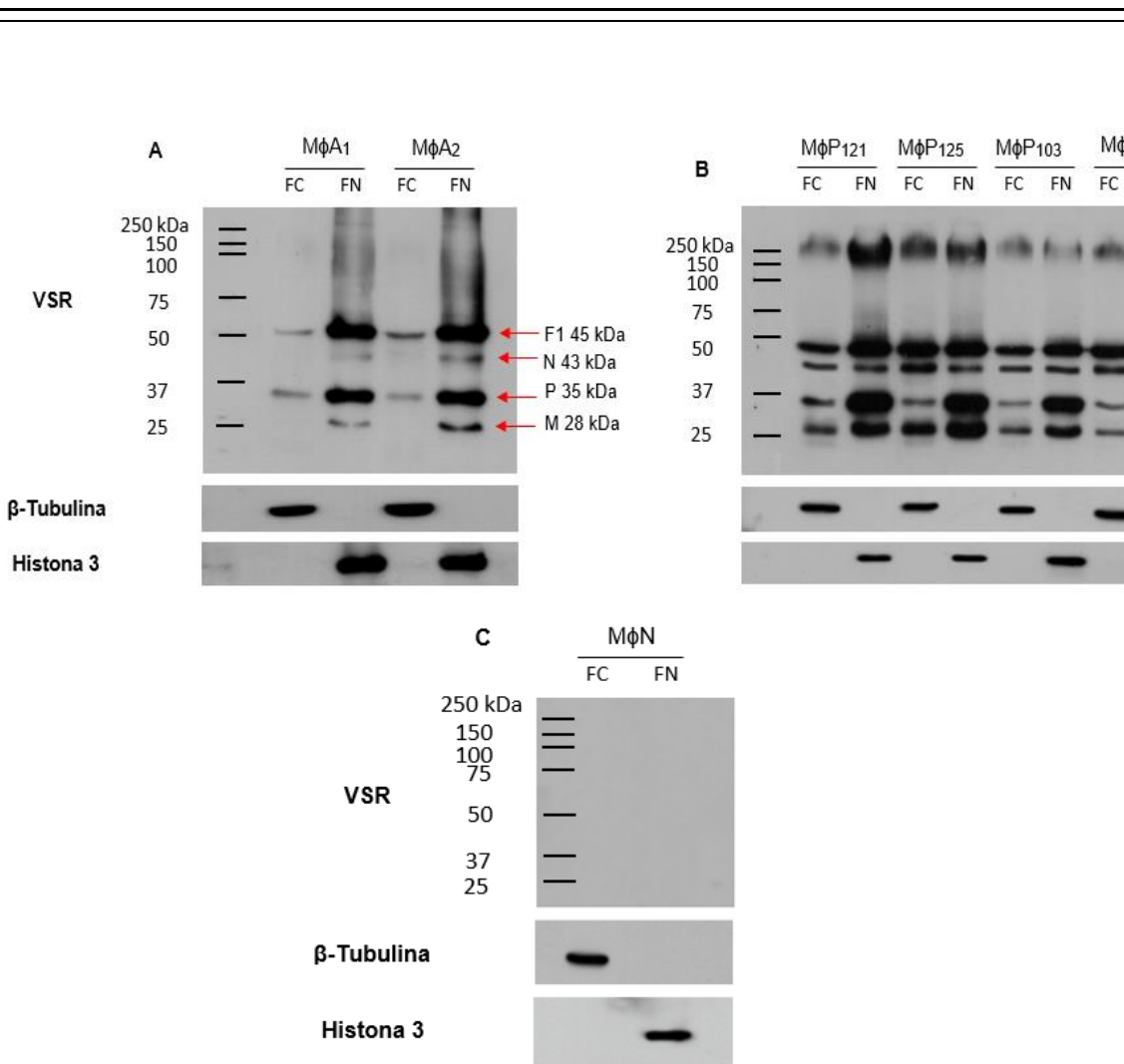


Figura 12. Localización intracelular de las proteínas virales. Como controles de pureza para cada fracción se emplearon β -tubulina e Histona 3 para citoplasma y núcleo respectivamente. A) Infección aguda (MφA), B) Infección persistente (MφP), y C) Control de macrófagos no infectados (MφN) FC: fracción citoplásmica, FN: fracción nuclear.

IX. DISCUSIÓN

La persistencia viral es un estado en el cual coexisten el virus y su hospedero por tiempo prologando. Este proceso ocurre mediante la evasión de la respuesta inmune por parte del virus y por mecanismos de regulación de la tasa de replicación viral para mantener el genoma sin comprometer la vida del hospedero. Sin embargo, aunque solo una minoría de las infecciones virales persistentes son letales, muchas de ellas están relacionadas con procesos de inflamación crónica, como una respuesta natural del sistema inmunitario frente a la presencia de un genoma extraño. La persistencia viral en sistemas *in vitro* se puede clasificar en acarreadora, o en persistencia real de tipo latente o real en estado estacionario. Es importante determinar el tipo de infección persistente que pueden establecer los virus, ya que pueden diseñarse estrategias para el control de la infección. Por ejemplo, las infecciones acarreadoras podrían limitarse con anticuerpos neutralizantes para evitar la infección de novo de las células vecinas, mientras que una persistencia real podría controlarse con moléculas antivirales dirigidas contra moléculas blanco para bloquear la replicación del genoma del virus o su transmisión a las células hijas.

El RSV tiene capacidad para establecer infecciones persistentes en animales experimentales, en líneas celulares y existe evidencia de que este tipo de infección también ocurre en humanos. En nuestro modelo *in vitro*, se evaluó el tipo de persistencia establecida por el RSV, así como los mecanismos mediante los cuales ésta podría llevarse a cabo, tales como la producción de partículas defectuosas y la localización diferencial de proteínas virales en compartimentos celulares tales como citoplasma y núcleo.

La determinación del tipo de persistencia establecida en nuestro modelo se llevó a cabo mediante la separación por citometría de flujo de poblaciones positivas y negativas para la expresión de proteínas virales a partir de cultivos infectados de manera persistente con el RSV. Los resultados obtenidos mostraron que, aunque existía una población celular que no expresaba proteínas virales de acuerdo a la inmunofluorescencia, al cultivarse de manera independiente comenzó a expresar niveles detectables de proteínas del RSV hasta porcentajes >90% desde los primeros pases después de la separación, y este

comportamiento se mantuvo a lo largo de los pases subsecuentes. Aunado a esto, el genoma viral pudo ser detectado en esta población aparentemente negativa, con un promedio de 1.15 copias por cada célula. Sin embargo, es importante mencionar que, dado que la tinción que se realizó para llevar a cabo la separación por citometría de flujo se realizó en fresco, es decir, sin permeabilizar a las células, es posible que dentro de la población negativa existieran algunas células que sí expresaran proteínas virales, sin embargo, al momento de la separación fueran detectadas como negativas debido a su baja fluorescencia. Asimismo, es posible también que las células separadas tuvieran una baja expresión de proteínas virales en la membrana plasmática sin lograr la sensibilidad necesaria por la inmunofluorescencia para ser detectadas por el equipo.

