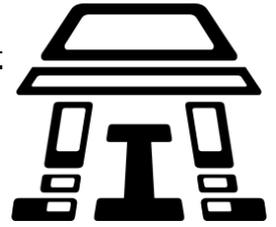




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EVALUACIÓN DEL PROGRESO DEL CICLO CELULAR DE
MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS PERSISTENTEMENTE
CON EL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

GUILLERMO ANTONIO SOSA ANDRADE

DIRECTORA: DRA. BEATRIZ GÓMEZ GARCÍA



LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA DE BAZ, ESTADO DE MÉXICO

OCTUBRE 2016



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Vivimos en una sociedad profundamente dependiente de la ciencia y la tecnología y en la que nadie sabe de estos temas.

Ello constituye una fórmula segura para el desastre.

Carl Sagan (1934-1996).

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Virología a cargo de la Dra. Beatriz Gómez García, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, con clave y título: IN218916, la persistencia del virus sincitial respiratorio en macrófagos altera el perfil de expresión de genes celulares. Agradecemos a la DGAPA-UNAM por la beca otorgada.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos especiales a mis padres, hermanos y otros familiares por su apoyo, consejos y paciencia. A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de crecer intelectualmente a través de una licenciatura y por el apoyo otorgado a lo largo de mis estudios.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) y al programa de becas de titulación para proyectos de investigación a egresados de alto rendimiento 2015-2016, gracias por el apoyo otorgado para la finalización de mis estudios.

A la Dra. Beatriz Gómez García y al futuro Dr. Carlos Alberto Santiago Olivares, por permitirme emprender este trabajo y por su apoyo, orientación, dedicación y atención a lo largo del proyecto.

Al Dr. Sergio Vaca Pacheco, Dr. Santiago Martínez Calvillo & a la Dra. Yolanda Irasema Chirino López por su atención y dedicación al realizar las revisiones, y por todos los autógrafos que me brindaron durante el progreso del trámite.

A la Dra. Evelyn Rivera Toledo & a la Dra. Elizabeth Castillo Villanueva del laboratorio de virología, por su atención, críticas y opiniones; además, agradecimientos a nuestro técnico en laboratorio por su excelente trabajo.

A Becton Dickinson Biociencias México & CCA y al Capítulo de Citometría de Flujo de la Sociedad Mexicana de Inmunología, por el simposio y los talleres en aplicaciones en citometría de flujo.

DEDICATORIAS

Dedicado a mis padres, gracias por haberme protegido lo suficiente para sobrevivir y darme la libertad necesaria para equivocarme.

A todos los profesores de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y de la Facultad de Ciencias de la UNAM, sin sus conocimientos, experiencias y talento, gran parte de la juventud de nuestro país estaría pérdida.

A los compañeros y amigos del grupo 04, quienes con su amistad y elocuencia hicieron las interminables horas de clase y aprendizaje más interesantes y divertidas.

A todos aquellos valientes y apasionados que emprenden con gran valor esta aventura sin fin a la que llamamos ciencia.

ÍNDICE

	Página
1. Índice de figuras.....	1
2. Abreviaturas.....	3
3. Resumen.....	7
4. Introducción.....	8
4.1 Virus sincitial respiratorio humano.....	8
4.1.1 Clasificación.....	8
4.1.2 Genoma.....	8
4.1.3 Proteínas.....	9
4.1.3.1 Proteínas no estructurales NS1 y NS2.....	10
4.1.3.2 Nucleoproteína N.....	10
4.1.3.3 Fosfoproteína P.....	10
4.1.3.4 Proteína de matriz M.....	11
4.1.3.5 Proteína SH o pequeña hidrofóbica.....	11
4.1.3.6 Glicoproteína G.....	12
4.1.3.7 Proteína de fusión F.....	12
4.1.3.8 Proteína M2-1.....	12
4.1.3.9 Proteína M2-2.....	13
4.1.3.10 Proteína L.....	13
4.1.4 Virión.....	13
4.1.5 Ciclo de replicación.....	14
4.1.5.1 Anclaje y entrada del virión.....	14
4.1.5.2 Síntesis del genoma y transcripción de mRNAs virales.....	15
4.1.5.3 Ensamblaje y liberación del virión.....	16
4.1.6 Epidemiología.....	18
4.1.7 Evolución y tropismo.....	19
4.1.8 Patogénesis.....	20
4.1.9 Respuesta inmune.....	20
4.1.10 Profilaxis y vacunas.....	21
4.2 Persistencia viral.....	21
4.2.1 El fenómeno de persistencia en HRSV.....	22
4.2.2 Modelos de persistencia del HRSV <i>in vivo</i>	23
4.2.3 Modelos de persistencia del HRSV <i>in vitro</i>	23
4.3 Ciclo Celular.....	23
4.3.1 Sistema de control del ciclo celular.....	24
4.3.1.1 Cinasas dependientes de ciclinas.....	25
4.3.1.2 Familia de proteínas <i>pocket</i>	26
4.3.1.3 Puntos de control y señales de daño al DNA.....	26
4.3.1.4 Familia de cinasas PIKK.....	26
4.3.1.5 Cinasa Chk1 y Chk2.....	27
4.3.1.6 Complejo promotor de la anafase o ciclosoma.....	27
4.3.1.7 Cinasas <i>Polo-like</i>	28
4.3.1.8 Cinasas Aurora.....	28

4.3.2 Fases del ciclo celular eucarionte.....	28
4.3.2.1 Fase <i>G0/G1</i>	29
4.3.2.2 Fase de síntesis <i>S</i>	29
4.3.2.3 Fase <i>G2</i>	30
4.3.2.4 Mitosis <i>M</i>	31
4.3.2.4.1 Ruptura de la membrana nuclear y montaje del uso mitótico.....	32
4.3.2.4.2 Separación de los cromosomas.....	33
4.3.2.4.3 <i>Citocinesis</i>	33
4.4 Subversión del ciclo celular durante infecciones virales.....	35
5. Antecedentes.....	36
6. Justificación.....	37
7. Hipótesis.....	37
8. Objetivos.....	37
8.1 General.....	37
8.2 Particulares.....	37
9. Materiales y métodos.....	37
9.1 Líneas celulares.....	37
9.2 Detección del antígeno viral HRSV.....	38
9.3 Análisis del ciclo celular.....	38
9.4 Evaluación de la proliferación celular.....	39
9.5 Análisis estadístico.....	39
10. Resultados.....	40
10.1 Antígeno viral HRSV.....	40
10.2 Ciclo celular.....	40
10.3 Proliferación.....	44
11. Discusión.....	47
12. Conclusiones.....	53
13. Perspectivas.....	54
14. Referencias.....	54

1. Índice de figuras

	Página
Figura 1 Diagrama del genoma y antigenoma de HRSV.....	9
Figura 2 (a) Representación gráfica de la estructura y organización del virión de HRSV.....	14
Figura 2 (b) Tomografías del virión de HRSV.....	14
Figura 3 Representación gráfica del anclaje del virión y hemifusión de la envoltura de HRSV con la membrana plasmática de AECs.....	15
Figura 4 Esquema general del ciclo de replicación de HRSV.....	17
Figura 5 (a) Muestreo estacional de los sujetos con ITR.....	18
Figura 5 (b) Individuos con ITR positivos para virus respiratorios y los agentes virales identificados como responsables.....	18
Figura 6 Esquema del ciclo celular eucarionte y etapas en las que se ha subdividido la fase <i>M</i> del ciclo celular.....	34
Figura 7 (a) Histograma del análisis de antígeno viral HRSV aplicado a M ϕ N.....	40
Figura 7 (b) Histograma del análisis de antígeno viral HRSV aplicado a M ϕ P.....	40
Figura 8 Histogramas del análisis por citometría de flujo del ciclo celular de M ϕ N y M ϕ P de un ensayo representativo.....	42
Figura 9 Histogramas representando el total del porcentaje de células de M ϕ N y M ϕ P en las fases <i>G0/G1</i> , <i>S</i> y <i>G2/M</i> del ciclo celular.....	43
Figura 10 Fotografías a 100X de la confluencia relativa de M ϕ N y M ϕ P observada durante la experimentación.....	44