La falta de expresión de proteínas virales aun cuando las células infectadas contienen el genoma viral se ha observado en otros casos, tal como se reportó en un estudio de la persistencia *in vitro* del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), en donde a partir del aislamiento de dos células infectadas que contenían únicamente al genoma viral sin la expresión de proteínas virales, se detectó la expresión de proteínas virales en las dos clonas a partir del segundo pase en cultivo, mientras que a partir del pase 3 el porcentaje de células con genoma y proteínas virales llegó a ser cercano a un 10% (Guo et al., 2018). En otros estudios, se ha observado que, en algunos casos, la expresión de proteínas es dependiente de la densidad celular en cultivo (Martín-Acebes & Herrera, 2010) ya que cuando las células se encuentran en gran confluencia, se incrementa la expresión de proteínas virales aunque la razón por la cual sucede no ha sido determinada hasta el momento. En nuestro caso, esta última observación podría explicar la oscilación de los porcentajes de células positivas a lo largo del tiempo, observada en la cinética de expresión de proteínas virales (Figura 7).

Con base en estas observaciones, proponemos que el genoma viral podría encontrarse presente en todas las células, aunque sin expresarse en algunas de ellas. El silenciamiento de la expresión de genomas de virus de RNA puede llevarse a cabo gracias a mecanismos propios del virus. En este sentido, se ha descrito que algunos virus poseen proteínas codificadas en su genoma y RNAs

no codificantes, que fungen como silenciadores de mensajeros propios y mensajeros celulares tanto en el núcleo como en el citoplasma (Kane & Golovkina, 2010). Sin embargo, para afirmar que esto ocurre en nuestro modelo, se requieren de más estudios.

Por otro lado, observamos que los sobrenadantes de los cultivos previamente separados mediante citometría de flujo, no tienen virus infecciosos detectables mediante ensayos biológicos, debido a que no existe efecto citopático visible, en comparación con sobrenadantes provenientes de infecciones agudas en células epiteliales de la línea HEp-2, en los cuales el título viral alcanzó alrededor de 10^6 TCID₅₀/mL.

Debido a las diferencias entre los resultados obtenidos en este trabajo y las características de un cultivo persistente de tipo acarreador en el que se requieren partículas virales infecciosas para que la infección sea conservada a largo plazo, (Boldogh et al., 1996), sugerimos que el RSV establece en el modelo *in vitro* una infección persistente real en estado estacionario, sin producción de virus infecciosos y un 100% de células infectadas. Sin embargo, esto debe confirmarse mediante un ensayo de hibridación *in situ* con una sonda fluorescente con el fin de confirmar que el genoma viral se encuentra en todas las células en cultivo.

El que no se detecten virus infecciosos en los sobrenadantes de los cultivos, no implica necesariamente que haya ausencia de partículas virales, debido a que se pueden producir virus defectuosos. Las partículas virales defectuosas contienen genomas que pueden tener deleciones, inserciones o repeticiones, modificando funciones del virus (Lopez, 2014). En nuestro caso, se determinó que en los cultivos persistentes existen partículas consideradas como defectuosas que tienen densidades de 1.049–1.085 g/mL; sugiriendo que estas partículas son estructuralmente diferentes a las partículas virales completas con densidades de 1.178–1.210 g/mL observadas durante una infección aguda en células HEp-2. Debido a que estas partículas son defectuosas, no pueden ser detectadas mediante ensayos biológicos para evaluar efecto citopático.

Previamente se reportó que desde el pase 11 después del establecimiento de la persistencia del VSR en nuestro modelo de estudio, ocurría la producción de

partículas virales defectuosas junto con la producción de virus completos (Sarmiento et al., 2002). En el trabajo presente, estudiamos pases tardíos (mayores al pase 100) y observamos ausencia de virus completos o infecciosos según los ensayos biológicos y de acuerdo a las densidades relativas.

Por otro lado, la replicación del RSV se lleva a cabo en cuerpos de inclusión citoplásmicos, sin embargo, algunas de sus proteínas estructurales y no estructurales pueden ser transportadas hacia el núcleo para desempeñar funciones de control de varios procesos celulares para beneficiar la replicación viral (Audsley et al., 2016). Por ejemplo, se sabe que la proteína M tiene un papel fundamental en la inhibición de la replicación del genoma del hospedero (R Ghildyal et al., 2003), mientras que las proteínas no estructurales NS1/NS2 bloquean factores de transcripción de la respuesta inmune antiviral (Chatterjee et al., 2017).

En nuestro caso, el análisis de la localización intracelular de las proteínas del RSV durante la infección persistente, mostró la expresión de las proteínas F, N, M, P y L tanto en citoplasma como en núcleo, con una abundancia mayor de las proteínas P y M en el núcleo. Estos resultados se compararon con una infección aguda realizada también en macrófagos y se encontró un patrón similar, con excepción de la proteína L que no fue detectada en la infección aguda y de las proteínas P y F que fueron las únicas detectadas en citoplasma en este caso. Asimismo, observamos a la proteína M únicamente en el núcleo a las 48 horas después de la infección, mientras que como se mencionó, durante la infección persistente, esta misma proteína fue ubicada en núcleo y con menor abundancia en el citoplasma. Estos resultados concuerdan con lo reportado anteriormente, en donde se describe que debido a que la proteína M es requerida para la inhibición de la transcripción del genoma del hospedero, su ubicación nuclear ocurre durante las primeras horas post infección (R Ghildyal et al., 2003; Reena Ghildyal et al., 2005), aunque en etapas avanzadas de la infección debe ser abundante en el citoplasma para participar en el ensamble de los nuevos viriones.

En cuanto a la proteína F1 se encontró tanto en citoplasma como en núcleo, teniendo una mayor abundancia en este último compartimento. Hasta el

momento no existen reportes en los que esta proteína se haya ubicado en el núcleo, por lo que podría estar siendo retenida en este compartimento, afectando el ensamble de nuevas partículas virales tanto en número, como en la cantidad óptima de proteína estructural, afectando su capacidad infectiva y para producir efecto citopático.