Figura 11 (a)	Histogramas de la distribución hipotética de la fluorescencia de CFSE de M ϕ N y M ϕ P en el transcurso de la experimentación.....	45
Figura 11 (b)	Plot de contorno de las generaciones obtenidas mediante el análisis de dilución de CFSE.....	45
Figura 12 (a)	Intensidad media de fluorescencia relativa para CFSE de cada generación de M ϕ N y M ϕ P.....	46
Figura 12 (b)	Total de células e índices de proliferación y división de M ϕ N y M ϕ P.....	46

2. Abreviaturas

7-AAD	7-aminoactinomycin D
AECs	Células epiteliales del tracto respiratorio
AHR	Hiperreactividad en las vías respiratorias
APC/C	Complejo promotor de la anafase o ciclosoma
ATP	Adenosín trifosfato
BMSC	Células estromales de médula ósea
BVD	Virus de la enfermedad de borna
CAK	Cinasa Cdk-activando
Cdks	Cinasas dependientes de ciclinas
CFDA-SE	Diacetato de carboxifluoresceína succinimidil éster
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil éster
CI	Complejo I de la maquinaria productora de ATP de la cadena respiratoria
CK2	Proteína celular caseína cinasa II
CKIs	Proteínas inhibidoras de Cdks
CRM	Señal de retención citoplasmática
DC-SIGN	Molécula de adhesión específica de células dendríticas
Di	Índice de división
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ESCRT	Sorteo de complejos endosomales
FBS	Suero fetal bovino
Fcγ	Receptor Fc-gamma
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FKN	Receptor de la fractalkina CX3C quimiocina fractalkina
FLNa	Proteína de entrecruzamiento Filamin-A

GAGs	Glicosaminoglicanos
GE	Secuencia de término de un gen de HRSV
Ge0	Población precursora
GM1	Gangliósidos-1
GS	Secuencia de inicio de un gen de HRSV
HBEpC	Cultivos primarios de células del epitelio bronquial humano
HIV	Virus de la inmunodeficiencia
HPV	Virus del papiloma humano
HRSV	Virus sincitial respiratorio humano
IBs	Cuerpos de inclusión citoplasmáticos
IC	Inhibición por contacto
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IFANR	Receptor interferón α/β
IFN	Interferón
INM	Proteínas de la membrana nuclear interna
ITR	Infección aguda del tracto respiratorio
Le	Secuencia líder del genoma de HRSV
LRTI	Enfermedades respiratorias del tracto inferior
MϕN	Línea celular murina P388D1 sin infectar
MϕP	Línea celular murina P388D1 infectada con HRSV
MAPK	Vía de señalización de proteínas cinasas mitógeno-activado
MCM	Complejos de DNA helicasas
MeV	Virus del sarampión
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MOI	Multiplicidad de infección
MRN	Complejo Mre11/Rad50/Nbs1
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero

NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas
NHBE	Células del epitelio bronquial humano
NPC	Componentes del complejo del poro nuclear
ORC	Complejo de reconocimiento del origen
ORF	Marco de lectura abierto
PAMPs	Patrones asociados a patógenos
PBS	Buffer de fosfato salino
Pi	Índice de proliferación
PI3K	Proteínas celular Fosfoinositol 3 kinasa
Plks	Cinasas <i>Polo-like</i>
pRb	Proteína del retinoblastoma
preRC	Complejos pre-replicativos
PRRs	Receptores de reconocimiento
RdRp	Complejo RNA polimerasa dependiente de RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsas	Ribonucleasa
RPA	Proteína de replicación A
SAC	Punto de control de montaje del huso
ssDNA	huecos de una sola hebra en el ácido desoxirribonucleico
SV5	Virus de los simios 5
TGEV	Virus de la gastroenteritis transmisible
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TLR	Receptores tipo toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tr	Secuencia extragénica del extremo 5' del genoma de HRSV denominada trailer

TrC	Región complementaria trailer del extremo 3' del antígenoma de HRSV
URTI	Enfermedades respiratorias del tracto superior
VPH	Virus del papiloma humano
ZBD	Dominio de unión a zinc

3. Resumen

A nivel mundial el virus sincitial respiratorio humano (HRSV) es considerado como el agente etiológico más común en enfermedades del tracto respiratorio en infantes y pacientes inmunocomprometidos, produciendo a largo plazo, enfermedades respiratorias crónicas que han sido asociadas con la posible persistencia del virus. Con el fin de establecer una infección persistente, los virus modifican el progreso del ciclo celular y evaden la respuesta inmune de células especializadas, como neuronas, linfocitos y macrófagos. Debido a esto, el presente trabajo se enfocó en evaluar el progreso del ciclo celular de macrófagos murinos P388D1 infectados persistentemente con HRSV. Para cumplir con este objetivo, cultivos de la línea celular murina P388D1 y su variante infectada persistentemente con HRSV se sincronizaron mediante inhibición por contacto; después, fueron sembrados a baja densidad y se extrajeron muestras al momento de la siembra, 24, 48 y 72 horas posteriores a ésta. En seguida, cada muestra fue procesada y teñida con 7-AAD para analizar el progreso de las fases del ciclo celular, y evaluar la proliferación a través de un ensayo basado en la dilución de CFSE. Al momento de la siembra no se identificaron diferencias significativas entre las fases del ciclo celular de ambos grupos y los cultivos presentaron un área relativa similar, sugiriendo que éstos se encontraban sincronizados. Al transcurrir 24, 48 y 72 horas posteriores a la siembra se identificaron altos porcentajes de células en la fase *G2/M* del ciclo celular de macrófagos murinos infectados persistentemente con HRSV, los cuales fueron estadísticamente significativos y se encontraron acompañados de un menor porcentaje de células en la fase *G0/G1* que, en algunas ocasiones igualmente fue estadísticamente significativo. Asimismo, el total de células que originaron de la población precursora y los índices de proliferación y división de la línea celular infectada persistentemente con HRSV, fueron menores en comparación con la línea no infectada, a pesar de esto, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas, sugiriendo que la infección persistente con HRSV prolonga la fase *G2/M* del ciclo celular de macrófagos murinos P388D1, produciendo un decaimiento en la proliferación de la línea celular, aunque estadísticamente no de manera significativa.

4. Introducción

4.1 Virus sincitial respiratorio humano

4.1.1 Clasificación

El virus sincitial respiratorio humano (HRSV) es un virus envuelto de una sola cadena de ácido ribonucleico (RNA) de sentido negativo (3´-5´), pertenece al orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae* y genero *Pneumovirus* (King et al., 2012).

4.1.2 Genoma

El genoma de HRSV consiste de una cadena de RNA de sentido negativo con una longitud variable de 15,191 a 15,226 nucleótidos para las seis sepas que se han secuenciado hasta la fecha. Tanto la forma intercelular del genoma como la contenida en el virión se encuentran fuertemente unidas a la proteína N, creando una nucleocápside resistente a RNAsas y que además funciona para proteger al genoma de la degradación por patrones de reconocimiento del hospedero (Melero, 2007; Collins, 2008; Collins & Karron, 2013).

A lo largo del genoma los genes se encuentran arreglados de forma lineal, HRSV contiene 10 genes en el orden 3´-NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2 y L-5´ que se transcriben secuencialmente en 10 RNAs mensajeros independientes. Cada uno de estos genes tiene una secuencia de inicio (GS) altamente conservada de 9 nucleótidos (3´-CCCCGUUU(A/U), con excepción de L (3´-CCCUGUUUUA), y una de término (GE) moderadamente conservada de 12-13 nucleótidos (3´-UCA(A/U) UN₁₋₄UUUU₄₋₇). Precedente a estas secuencias los genes se encuentran separados por regiones intergénicas que varían de una longitud de 1 a 58 nucleótidos, con excepción de los últimos dos genes, ya que éstos se superponen por aproximadamente 68 nucleótidos (Figura 1), particularmente la señal GS para el gen L se localiza río arriba de la señal GE del gen M2 (Melero, 2007; Collins, 2008; Collins & Karron, 2013).

En el extremo 3´ del RNA viral existe una secuencia líder (Le) de aproximadamente 44 nucleótidos que contiene al promotor de la transcripción del RNA mensajero (mRNA) y el de síntesis del antígeno (Mink et al., 1991); mientras que al final del extremo 5´ se encuentra otra secuencia extragénica de aproximadamente 155 nucleótidos denominada tráiler (Tr) (Figura 1), que es importante para la síntesis del RNA viral e impide la formación de gránulos de estrés en el hospedero celular (Hanley et al., 2010).

Debido a que HRSV contiene un sólo promotor los genes se transcriben como mRNAs monocistronicos. El inicio de la transcripción se da cuando el complejo de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) compuesto por la polimerasa L y su cofactor la fosfoproteína P, reconocen la secuencia GS de un respectivo gen (Lay et al., 2012; Collins & Karron, 2013). Las regiones intergénicas presentes entre cada gen provocan que la polimerasa viral se disocie del templado de la transcripción, causando que los

genes virales se expresen en un gradiente que va del extremo 3' al 5' (Kuo et al., 1996). Así los genes de las proteínas requeridas en abundancia se encuentran en el extremo 3' y los correspondientes a proteínas cuya demanda es menor se localizan próximos o en el extremo 5' (Lay et al., 2012). Los mRNAs de HRSV poseen un cap en su extremo 5', y una cola de poliadenina en el 3'. Cada mRNA de HRSV codifica una sola proteína, a excepción de M2, el cual tiene dos marcos de lectura abiertos (ORFs). El ORF de M2-1 está localizado río arriba del mRNA, mientras que el ORF de M2-2 se localiza río abajo (Figura 1). Este mecanismo alternativo de paro y arranque de los ribosomas genera dos proteínas diferentes M2-1 y M2-2 (Gould & Easton, 2007; Collins, 2008; Lay et al., 2012; Collins & Karron, 2013).

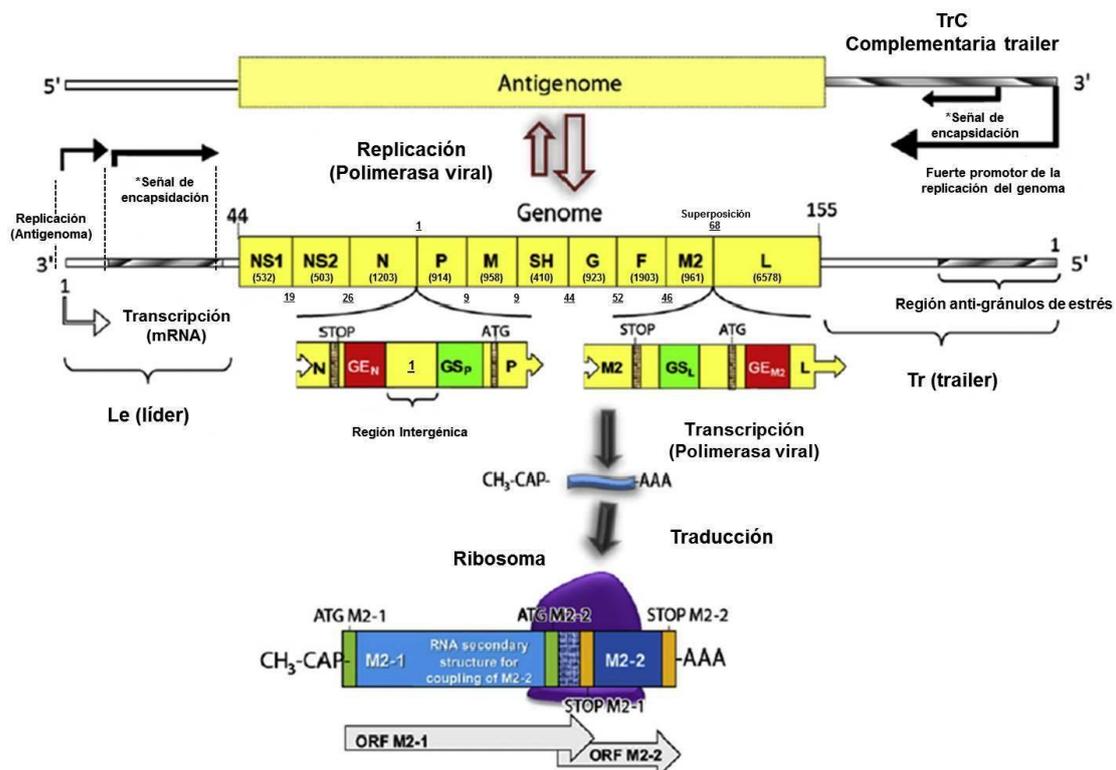


Figura 1: Representación gráfica de la organización del genoma y antígeno de HRSV. Se muestran los 10 genes de HRSV, así como la región líder (Le) y tráiler (Tr) del genoma. En el caso del antígeno se presenta una región complementaria tráiler (TrC). Cada gen se encuentra separado por una secuencia intergénica, los números que aparecen subrayados corresponden a la cantidad aproximada de nucleótidos que conforman cada una de estas respectivas secuencias, aquellos que se encuentran entre paréntesis indican la cantidad aproximada de nucleótidos correspondiente a cada gen. La transcripción del gen M2 involucra un proceso de paro y arranque de los ribosomas, en el que primero se traduce la proteína M2-1, y al terminar con ésta los ribosomas se mueven hacia atrás para traducir M2-2 en el codón de inicio superpuesto en el gen M2-1 (Tomado y modificado de Lay et al., 2012).

4.1.3 Proteínas

En total HRSV codifica 11 proteínas independientes, 9 estructurales y 2 no estructurales (NS1 y NS2). Dentro de las estructurales 4 están asociadas con la nucleocápside (N, P, L y M2-1), 3 se consideran glicoproteínas transmembranales que se expresan en la superficie de células infectadas y en la envoltura del virión (F, G y SH), una proteína de superficie interna de la envoltura (M), y una proteína de la que

aún se desconoce su lugar de empaquetamiento en el virión (M2-2) (Collins, 2008; Collins & Karron, 2013).

4.1.3.1 Proteínas no estructurales NS1 y NS2

Las proteínas no estructurales NS1 y NS2 de 139 y 124 aminoácidos respectivamente, son únicas del género *Pneumovirus*. Estos dos polipéptidos son codificados por los genes próximos al extremo 3' del genoma, y de manera independiente o en conjunto han mostrado interferir con la respuesta inmune de células epiteliales y del sistema inmune; afectando por diversos mecanismos la inducción y señalización de interferón alfa, beta y lambda (IFN α , β y λ), así como el receptor IFN α/β (IFANR) (Spann et al., 2004; Lo et al., 2005; Elliott et al., 2007; Munir et al., 2008; Ling et al., 2009). Además, ambas proteínas parecen retrasar vías de apoptosis temprana a través del factor de transcripción NF κ B, prolongando la vida celular y aumentando el rendimiento viral (Bitko et al., 2007).