Con respecto a las proteínas N y P, se sabe que forman parte del complejo ribonucleoprotéico, por lo que se encuentran unidas a la polimerasa L ayudando a su actividad (Esneau et al., 2019; Lifland et al., 2012). Su localización intracelular ha sido descrita a nivel citoplásmico en cuerpos de inclusión formados pocas horas después de una infección aguda (Rincheval et al., 2017) y hasta el momento no existen reportes en los cuales estas proteínas se hayan encontrado en el núcleo. En nuestro trabajo, encontramos a las dos proteínas N y P en citoplasma y núcleo durante los dos tipos de infección. Dado que no se ha descrito un papel intranuclear para estas proteínas, sugerimos la hipótesis de que, debido a su afinidad por ácidos nucleicos, podrían interactuar con el genoma del hospedero a fin de modular la expresión de genes celulares y posiblemente promoviendo la transmisión del genoma hacia las células hijas durante la división celular.

Reportes previos han identificado a la proteína L en el citoplasma de células infectadas al formar parte de los cuerpos de inclusión para llevar a cabo los procesos de transcripción y replicación del genoma viral (Carromeu et al., 2007). En este trabajo, se detectaron bandas alrededor de los 250 kDa tanto en núcleo como en citoplasma en la infección persistente; el peso de estas bandas sugiere que podría tratarse de la proteína L. Considerando que no existen reportes previos de su localización intranuclear, este resultado es de gran interés ya que al tener afinidad por ácidos nucleicos, es posible que en algún momento durante la infección sea retenida en este compartimento.

Los reportes existentes para la localización intracelular de estas proteínas se han llevado a cabo en células epiteliales encontrando que solamente M y NS1/NS2 tienen un importe hacia el núcleo. Nuestros resultados muestran la primera evidencia en cuanto a la localización de las proteínas estructurales del RSV en macrófagos, y debido a que existen diferencias con lo observado en células

epiteliales, sugerimos que existen condiciones diferentes en ambas estirpes celulares que les permiten tener una diferente respuesta a la infección aguda y persistente por el RSV.

Al localizarse algunas de las proteínas estructurales en núcleo, pensamos que estas deben tener un papel definido en este compartimento que ayude a establecer una infección persistente, sin embargo, para determinar si existe interacción o no con componentes nucleares del hospedero se necesitan de estudios proteómicos. Por lo tanto, este trabajo es un antecedente para llevar a cabo un análisis profundo de las interacciones de la proteínas del RSV con componentes del núcleo celular.

X. CONCLUSIONES

- El RSV establece una infección persistente en estado estacionario en macrófagos murinos *in vitro*, ya que nuestros resultados sugieren que, aunque la expresión de las proteínas oscila a lo largo del tiempo, todas las células contienen el genoma viral.
- La falta de virus infecciosos en los sobrenadantes de los cultivos infectados persistentemente, sugiere que el mantenimiento de la infección no depende de este tipo de partículas virales, descartando la infección persistente de tipo acarreadora.
- A diferencia de lo reportado durante infecciones agudas de células epiteliales, encontramos durante la infección aguda y persistente de macrófagos murinos, que las proteínas N, P, F y L para el caso de la infección persistente, están ubicadas no solo en el citoplasma, sino también en el núcleo celular.

XI. PERSPECTIVAS

- Determinar la localización intracelular del genoma viral mediante una hibridación *in situ* con una sonda fluorescente.
- Evaluar el curso de la infección por el RSV en tiempo real, para determinar cómo se hereda el genoma viral.
- Estudiar las interacciones de las proteínas estructurales localizadas en núcleo con los componentes celulares mediante un estudio proteómico.
- Evaluar el comportamiento de la infección persistente y aguda del RSV en macrófagos humanos.

XII. REFERENCIAS

- Audsley, M. D., Jans, D. A., & Moseley, G. W. (2016). Roles of nuclear trafficking in infection by cytoplasmic negative-strand RNA viruses: Paramyxoviruses and beyond. *Journal of General Virology*, 97(10), 2463–2481. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000575>
- Barnes, P. J. (2008). Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Reviews Immunology*, 8(3), 183–192. <https://doi.org/10.1038/nri2254>
- Battles, M. B., & McLellan, J. S. (2019). Respiratory syncytial virus entry and how to block it. *Nature Reviews Microbiology*, 1. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0149-x>
- Bloom-Feshbach, K., Alonso, W. J., Charu, V., Tamerius, J., Simonsen, L., Miller, M. A., & Viboud, C. (2013). Latitudinal Variations in Seasonal Activity of Influenza and Respiratory Syncytial Virus (RSV): A Global Comparative Review. *PLoS ONE*. Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054445>
- Boldogh, I., Albrecht, T., & Porter, D. D. (1996). *Persistent Viral Infections. Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413348>
- Borchers, A. T., Chang, C., Gershwin, M. E., & Gershwin, L. J. (2013). Respiratory syncytial virus - A comprehensive review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 45(3), 331–379. <https://doi.org/10.1007/s12016-013-8368-9>
- Brown, G., Sanmun, D., Iyer, L. R., Yeo, D., Brink, J., Tan, B.-H., ... Tang, K. (2010). Protein Analysis of Purified Respiratory Syncytial Virus Particles Reveals an Important Role for Heat Shock Protein 90 in Virus Particle Assembly. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(9), 1829–1848. <https://doi.org/10.1074/mcp.m110.001651>
- Canedo-Marroquín, G., Acevedo-Acevedo, O., Rey-Jurado, E., Saavedra, J. M., Lay, M. K., Bueno, S. M., ... Kalergis, A. M. (2017). Modulation of Host Immunity by Human Respiratory Syncytial Virus Virulence Factors: A

-
-
- Synergic Inhibition of Both Innate and Adaptive Immunity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 367.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00367>
- Carromeu, C., Simabuco, F. M., Tamura, R. E., Farinha Arcieri, L. E., & Ventura, A. M. (2007). Intracellular localization of human respiratory syncytial virus L protein. *Archives of Virology*, 152(12), 2259–2263.
<https://doi.org/10.1007/s00705-007-1048-4>
- Cartee, T. L., & Wertz, G. W. (2002). Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Requires Phosphorylation for Efficient Function and Binds Viral RNA during Infection. *Journal of Virology*, 75(24), 12188–12197.
<https://doi.org/10.1128/jvi.75.24.12188-12197.2001>
- Castagné, N., Barbier, A., Bernard, J., Rezaei, H., Huet, J. C., Henry, C., ... Eléouët, J. F. (2004). Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain. *Journal of General Virology*, 85(6), 1643–1653. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79830-0>
- Cespedes, P. F., Bueno, S. M., Ramirez, B. A., Gomez, R. S., Riquelme, S. A., Palavecino, C. E., ... Kalergis, A. M. (2014). Surface expression of the hRSV nucleoprotein impairs immunological synapse formation with T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(31), E3214–E3223.
<https://doi.org/10.1163/156853492X00016>
- Cha, B., Castano, M. E., Wong, T., Pacheco-Lugo, L., San-Juan-Vergara, H., Peeples, M. E., ... Reyes, N. (2011). Cholesterol-Rich Microdomains as Docking Platforms for Respiratory Syncytial Virus in Normal Human Bronchial Epithelial Cells. *Journal of Virology*, 86(3), 1832–1843.
<https://doi.org/10.1128/jvi.06274-11>
- Chatterjee, S., Luthra, P., Esaulova, E., Agapov, E., Yen, B. C., Borek, D. M., ... Leung, D. W. (2017). Structural basis for human respiratory syncytial virus NS1-mediated modulation of host responses. *Nature Microbiology*, 2(June).
<https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.101>
- Collins, P. L., Fearn, R., & Graham, B. S. (2013). Respiratory Syncytial Virus:

-
-
- Virology, Reverse Genetics, and Pathogenesis of Disease (pp. 3–38). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1_1
- Cubie, H. A., Duncan, L. A., Marshall, L. A., & Smith, N. M. (1997). Detection of respiratory syncytial virus nucleic acid in archival postmortem tissue from infants. *Pediatric Pathology & Laboratory Medicine : Journal of the Society for Pediatric Pathology, Affiliated with the International Paediatric Pathology Association*, 17(6), 927–938. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353832>
- Domínguez, O., Martínez, I., Melero, J. A., Lombardía, L., García-Barreno, B., & Herranz, C. (2009). Cultures of HEp-2 cells persistently infected by human respiratory syncytial virus differ in chemokine expression and resistance to apoptosis as compared to lytic infections of the same cell type. *Virology*, 388(1), 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.03.008>
- Esneau, C., Raynal, B., Roblin, P., Brûlé, S., Richard, C.-A., Fix, J., ... Galloux, M. (2019). Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus N 0 -P complex in solution. *Journal of Biological Chemistry*, (33), jbc.RA118.006453. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006453>
- Falsey, A. R., Walsh, E. E., Esser, M. T., Shoemaker, K., Yu, L., & Griffin, M. P. (2019). Respiratory syncytial virus–associated illness in adults with advanced chronic obstructive pulmonary disease and/or congestive heart failure. *Journal of Medical Virology*, 91(1), 65–71. <https://doi.org/10.1002/jmv.25285>
- Fuentes, S., Tran, K. C., Luthra, P., Teng, M. N., & He, B. (2007). Function of the Respiratory Syncytial Virus Small Hydrophobic Protein. *Journal of Virology*, 81(15), 8361–8366. <https://doi.org/10.1128/JVI.02717-06>
- Gaona, J., Santiago-Olivares, C., Ortega, E., & Gómez, B. (2014). Respiratory Syncytial Virus Persistence in Macrophages Upregulates Fcγ Receptors Expression. *Viruses*, 6, 624–639. <https://doi.org/10.3390/v6020624>
- Garcia, J., García-Barreno, B., Martinez, I., & Melero, J. A. (1993). Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: Formation of inclusion

-
-
- bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22k protein. *Virology*, 195(1), 243–247. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1366>
- Ghildyal, R., Baulch-Brown, C., Mills, J., & Meanger, J. (2003). The matrix protein of Human respiratory syncytial virus localises to the nucleus of infected cells and inhibits transcription Brief Report. *Arch Virol*, 148, 1419–1429. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0112-y>
- Ghildyal, R., Ho, A., & Jans, D. A. (2006). Central role of the respiratory syncytial virus matrix protein in infection. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(5), 692–705. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00025.x>
- Ghildyal, R., Ho, A., Wagstaff, K. M., Dias, M. M., Barton, C. L., Jans, P., ... Jans, D. A. (2005). Nuclear import of the respiratory syncytial virus matrix protein is mediated by importin β 1 independent of importin α . *Biochemistry*, 44(38), 12887–12895. <https://doi.org/10.1021/bi050701e>
- Guo, R., Shang, P., Carrillo, C. A., Sun, Z., Lakshmanappa, Y. S., Yan, X., ... Fang, Y. (2018). Double-stranded viral RNA persists in vitro and in vivo during prolonged infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, 524(August), 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.08.006>
- Homaira, N., & Briggs, N. (2018). Association of age at first severe RSV disease with subsequent risk of severe asthma: a population-based cohort study. *Infectious Diseases Society of America*. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery188/4999155>
- Isaia, G., Teodosiu, O., Popescu, G., Athanasiu, P., Sternberg, I., & Dumitriu, Z. (1985). Persistence of viruses in the nasopharynx of apparently healthy children aged 0-5 years. Results of investigations performed in 1982-83. *Virologie*, 36(3), 175–179. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3000066>
- Johnson, S. M., McNally, B. A., Ioannidis, I., Flano, E., Teng, M. N., Oomens, A. G., ... Peeples, M. E. (2015). Respiratory Syncytial Virus Uses CX3CR1 as a Receptor on Primary Human Airway Epithelial Cultures. *PLoS Pathogens*,