4.1.3.2 Nucleoproteína N

Con 391 aminoácidos la nucleoproteína (N) es el principal componente de la nucleocápside helicoidal. Esta proteína es capaz de formar complejos con el RNA del genoma y el antígenoma viral, creando una barrera resistente a RNAsas del hospedero celular (Collins & Karron, 2013). Estudios recientes sugieren la interacción de N con proteínas intercelulares encargadas de censar RNA de cadena sencilla y doble, disminuyendo la respuesta interferón del hospedero celular (Groskreutz et al., 2010; Lifland et al., 2012). Cada subunidad de N tiene una región núcleo (N-core) que contiene dos dominios, el amino y carboxilo terminal (NTD y CTD), también llamados N-arm (residuos 1-28) y C-arm (residuos 360-375) (Tawar et al., 2009). Se ha especulado que el amino terminal de N es importante en la interacción directa con el RNA viral y la formación de la nucleocápside (Murphy et al., 2003). Por otra parte, el carboxilo terminal de N permite la interacción con la fosfoproteína P (Murray et al., 2001), proteína que actúa como chaperona durante la encapsidación de los genomas y antígenomas nacientes y evita que N se auto agregue (Castagné et al., 2004).

4.1.3.3 Fosfoproteína P

La fosfoproteína (P) se encuentra dentro del virión y células infectadas operando como un homotetrámero estable formado a través del dominio de multimerización ubicado en el centro de la molécula (Asenjo & Villanueva, 2000). Es la principal proteína fosforilada de HRSV y se encuentra formada por 241 aminoácidos. Ésta contiene más de 10-12 sitios fosfato y es fosforilada esencialmente por la proteína celular caseína cinasa II (CK2) en diferentes residuos localizados en la parte media (116, 117 y 119) y en el carboxilo terminal (232 y 237) (Dupoy et al., 1999). La fosforilación de estos sitios es indispensable para la replicación *in vivo* e *in vitro* del virus (Lu et al., 2002); sin embargo, otros sitios de la proteína han mostrado fosforilarse y desfosforilarse afectando los procesos en los que participa P (Asenjo et al., 2005). El carboxilo terminal de P ha mostrado interactuar con la proteína de la nucleocápside, al unirse a

un paquete hidrofóbico positivamente cargado de residuos discontinuos dentro de los aminoácidos 46-151 (Galloux et al., 2012). Como anteriormente se mencionó, esta interacción contribuye a la especificidad de N por el genoma, pero además le permite participar en la transcripción y replicación viral al funcionar como un adaptador multifuncional que al unirse a las proteínas N, M2-1 y L, ayuda a mediar las interacciones entre el complejo nucleocápside/polimerasa (Collins & Karron, 2013).

4.1.3.4 Proteína de matriz M

La proteína no glicosilada M se localiza en la superficie interna de la envoltura del virión y tiene un papel fundamental en organizar y dirigir el empaquetamiento de la nucleocápside viral durante la infección (Money et al., 2009). Esta proteína se ha caracterizado como un monómero de 256 aminoácidos que está organizado dentro de un compacto amino (residuos 1-26) y un carboxilo terminal (residuos 140-255) unidos por una secuencia de enlace de 13 residuos, aunque estudios recientes han mostrado que la proteína en solución es capaz de dimerizar, siendo esta forma biológicamente activa e importante en procesos de producción y ensamblaje viral (Förster et al., 2015). En la etapa temprana de la infección M se localiza en el núcleo a través de la acción de la proteína de transporte nuclear Impotin β 1 (Ghildyal et al., 2005); una vez en este sitio, la proteína es capaz de inhibir la transcripción celular del hospedero (Ghildyal et al., 2003). Más tarde, M se transporta al citoplasma mediante la acción de la proteína de exporte nuclear CRM-1 y se asocia con cuerpos de inclusión citoplasmáticos (IBs) (Ghildyal et al., 2009). La localización de M dentro de estos cuerpos es dependiente de la proteína viral M2-1, lo que ha llevado a pensar que M funciona como un regulador entre la transcripción viral y el ensamblaje del virión (Li et al., 2008), ya que parece silenciar la síntesis de RNA viral y se le ha encontrado vinculada con membrana plasmática del hospedero (Ghildyal et al., 2006).

4.1.3.5 Proteína SH o pequeña hidrofóbica

SH es una pequeña proteína transmembranal de 64 a 65 aminoácidos que se encuentra en la membrana del virión de HRSV y anclada a la membrana de células infectadas a través de una señal hidrofóbica cercana al amino terminal. Gran parte de SH no se encuentra glicosilada, pero existen algunas formas que pueden presentar esta característica (Collins & Motted, 1993). En células infectadas SH se acumula en las membranas del complejo de Golgi y retículo endoplasmático (Rixon et al., 2004), formando estructuras pentámicas similares a canales iónicos que confieren selectividad catiónica (Gan et al., 2012), lo que ha llevado a caracterizar a esta proteína como una vioporina, una clase de pequeñas proteínas virales que pueden modificar la permeabilidad de la membrana y afectar procesos como la gemación y apoptosis, además de inhibir la señal de citosinas antivirales y TNF- α (Fuentes et al., 2007).

4.1.3.6 Glicoproteína G

La glicoproteína de HRSV (G) se encuentra en la superficie del virión y de células infectadas, es una glicoproteína transmembranal de tipo II compuesta por 298 aminoácidos. Posee una señal de anclaje hidrofóbica cercana al amino terminal y dos tercios al carboxilo terminal orientado extracelularmente, además de un ectodominio conformado en su mayoría por dos dominios como mucinas, ricos en serina, treonina y prolina, altamente glicosilados (Collins & Karron, 2013). Gracias a las moléculas de carbohidratos asociadas con estos dominios, G contribuye al anclaje del virus con la célula huésped a través de la unión con glicosaminoglicanos (GAGs) altamente sulfatados presentes en la superficie de la membrana plasmática. Estudios han mostrado que el 50% del anclaje de HRSV es debido a la interacción de G con GAGs, 25% se debe a la unión de la proteína F igualmente con GAGs, y el 25% restante se debe a una vía alterna (Techarpornkul et al., 2002). Estas observaciones sugieren que HRSV puede usar receptores alternativos con el propósito de infectar a diferentes estirpes celulares. En apoyo a esta idea se ha observado que G es capaz de unirse a diferentes lectinas, incluyendo las proteínas surfactantes A y B (LeVine et al., 2004).

4.1.3.7 Proteína de fusión F

La proteína de fusión (F) se encuentra en la superficie del virión y de células infectadas. Una de sus funciones es mediar la penetración del virión al hospedero celular, y en tiempos tardíos de la infección se expresa en la superficie celular facilitando la unión entre membranas de células vecinas y la formación de sincitios. F es una proteína de superficie transmembranal de tipo I que posee un péptido señal hendido al amino terminal, y uno de anclaje a la membrana muy cercano al carboxilo terminal. Ésta se sintetiza como un precursor inactivo de 574 aminoácidos llamado F0, el cual será activado por un corte proteolítico ejecutado por furinas presentes en el aparato de Golgi, originando dos subunidades F1 y F2, ambas unidas por un enlace disulfuro (Collins & Karron, 2013). El amino terminal de la subunidad F1 posee un dominio hidrofóbico que interactúa con algún componente de la membrana del hospedero para iniciar la fusión; en este fenómeno participan dos áreas con un motivo estructural en el que se repiten 7 aminoácidos que durante la fusión se asocian conduciendo a un cambio conformacional que pondrá en proximidad a la membrana del hospedero y el virus (Singh et al., 1999). Por otro lado, investigaciones recientes sugieren que F interactúa con la proteína celular nucleolin, la cual podría tener un papel importante en el anclaje y entrada del virión (Tayyari et al., 2011).