11(12), e1005318. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005318>

- Junge, S., Nokes, D. J., Simões, E. A. F., & Weber, M. W. (2016). Respiratory Syncytial Virus. *International Encyclopedia of Public Health*, 6, 337–346. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00384-2>
- Kane, M., & Golovkina, T. (2010). Common Threads in Persistent Viral Infections. *Journal of Virology*, 84(9), 4116–4123. <https://doi.org/10.1128/JVI.01905-09>
- Kokturk, N., Bozdayi, G., Yilmaz, S., Doğan, B., Gulbahar, O., Rota, S., & Tatlicioglu, T. (2015). Detection of adenovirus and respiratory syncytial virus in patients with chronic obstructive pulmonary disease: Exacerbation versus stable condition. *Molecular Medicine Reports*, 12(2), 3039–3046. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3681>
- Latorre, V., Mattenberger, F., & Geller, R. (2018). Chaperoning the Mononegavirales: Current Knowledge and Future Directions. <https://doi.org/10.3390/v10120699>
- Lay, M. K., González, P. A., León, M. A., Céspedes, P. F., Bueno, S. M., Riedel, C. A., & Kalergis, A. M. (2013). Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response. *Microbes and Infection*, 15(3), 230–242. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.11.012>
- Lifland, A. W., Jung, J., Alonas, E., Zurla, C., Crowe, J. E., & Santangelo, P. J. (2012). Human Respiratory Syncytial Virus Nucleoprotein and Inclusion Bodies Antagonize the Innate Immune Response Mediated by MDA5 and MAVS. *Journal of Virology*, 86(15), 8245–8258. <https://doi.org/10.1128/JVI.00215-12>
- Lim, R. Y. H., Aebi, U., & Fahrenkrog, B. (2008). Towards reconciling structure and function in the nuclear pore complex, 105–116. <https://doi.org/10.1007/s00418-007-0371-x>
- Ling, Z., Tran, K. C., & Teng, M. N. (2009). Human Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Protein NS2 Antagonizes the Activation of Beta Interferon Transcription by Interacting with RIG-I. *Journal of Virology*, 83(8), 3734–3742. <https://doi.org/10.1128/jvi.02434-08>

-
-
- Long, X., Li, Y., Yang, M., Huang, L., & Gong, W. (2016). BZLF1 Attenuates Transmission of Inflammatory Paracrine Senescence in Epstein-Barr Virus-Infected Cells by Downregulating TNF α . *Journal of Virology*, *90*, 7880–7893. <https://doi.org/10.1128/JVI.00999-16>
- Lopez, C. B. (2014). Defective Viral Genomes: Critical Danger Signals of Viral Infections. *Journal of Virology*, *88*(16), 8720–8723. <https://doi.org/10.1128/JVI.00707-14>
- López, C. B., & Hermesh, T. (2011). Systemic responses during local viral infections: Type I IFNs sound the alarm. *Current Opinion in Immunology*, *23*(4), 495–499. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.06.003>
- Manzoni, T. B., & López, C. B. (2018). Defective (interfering) viral genomes re-explored: Impact on antiviral immunity and virus persistence. *Future Virology*, *13*(7), 493–503. <https://doi.org/10.2217/fvl-2018-0021>
- Martín-Acebes, M. A., & Herrera, M. (2010). Cell density-dependent expression of viral antigens during persistence of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology*, *403*(1), 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.04.005>
- Marty, A., Meanger, J., Mills, J., Shields, B., & Ghildyal, R. (2004). Association of matrix protein of respiratory syncytial virus with the host cell membrane of infected cells. *Archives of Virology*, *149*(1), 199–210. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0183-9>
- Mejías, A., Chávez-Bueno, S., Gómez, A. M., Somers, C., Estripeaut, D., Torres, J. P., ... Ramilo, O. (2008). Respiratory syncytial virus persistence: evidence in the mouse model. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, *27*(10 Suppl), S60-2. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181684d52>
- Nair, H., Nokes, D. J., Gessner, B. D., Dherani, M., Madhi, S. A., Singleton, R. J., ... Campbell, H. (2010). Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, *375*(9725), 1545–1555. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60206-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60206-1)
- Nakamura, L, Y., Villegas. S, N., & Gómez, B. (2015). RSV P-protein impairs extrinsic apoptosis pathway in a macrophage-like cell line persistently

-
-
- infected with respiratory syncytial virus. *Virus Research*, 204, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.04.018>
- Noton, S. L., & Fearn, R. (2015). Initiation and regulation of paramyxovirus transcription and replication. *Virology*, 479–480, 545–554. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.014>
- Oldstone, M. B. A. (2009). Anatomy of viral persistence. *PLoS Pathogens*, 5(7), 5–8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000523>
- Pathak, K. B., & Nagy, P. D. (2009). Defective interfering RNAs: Foes of viruses and friends of virologists. *Viruses*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/v1030895>
- Randall, R. E., & Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: An interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology*, 89(1), 1–47. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83391-0>
- Randall, R. E., & Griffin, D. E. (2017). Within host RNA virus persistence: mechanisms and consequences. *Current Opinion in Virology*, 23(August), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.03.001>
- Rincheval, V., Lelek, M., Gault, E., Bouillier, C., Sitterlin, D., Blouquit-Laye, S., ... Rameix-Welti, M. A. (2017). Functional organization of cytoplasmic inclusion bodies in cells infected by respiratory syncytial virus. *Nature Communications*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00655-9>
- Rivera-Toledo, E., Torres-González, L., & Gómez, B. (2015). Respiratory syncytial virus persistence in murine macrophages impairs IFN- β response but not synthesis. *Viruses*, 7(10), 5361–5374. <https://doi.org/10.3390/v7102879>
- Romero Valdovinos, M., & Gómez, B. (2003). Establishment of respiratory syncytial virus persistence in cell lines: Association with defective interfering particles. *Intervirology*, 46(3), 190–198. <https://doi.org/10.1159/000071461>
- Sakamoto, K., Arroyo-Diaz, N. M., Abraham, M., He, B., Li, Z., & Zengel, J. (2018). Role of Small Hydrophobic Protein of J Paramyxovirus in Virulence.

Journal of Virology, 92(20). <https://doi.org/10.1128/jvi.00653-18>

- Sarmiento, R. E., Tirado, R., & Gómez, B. (2002). Characteristics of a respiratory syncytial virus persistently infected macrophage-like culture. *Virus Research*, 84(1–2), 45–58. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(01\)00420-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(01)00420-8)
- Sigurs, N., Aljassim, F., Kjellman, B., Robinson, P. D., Sigurbergsson, F., Bjarnason, R., & Gustafsson, P. M. (2010). Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life. *Thorax*, 65(12), 1045–1052. <https://doi.org/10.1136/thx.2009.121582>
- Simões, E. A. F., & Liu, A. H. (2018). RSV prevention in infancy and asthma in later life. *The Lancet Respiratory Medicine*, 6(7). [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30230-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30230-3)
- Spann, K. M., Tran, K. C., & Collins, P. L. (2005). Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines. *J Virol*, 79(9), 5353–5362. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.9.5353-5362.2005>
- Sun, Y., Jain, D., Koziol-White, C. J., Genoyer, E., Gilbert, M., Tapia, K., ... López, C. B. (2015). Immunostimulatory Defective Viral Genomes from Respiratory Syncytial Virus Promote a Strong Innate Antiviral Response during Infection in Mice and Humans. *PLoS Pathogens*, 11(9), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005122>
- Sun, Y., & López, C. B. (2016). Preparation of Respiratory Syncytial Virus with High or Low Content of Defective Viral Particles and Their Purification from Viral Stocks. *Bio-Protocol*, 6(10), 1–15.
- Tan, Y. R., Peng, D., Chen, C. M., & Qin, X. Q. (2013). Nonstructural protein-1 of respiratory syncytial virus regulates HOX gene expression through interacting with histone. *Molecular Biology Reports*, 40(1), 675–679. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2107-9>
- Tayyari, F., Marchant, D., Moraes, T. J., Duan, W., Mastrangelo, P., & Hegele, R. G. (2011). Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nature Medicine*, 17(9), 1132–1135. <https://doi.org/10.1038/nm.2444>