4.1.3.8 Proteína M2-1

Codificada por el primer ORF del mRNA del gen M2, HRSV M2-1 se conforma de 194 aminoácidos y forma parte del complejo RdRp como un factor esencial de procesividad de la transcripción (Collins et al., 1996; Fearn & Collins, 1999). Comprende cuatro regiones significativamente funcionales, la primera es un dominio de unión a zinc (ZBD) con un motivo Cys₃-His₁ cercano al amino terminal que ha mostrado ser esencial en la síntesis de RNA viral (Hardy & Wertz, 2000; Tang et al.,

2001; Zhou et al., 2003). La segunda es una región alfa hélice ubicada en los residuos 32-63 encargada de mediar la oligomerización de la proteína y darle forma de homotetrámero (Tran et al., 2009). La tercer región comprende del residuo 59 a 178 del dominio denominado núcleo, el cual ha mostrado ser importante en la unión de M2-1 con el RNA viral y la fosfoproteína, dicha interacción es importante en la síntesis de RNA viral y no requiere de la fosforilación de M2-1; sugiriendo que P podría estar ayudando a M2-1 a interactuar con la nucleocápside para después ser desplazada (Tran et al., 2009; Blondot et al., 2012). Finalmente, la cuarta región es un carboxilo terminal no estructurado que manifiesta interactuar con NF- κ B, facilitando su translocación y activación en núcleo (Reimers et al., 2005).

4.1.3.9 Proteína M2-2

M2-2 es una pequeña proteína de 90 aminoácidos codificada por el segundo ORF del mRNA del gen M2. En células infectadas se expresa en bajos niveles y actualmente se desconoce su empaquetamiento en el virión (Collins & Karron, 2013). Al incrementar su expresión es capaz de inhibir la transcripción y replicación del RNA viral, mediando de esta manera el cambio de la transcripción a la replicación del genoma de HRSV (Bermingham & Collins, 1999; Cheng et al., 2005).

4.1.3.10 Proteína L

La polimerasa viral o proteína L se compone de 2,165 aminoácidos, junto con las proteínas N, P y M2-1 cataliza el inicio, elongación y término de la síntesis del genoma y mRNAs de HRSV (Grosfeld et al., 1995; Fearn & Collins, 1999), aunque se ha observado que proteínas celulares de choque térmico como HPS90 y HSP70 son importantes en la estabilización de L y en la remodelación de la nucleocápside de HRSV (Munday et al., 2015). L se encuentra asociada a la nucleocápside del virión (Lay et al., 2013) y en células infectadas colocaliza con otros componentes del RdRp en IBs (Carromeu et al., 2007). Posee al menos tres regiones funcionales, la primera es un dominio de polimerización con un motivo GNDQ (residuos 810-813) importante en la actividad de L (Fix et al., 2011). La segunda corresponde a un dominio de unión con nucleótidos identificado en los aminoácidos 1,269, 1,381 y 1,421 de la región central, los cuales han mostrado intervenir con el proceso de capping en mRNAs de HRSV (Liuzzi et al., 2005). Finalmente, la tercer región se encuentra en los aminoácidos 1,049-1,169 y se relaciona con la eficiencia en el reconocimiento de las secuencias GE del genoma viral (Cartee et al., 2003).

4.1.4 Virión

Los viriones de HRSV producidos en cultivo son partículas pleomórficas que asemejan predominantemente filamentos con un diámetro de 60-200 nm y una longitud de 10 μ m; y esferas con un diámetro de 100 a 350 nm (Figura 2b) (Collins, 1991). El virión se compone de una nucleocápside helicoidal con un diámetro de 14 a 16 nm (Bhella et al., 2002) que se conforma por una sola unidad del genoma viral y las proteínas N, P, L y M2-1 (Vergara et al., 2006). Rodeando la nucleocápside se encuentra la

proteína de matriz, la cual forma una capa en la cara interna de la envoltura del virión y funciona de anclaje para las glicoproteínas SH, G, y F (Figura 2a) (Battisti et al., 2012). Finalmente, todo el virión se encuentra envuelto por una membrana lipídica que contiene tres glicoproteínas transmembranales SH, G y F (Figura 2a), además de proteínas de origen celular como actina y algunas chaperonas (Radhakrishnan et al., 2010).

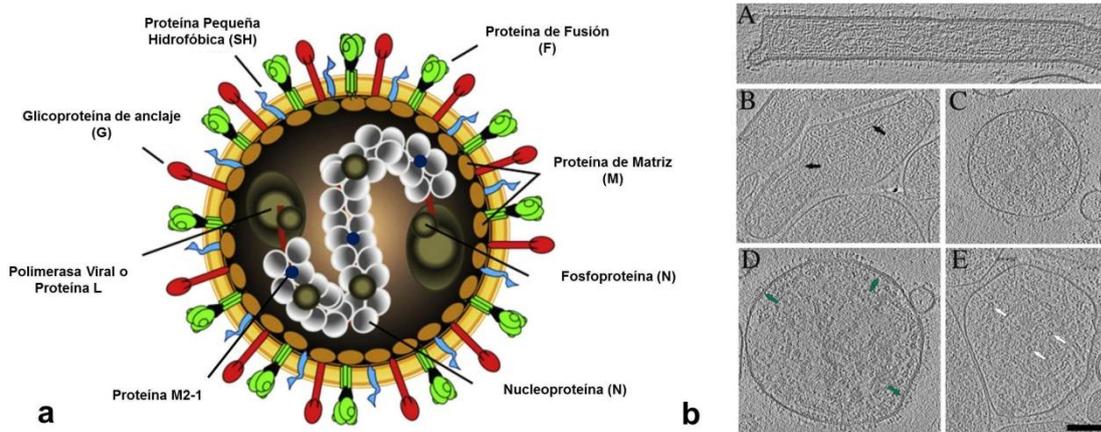


Figura 2: (a) Representación gráfica de la estructura y organización del virión de HRSV. Éste posee un genoma de RNA no segmentado de polaridad negativa (3´-5´) el cual está contenido dentro de una nucleocápside helicoidal que se compone por las proteínas N, P, L y M2-1. La nucleocápside de HRSV se encuentra rodeada por la proteína M y una envoltura lipídica con las glicoproteínas SH, G, y F (Tomado y modificado de Lay et al., 2012). (b) Tomografías del virión de HRSV, la morfología que exhiben los viriones va desde filamentosos (A) a completamente esféricos (C) con formas intermedias (B-E) que llegan a presentar partes tubularmente curvadas (B) (Tomado y modificado de Liljeroos et al., 2013).

4.1.5 Ciclo de replicación

La replicación de la información genética es una de las características más distintivas de los seres vivos, y a pesar de que los virus no poseen todas las características de un ser vivo (Villarreal, 2004); nadie más en la biósfera logra replicarse con gran economía y aparente sencillez que ellos. Con el fin de alcanzar la expresión, replicación y propagación de sus genes, diferentes familias de virus han evolucionado para aprovechar la biología de sus hospederos y adoptar diversas estrategias genéticas y ciclos de replicación (Whelan, 2013). De manera general, en la familia *Paramyxoviridae* el ciclo de replicación involucra tres pasos básicos: el anclaje y entrada del virión; la transcripción de mRNAs virales y la síntesis del genoma; y finalmente, el ensamblaje y liberación del virión (Lamb & Parks, 2013).

4.1.5.1 Anclaje y entrada del virión

El anclaje y entrada de HRSV en células epiteliales del tracto respiratorio (AECs) involucra la interacción de las proteínas G y F con GAGs (Figura 3), especialmente hepáran sulfato y condroitín sulfato B (Hallak et al., 2000); sin embargo, se ha identificado que la participación adicional de la molécula de adhesión intercelular-1

(ICAM-1), RhoA, anexina II, la proteína celular nucleolin y el receptor de la fractalquina CX3CR1, también son importantes en el anclaje y entrada del virión de HRSV (Behera et al., 2001; Gower et al., 2001; Malhotra et al., 2003; Tayyari et al., 2011; Johnson et al., 2015). Después del anclaje, la entrada del virión de HRSV acontece por la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula (Srinivasakumar et al., 1991). Para que este proceso ocurra es importante la presencia de micro dominios ricos en colesterol, especialmente gangliósidos-1 (GM1), los cuales funcionan como plataformas de acoplamiento entre las dos membranas; además, se requiere la activación de Pak-1 (Figura 3), proteína que dirige la reorganización del citoesqueleto y filamentos de actina (San-Juan-Vergara et al., 2012).