-
-
- Uttley, T. J., Ducharme, N. A., Varthakavi, V., Shepherd, B. E., Santangelo, P. J., Lindquist, M. E., ... Crowe, J. E. (2008). Respiratory syncytial virus uses a Vps4-independent budding mechanism controlled by Rab11-FIP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(29), 10209–10214. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712144105>
- Van Drunen Littel-Van Den Hurk, S., & Watkiss, E. R. (2012). Pathogenesis of respiratory syncytial virus. *Current Opinion in Virology*, *2*(3), 300–305. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.01.008>
- Varfolomeev, E., & Vucic, D. (2016). Cytokine Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine*, *1*, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.08.035>
- Virgin, H. W., Wherry, E. J., & Ahmed, R. (2009). Review Redefining Chronic Viral Infection. *Cell*, *138*, 30–50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.036>
- Wong-Chew, R. M., García-León, M. L., Noyola, D. E., Perez Gonzalez, L. F., Gaitan Meza, J., Vilaseñor-Sierra, A., ... Santos-Preciado, J. I. (2017). Respiratory viruses detected in Mexican children younger than 5 years old with community-acquired pneumonia: a national multicenter study. *International Journal of Infectious Diseases*, *62*, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.06.020>
- Xu, J., Sun, Y., Li, Y., Ruthel, G., Weiss, S. R., Raj, A., ... López, C. B. (2017). Replication defective viral genomes exploit a cellular pro-survival mechanism to establish paramyxovirus persistence. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00909-6>
- Yu, X., Lan, P., Hou, X., Han, Q., Lu, N., Li, T., ... Jian Zhang, Cai Zhang, Z. T. (2016). HBV Inhibits LPS-induced NLRP3 Inflammasome Activation and IL-1 β Production via Suppressing NF- κ B Pathway and ROS Production. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.12.018>

XIII. ANEXOS

A1. Densidad de las fracciones de sacarosa negativas para proteínas virales

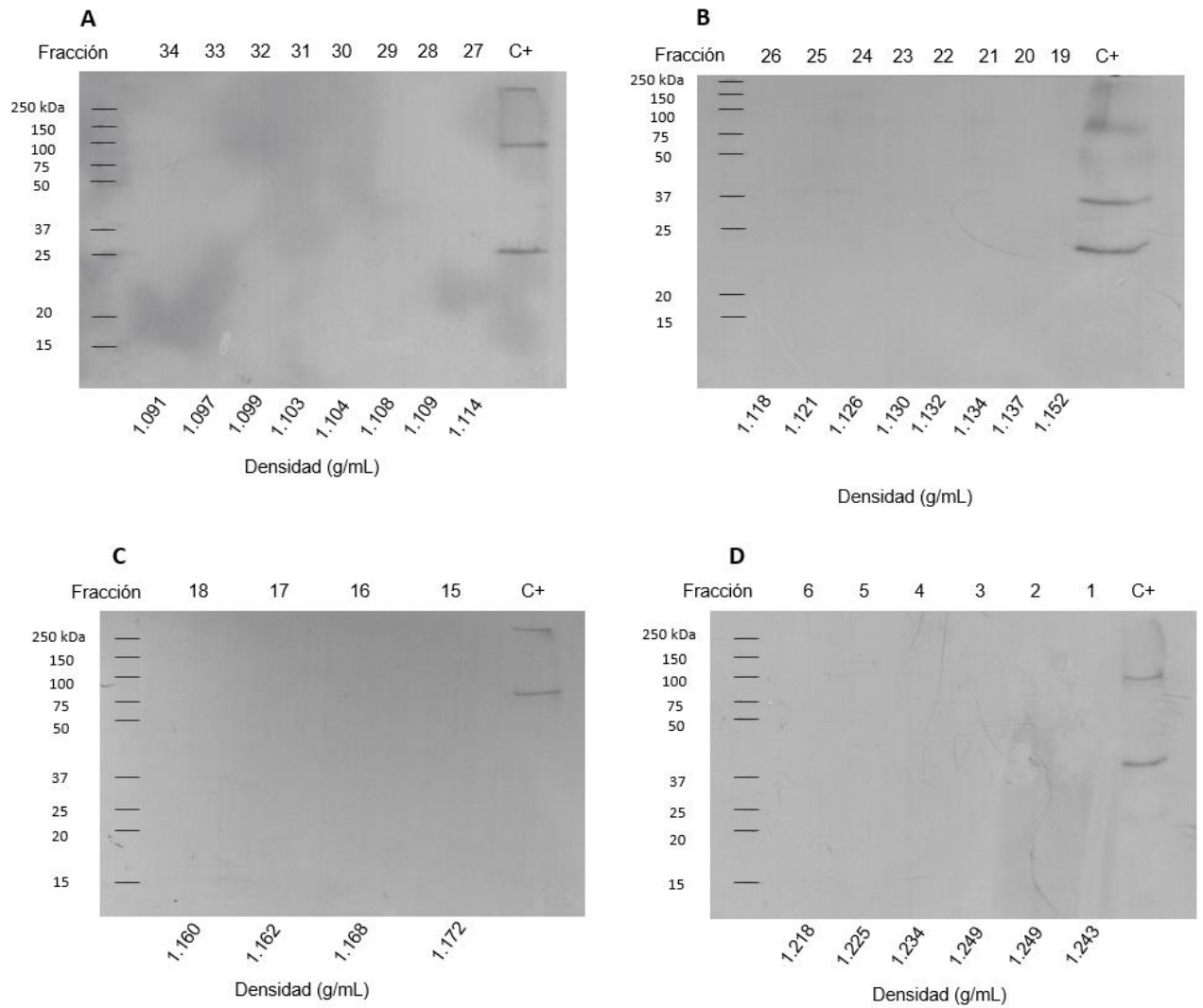


Figura 13. Fracciones de sacarosa obtenidas a partir del sobrenadante control (SN-HEp-2) que no mostraron proteínas virales. A) Fracciones 34–27, B) Fracciones 26–19, C) Fracciones 18–15, y D) Fracciones 6–1.

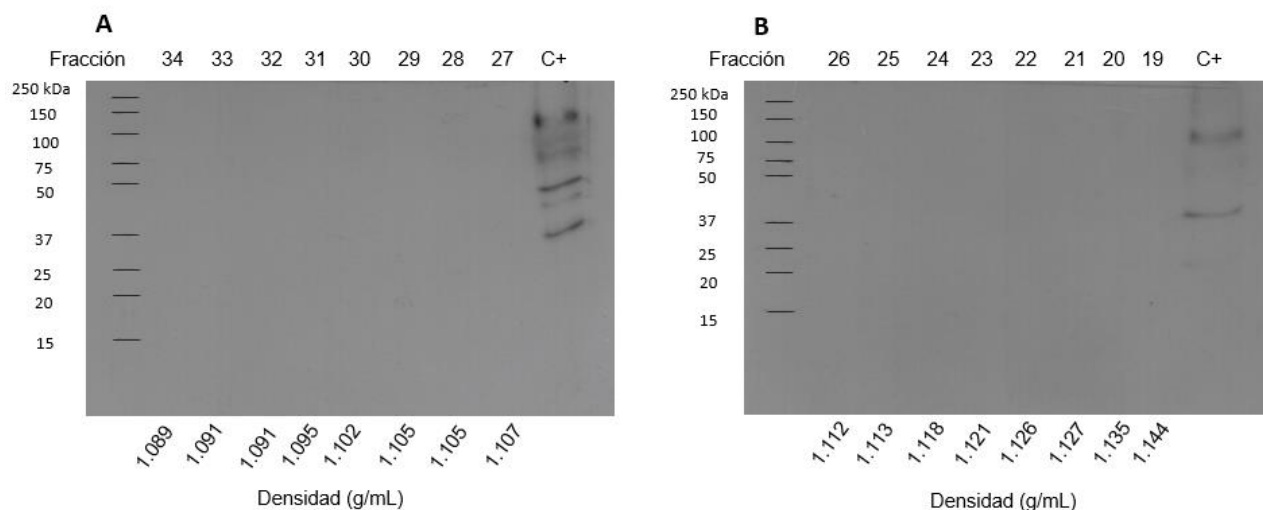


Figura 14. Fracciones de sacarosa obtenidas a partir del sobrenadante del cultivo persistente pase 100 (SN-M ϕ P₁₀₀) que no mostraron proteínas virales. A) Fracciones 34–27, y B) Fracciones 26–19.

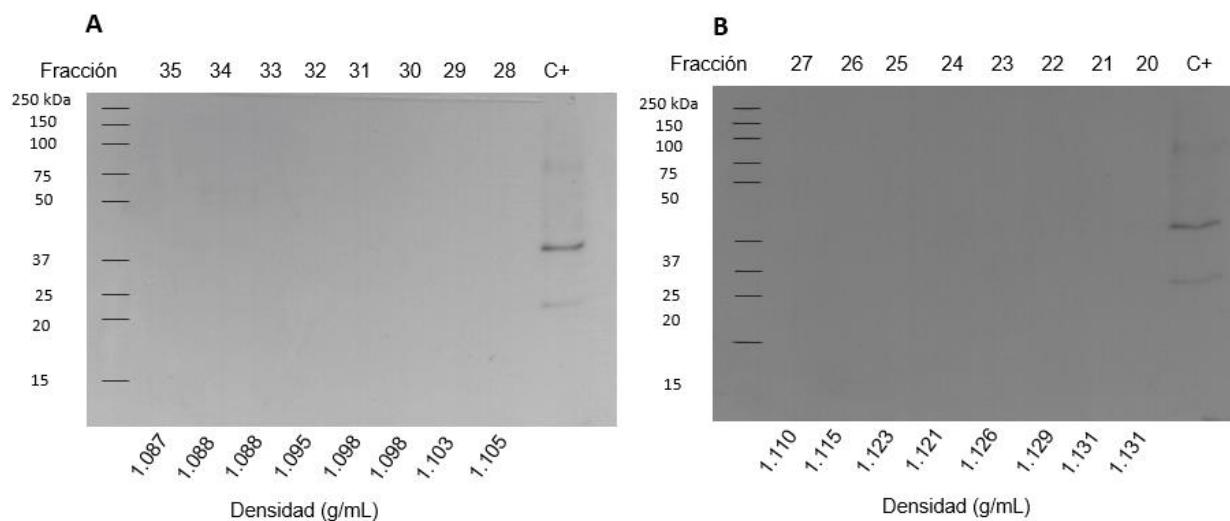


Figura 15. Fracciones de sacarosa obtenidas a partir del sobrenadante del cultivo persistente pase 107 (SN-M ϕ P₁₀₇) que no mostraron proteínas virales. A) Fracciones 35–28, y B) Fracciones 27–20.

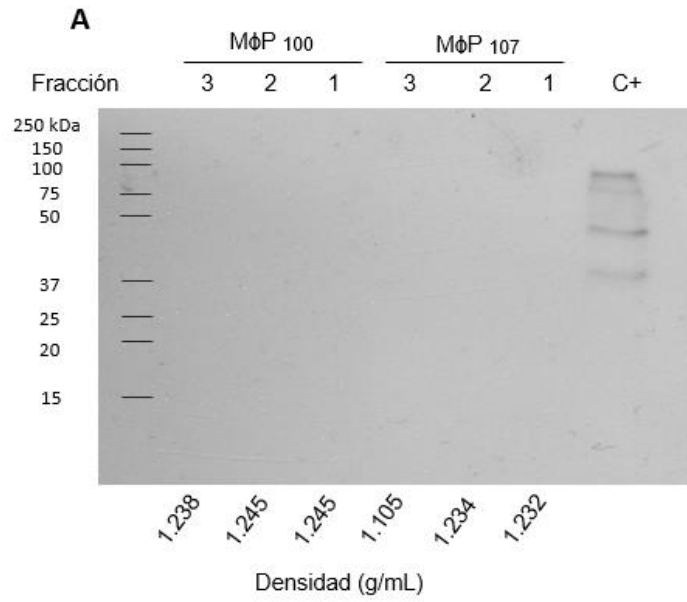


Figura 16. Fracciones de sacarosa obtenidas a partir de los sobrenadante de los cultivos persistentes pases 100 y 107 (SN-MφP₁₀₀ y SN-MφP₁₀₇) que no mostraron proteínas virales.