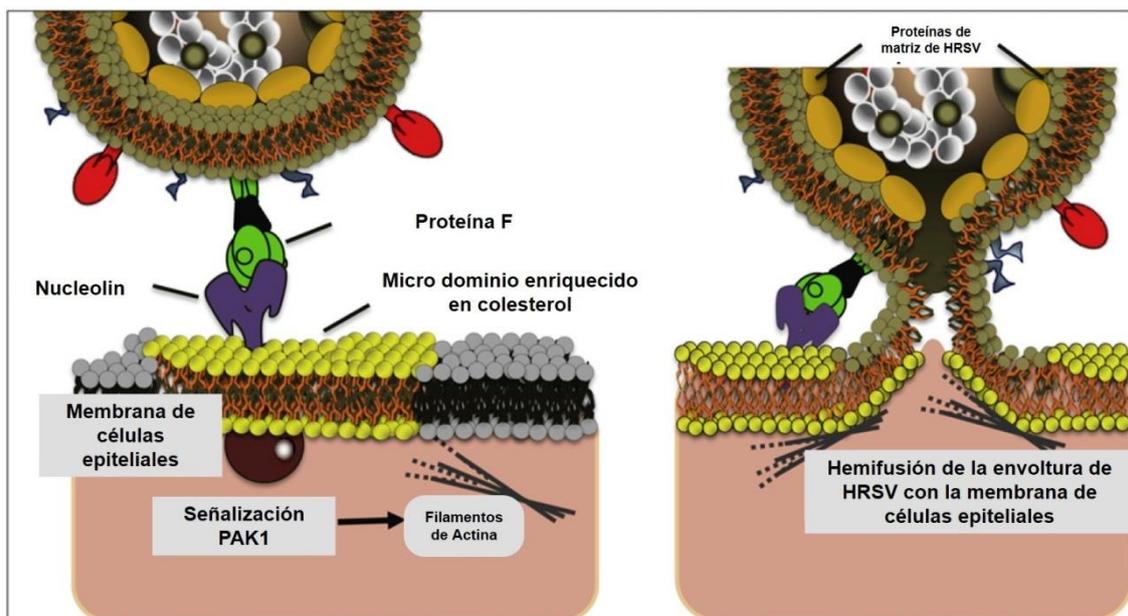


Figura 3: La interacción de las proteínas G y F de HRSV con GAGs en la superficie celular de AECs origina el anclaje del virión a la célula huésped y permite el contacto de la proteína F con nucleolin, receptor que se encuentra embebido en micro dominios ricos en colesterol. Esta interacción y la de un posible co-receptor activan a la señal dependiente de Pak-1, la cual promueve la reorganización del citoesqueleto y filamentos de actina, dando comienzo a los eventos de hemifusión de la envoltura de HRSV y la membrana plasmática de AECs (Tomado y modificado de Lay et al., 2012).

4.1.5.2 Síntesis del genoma y transcripción de mRNAs virales

Una vez que ocurre la hemifusión de la membrana viral con la del hospedero, la nucleocápside se disocia de la proteína M y es liberada dentro del citoplasma gracias a la fosforilación del residuo 54 de la proteína P (Asenjo et al., 2005; Asenjo et al., 2008). La transcripción y replicación del genoma ocurren de manera simultánea en el citoplasma (Figura 4) y ambos procesos son regulados por un único promotor localizado en la región Le del extremo 3' del genoma viral (Mink et al., 1991).

En la transcripción, el complejo RdRp inicia en el promotor de la región Le previamente descrita y transcribe los genes por un mecanismo secuencial de paro y arranque que genera un gradiente de mRNAs del extremo 3' al 5' (Kuo et al., 1996). La síntesis de cada mRNA inicia frente al primer nucleótido de la señal GS; aunque, la polimerasa

viral puede seleccionar el nucleótido de inicio de manera independiente al templado (Kuo et al., 1997). En los miembros de la familia *Paramyxoviridae* la metilación o capping de los mRNAs ha mostrado ser esencial para que se lleve a cabo la elongación en el curso de la traducción (Liuzzi et al., 2005). Este fenómeno ocurre gracias a una señal complementaria a la señal GS presente en el mRNA inmaduro (Wang et al., 2007); asimismo, la poliadenilación de los mRNAs virales se presenta cuando la polimerasa viral se encuentra con una señal GE (Fearn & Collins, 1999).

La síntesis de mRNAs y proteínas virales es detectable entre las 4 y 6 horas pos-infección, alcanzando un pico de acumulación entre las 15 y 20 horas; además, intracelularmente ésta se localiza principalmente en IBs, lugar donde se concentra el complejo RdRp (Figura 4), componentes celulares clave en la respuesta contra infecciones virales y otros que promueven la actividad de la polimerasa viral (García et al., 1993; Burke et al., 2000; Collins & Karron, 2013).

Por otra parte, para que la síntesis del genoma de HRSV sea posible, antes debe producirse una copia de sentido 5'-3' del RNA genómico viral, el cual es llamado antigenoma. En la síntesis del antigenoma la polimerasa de replicación ignora las secuencias GS y GE de todo el genoma, produciendo una copia de sentido 5'-3' del RNA viral, este proceso es regulado por la región Le que además de contener al promotor, también posee una señal de encapsidación del antigenoma naciente con la proteína N (McGivern et al., 2005). Más tarde el antigenoma es copiado a RNA genómico por un fuerte promotor ubicado en la región complementaria trailer (TrC) del antigenoma (Figura 1), la cual también contiene una secuencia que regula la encapsidación (Melero, 2007; Lay et al., 2012; Collins & Karron, 2013).

4.1.5.3 Ensamblaje y liberación del virión

El ensamblaje y liberación del virión de HRSV ocurre en la membrana plasmática del hospedero. En el ensamblaje, la proteína de matriz interactúa con la nucleocápside a través de la proteína M2-1 e incorpora la estructura a la membrana plasmática preparándola para completar el ensamblaje y liberación (Li et al., 2008). Al igual que en la entrada del virión, es necesaria la presencia de micro dominios ricos en colesterol en la membrana plasmática (Chang et al., 2012). En conjunto con estos microdominios se encuentra la proteína viral F, la cual recluta a la proteína viral G a través de tres aminoácidos (Phe, Ser y Asn) ubicados en el dominio que proyecta hacia el citoplasma. Inmunoprecipitaciones sugieren que G es capaz de interactuar con SH, incorporándola en una región de la membrana plasmática rica en colesterol y en la que se encuentran las otras dos proteínas virales de superficie (Figura 4) (Fleming et al., 2006; Shaikh et al., 2012; Low et al., 2008). Finalmente, el vínculo entre la matriz viral y las proteínas de superficie es favorecido por la interacción del amino terminal de la proteína G con la proteína de matriz, completando de esta manera el ensamblaje de la partícula viral (Ghildya et al., 2005).