A2. Reactivos y soluciones

- PBS 1X

NaCl (J.T Baker) 138 mM

KCl (J.T Baker) 3 mM

Na₂HPO₄ (J.T Baker) 7 mM

KH₂PO₄ (J.T Baker) 1.5 mM

d H₂O c.b.p 1,0 L

Ajustar pH a 7.4

- Paraformaldehído al 4%

Paraformaldehído (Sigma) 4 g

PBS 1X 100 mL

Preparar en campana de extracción: calentar hasta ebullición, agitar hasta disolver y filtrar. Congelar a -20 c hasta su uso.

- Saponina al 0.3%

Saponina (Sigma) 0.03 g

dH₂O c.b.p 10 mL

- Cristal violeta

-Solución stock de cristal violeta 1%

Cristal violeta (Sigma) 1 g

Etanol absoluto (J.T Baker) 20 mL

dH₂O 80 mL

-Solución de trabajo de cristal violeta

Solución stock de cristal violeta 1% 20 mL

Metanol absoluto (J.T Baker) 40 mL

dH₂O 90 mL

Almacenar a temperatura ambiente

- Buffer A para fraccionamiento celular

MgCl₂ (J.T Baker) 1.5 mM

KCl (J.T Baker) 10 mM

DTT (Roche) 0.5 mM

Igepal 0.5%

Disolver y llevar al aforo con HEPES (Sigma) 10 mM pH 7.9

Almacenar a 4°C

Adicionar inhibidor de proteasas complete 1X (Roche) previo a su uso

- Buffer de lavado para fraccionamiento celular

NaCl (J.T Baker) 10 mM

MgCl₂ (J.T Baker) 3 mM

Disolver y llevar al aforo con HEPES (Sigma) 10 mM pH 7.9

Almacenar a 4°C

Adicionar inhibidor de proteasas complete 1X (Roche) previo a su uso

- Buffer B para fraccionamiento celular

MgCl₂ (J.T Baker) 1.5 mM

EDTA (Sigma) 0.2 mM

DTT (Roche) 0.5 mM

Glicerol (MP Biomedicals) 25%

Disolver y llevar al aforo con HEPES (Sigma) 5 mM pH 7.9

Almacenar a 4°C

Adicionar inhibidor de proteasas complete 1X (Roche) previo a su uso

- Buffer Laemmli 2X y 5X

SDS 4%

Glicerol 20% mL

Azul de bromofenol 0.004 %

Tris-base pH 6.8 125 mM

dH₂O c.b.p

Al preparar el buffer de Laemmli 5X, reducir el volumen de H₂O a un quinto.

-
-
- Buffer de transferencia SemiDry
- | | |
|---------------------------|--------|
| Glicina (Bio-Rad) | 192 mM |
| Tris-base (Merck) | 25 mM |
| MeOH absoluto (J.T Baker) | 20% |
| dH ₂ O c.b.p | 1L |

- TBS 1X
- | | |
|-------------------------|--------|
| Tris-base (Merck) | 50 mM |
| NaCl (J.T Baker) | 150 mM |
| dH ₂ O c.b.p | 1,0 L |
- Ajustar pH a 7.6

- TBS 1X –Tween 0.1%
- | | |
|-------------------------|--------|
| TBS1X | 990 mL |
| Tween 20 (Amresco) | 100 uL |
| dH ₂ O c.b.p | 1L |

- Solución de bloqueo
- | | |
|-----------------|--------|
| Leche sin grasa | 5 % |
| TBS 1X-Tween | 100 mL |

- Buffer para despegar anticuerpos
- | | |
|-------------------------|-------|
| SDS (Bio-Rad) | 69 mM |
| Tris-base (Merck) | 62 mM |
| pH | 6.8 |
| dH ₂ O c.b.p | 1,0 L |

Almacenar a temperatura ambiente

Adicionar 105 µL de β-mercaptoetanol por cada 15 mL de buffer antes de su uso

- Sacarosa al 18% o 0.5 M
KCl (J.T Baker) 20 mM
Tris-base (Merck) 15 mM
Ajustar pH a 7.4
 $\delta=1.07$ g/mL

- Sacarosa al 60% o 2.2 M
KCl (J.T Baker) 20 mM
Tris-base (Merck) 15 mM
Ajustar pH a 7.4
 $\delta=1.286$ g/mL

- Geles de acrilamida 12%, 1.5 mm:

| | Gel concentrador | Gel separador |
|-----------------|------------------|---------------|
| | Para 1 gel | Para 1 gel |
| Agua destilada | 3.075 mL | 3.4 mL |
| Tris 0.5 M, 6.8 | 1.25 mL | 2.5 mL |
| SDS 10% | 25 μ L | 50 μ L |
| Acrilamida 30% | 670 mL | 4 mL |
| Persulfato 10% | 25 μ L | 50 μ L |
| TEMED (Bio-Rad) | 5 μ L | 5 μ L |

- Tris 1.5 M
Tris-base (Merck) 18.2 g
Ajustar pH a 8.8
dH₂O c.b.p 100 mL

- Tris 0.5 M
Tris-base (Merck) 6.0 g
dH₂O c.b.p 100 mL
Ajustar pH a 6.8

- SDS 10%

| | |
|-------------------------|--------|
| SDS (Bio-Rad) | 10 g |
| dH ₂ O c.b.p | 100 mL |

- Acrilamida al 30%

| | |
|-------------------------|--------|
| Acrilamida (Sigma) | 29.2 g |
| Bis-acrilamida (Sigma) | 0.8 g |
| dH ₂ O c.b.p | 100 mL |

- Persulfato 10%

| | |
|--------------------------------|-------|
| Persulfato de amonio (Bio-Rad) | 0.1 g |
| dH ₂ O c.b.p | 1 mL |

A3. Patrón de distribución de bandas para la identificación de proteínas del RSV en Western blot.

| Proteína | Tamaño (aa) | Peso (kDa) |
|----------|-------------|------------|
| NS1 | 124 | 22 |
| NS2 | 139 | 18 |
| N | 391 | 43 |
| P | 241 | 34 |
| M | 256 | 28 |
| SH | 64 | 7.5 - 3.0 |
| G | 298 | 90 |
| F | 574 | 70 |
| F1 | 136 | 45 |
| M2-1 | 194 | 22 |
| M2-2 | 90 | 11 |
| L | 2165 | 250 |

Tomada y modificada de (Brown et al., 2010; Ghildyal et al., 2006)