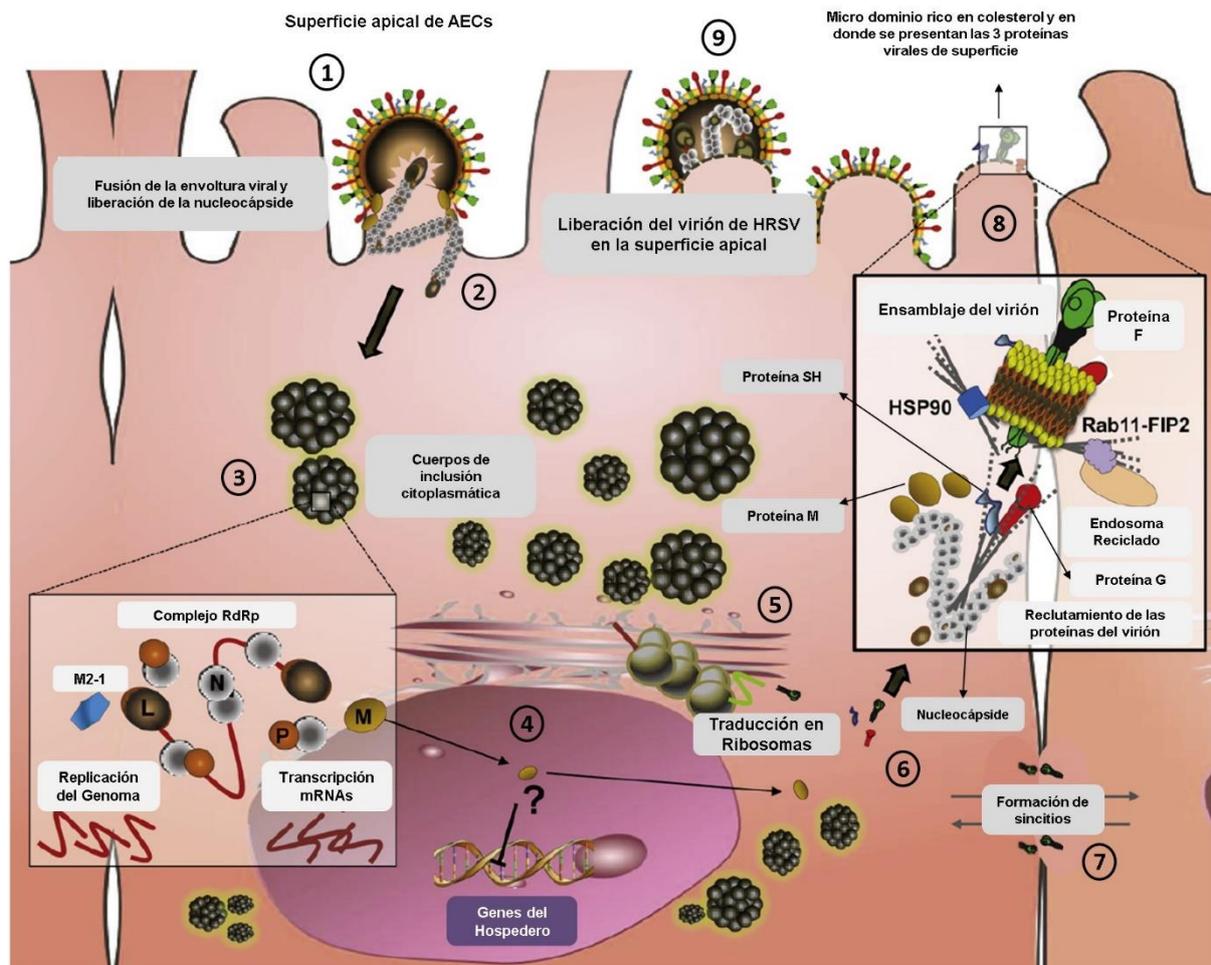


Figura 4: (1) Anclaje y entrada del virión de HRSV. (2) La liberación de la nucleocápside en el citoplasma del hospedero (3) da lugar a la transcripción y replicación del genoma viral, estos dos eventos ocurren en el citoplasma, principalmente en IBs. (4) En una etapa temprana a la infección la proteína M se localiza en el núcleo del hospedero, probablemente bloqueando la transcripción de genes del mismo; más tarde, esta misma proteína se localiza en el citoplasma a través de la proteína de exporte celular CRM-1. (5) La traducción de los mRNAs virales se presenta en los ribosomas del hospedero celular y (6) las proteínas virales son liberadas al citoplasma. (7) En la etapa tardía de la infección, F se encuentra en la superficie celular de células infectadas favoreciendo la formación de sincitios y (8) reclutando otras proteínas virales necesarias para el ensamblaje y liberación del virión. En esta etapa la presencia de actina y la proteína de choque térmico HSP90 facilitan el ensamblaje y liberación del virión. (9) Finalmente, la liberación del virión ocurre por la vía de reciclaje de endosomas apicales, la cual involucra a Rab11-FIP2 (Tomado y modificado de Lay et al., 2012).

La liberación del virión de HRSV ocurre en la superficie apical de células polarizadas y en zonas, que como ya se mencionó, contienen micro dominios ricos en colesterol (Collins & Karron, 2013). El proceso de egreso de las partículas virales ensambladas se produce por la vía de reciclaje de endosomas apicales, la cual involucra a Rab11-FIP2, y es independiente del sorteo de complejos endosomales (ESCRT) requeridos para la maquinaria de transporte (Figura 4) (Utlely et al., 2008). La progenie viral de HRSV es detectable 10 a 12 horas pos-infección, alcanza un pico máximo tras 24 horas y continúa hasta que las células se deterioran 30 a 48 horas posteriores a la infección (Collins & Karron, 2013).

4.1.6 Epidemiología

HRSV fue por primera vez aislado entre los años 1955 y 1956 de una colonia de chimpancés de laboratorio que presentaban síntomas similares al resfriado común; sin embargo, éste fue designado como el agente de la rinitis chimpancé. Poco tiempo después el mismo virus fue recuperado de infantes con enfermedades respiratorias y se renombró HRSV, debido a su impacto sobre la función respiratoria y la capacidad para formar células multinucleadas o sincitios en cultivos celulares (Cane, 2002; Collins, 2008).

Actualmente el virus tiene una distribución mundial y es considerado el agente etiológico viral más frecuente en infecciones agudas del tracto respiratorio (ITR). Además, es la causa más común de bronquiolitis y neumonía en niños que se encuentran entre los primeros 5 años de vida, adultos mayores y hospederos inmunocomprometidos (Robinson, 2008; Verger & Verger, 2012). A nivel mundial se ha estimado que HRSV causa 33.8 millones de ITR, 3.4 millones de hospitalizaciones y 66,000 a 199,000 muertes (Collins & Karron, 2013). En México, el 74.7% de los menores de dos años que presentan algún tipo de ITR es debido a HRSV (Figura 5b), 70.3% de éstos requiere de hospitalización y el 5.2% muere debido a las complicaciones (Rodríguez-Auad et al., 2012).

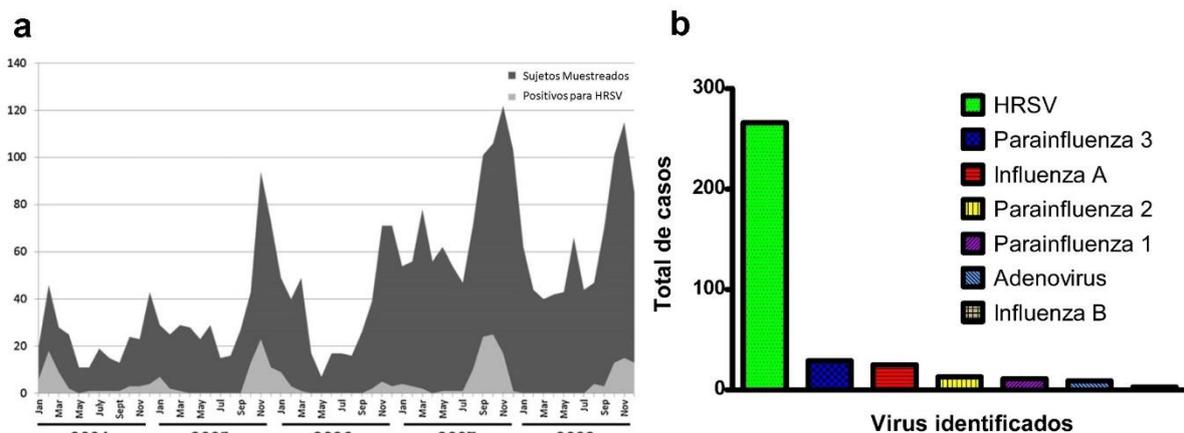


Figura 5: (a) Distribución estacional de los sujetos con ITR muestreados (n=2797) para virus respiratorios y los positivos para HRSV (n=266), (b) así como el total de individuos con ITR positivos para virus respiratorios (356) y los agentes virales identificados como responsables, entre enero del 2004 y diciembre del 2008 en el hospital infantil de la Ciudad de México (Tomado y modificado de Rodríguez-Auad et al., 2012).

En climas templados el virus suele causar brotes en la comunidad entre los meses de noviembre y abril para muchas de las localidades del hemisferio norte, y entre marzo y octubre en localidades del hemisferio sur; sin embargo, el tiempo y duración de los brotes es muy variable (Mullins et al., 2003). Por ejemplo, en los Estados Unidos de Norte América los brotes suelen reportarse a principios de noviembre y finales de enero, mientras que en México ocurren entre agosto y marzo (Figura 5a) (Rodríguez-Auad et al., 2012).

4.1.7 Evolución y tropismo

HRSV presenta un sólo serotipo con dos subgrupos antigénicos A y B. El genoma de estos dos subgrupos comparte el 81% de identidad y en general ha mostrado tener una tasa de sustitución de nucleótidos de 6.47×10^{-4} sustituciones/sitio/año; aunque, estudios más recientes indican que la tasa de evolución media del subgrupo A es de 2.1×10^{-3} sustituciones/sitio/año, y 3.031×10^{-3} sustituciones/sitio/año para el subgrupo B (Martinelli et al., 2014). Por otra parte, existe una gran divergencia entre las proteínas M2-2, SH y G de ambos subgrupos, pues tan solo los ectodominios de las proteínas SH y G exhiben el 50% y 40% de identidad entre los subgrupos A y B, respectivamente. Esto ha llevado a pensar que ambos subgrupos representan dos líneas de evolución divergentes con una antigüedad de unos 350 años aproximadamente, más que variantes que difieren en unos cuantos sitios antigénicos (Collins & Karron, 2013).

De manera adicional, el alto grado de sustitución de nucleótidos en el gen de la proteína G ($10^{-2.7}$ sustituciones/sitio/año) y la diferencia que ésta exhibe entre las cepas de un mismo subgrupo (20%), en contraste con la estabilidad antigénica y el alto grado de conservación de secuencias de la proteína F, sugiere que la variación encontrada en la proteína G es el resultado de una selección positiva, presumiblemente impulsada por la presión del sistema inmune; a pesar de esto, hasta la fecha no hay evidencia de que la evolución progresiva de HRSV resulte en nuevas cepas (Meleró & Moore, 2013).

La infección por HRSV generalmente se encuentra restringida a su reservorio natural, la especie humana; sin embargo, diferentes cepas de HRSV han mostrado infectar a otros animales, como ratones, ratas, ovejas, chimpancés y algunos monos africanos. Estos hospederos son semipermisivos y no existe evidencia de la transmisión o diseminación entre sus poblaciones, con la única excepción de chimpancés. *In vivo* HRSV infecta principalmente AECs, aunque el RNA del virus se ha detectado en sangre, líquido cerebroespinal, tejido del miocardio, hígado, riñón y células del sistema inmune como linfocitos y macrófagos, sugiriendo que HRSV presenta tropismo hacia otros tejidos, además de un gran potencial para diseminarse más allá de tracto respiratorio, aunque en otras zonas el virus suele ser restringido por la respuesta inmune del hospedero (Eisenhut, 2006; Johnson et al., 2007; Collins & Karron, 2013).

De la misma manera, en experimentos *in vitro* HRSV ha manifestado infectar una gran variedad de cultivos celulares, como pulmón, hígado, riñón, tejido neuronal, colon, fibroblastos, células estromales de la médula ósea, eosinófilos, células dendríticas y otras del linaje hematopoyético (Dyer et al., 2009; Rezaee et al., 2011; Johnson et al., 2011). En parte, el tropismo de este virus se ha explicado a través de la capacidad de interacción de las glicoproteínas virales G y F con GAGs, y receptores celulares de superficie como TLR4, CX3C1, entre otros; no obstante, es posible que los mecanismos que contribuyen al tropismo de HRSV aún estén por descubrirse (Collins et al., 2013).

4.1.8 Patogénesis

Durante una infección aguda HRSV infecta y se replica principalmente en AECs de la nasofaringe, tiempo después el aspirado de secreciones promueve la propagación del virus hacia el tracto respiratorio inferior, lugar en el que el virus infecta preferencialmente a células ciliadas de la superficie apical, aunque existen reportes que sugieren la infección y alteración de las funciones en células alveolares tipo I y II, neuronas, células dendríticas y macrófagos. La presencia de síntomas es usual durante la infección primaria por HRSV, aunque sus manifestaciones pueden variar en: fiebre, otitis media, enfermedades respiratorias del tracto superior (URTI), inferior (LRTI) o ambos, en casos de LRTI la enfermedad puede ser leve o complicarse en bronquiolitis o neumonía (Li et al., 2006; Collins, 2008; Collins & Karron, 2013).

Después de infectar, el virus cumple un período de incubación de 3 a 5 días antes de que los síntomas de la enfermedad sean reconocibles. En el transcurso de la infección se produce la necrosis y destrucción de células ciliadas de la superficie apical, la afluencia de células polimorfo nucleares y la infiltración de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Los tejidos de la submucosa y adventicia se vuelven edematosos y la secreción excesiva de moco en combinación con los restos celulares y células inflamatorias, producen la obstrucción de los bronquiolos y alveolos, causando el colapso o enfisema de la porción distal de las vías respiratorias. La infección de alveolos tipo I y II frecuentemente se refleja en neumonía, en estos casos, las paredes interalveolares se vuelven espesas debido a la infiltración de células mononucleares y líquido que llena los espacios alveolares, sugiriendo que algunos de los factores inmunológicos contribuyen a la severidad de la enfermedad (Collins & Karron, 2013).

4.1.9 Respuesta inmune

El control de las infecciones causadas por HRSV requiere de la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedero. En la respuesta inmune innata, componentes específicos de HRSV son detectados en AECs a través del reconocimiento de patrones asociados a patógenos (PAMPs) que activarán diversos receptores de reconocimiento (PRRs), como TLR, RIG-1 y NOD, induciendo la expresión de citosinas y quimiocinas. La secreción de estas moléculas por AECs infectadas con HRSV, induce el reclutamiento de neutrófilos, eosinófilos, monocitos, células T, Th1, NK, células dendríticas y macrófagos, estimulando la secreción de una segunda oleada de citosinas que producirá daños en tejidos de las vías respiratorias (Lay et al., 2012). En el inicio de la respuesta inmune adaptativa, la activación de células T CD4 y CD8 es mediada por células dendríticas. La acción combinada de este tipo de células T tienen un papel fundamental en el término de la infección aguda con HRSV; además, la producción de anticuerpos IgA e IgG por células B provee cierta protección en contra URTI y LRTI, respectivamente (Varga & Braciale, 2013).

4.1.10 Profilaxis y vacunas

Diversos medicamentos han sido diseñados para combatir infecciones por HRSV; sin embargo, sólo rivabirina tiene aprobación para ser usado en seres humanos, aunque su utilización ha sido controversial debido a la relación costo/eficiencia y los potenciales efectos secundarios. Por otro lado, una gran variedad de estrategias han sido empleadas en el diseño de vacunas que provean protección en recién nacidos, algunas de éstas se encuentran dirigidas contra proteínas virales, como F, G, N, entre otras; no obstante, el uso de estas vacunas en seres humanos ha sido controversial y actualmente continua en experimentación (Gomez et al., 2014).

4.2 Persistencia Viral

Las infecciones virales se caracterizan por presentarse de manera aguda o persistente. Una infección aguda acontece cuando el agente viral infecta a un hospedero susceptible y se da comienzo al ciclo de replicación viral que, en algunos casos, puede estar acompañado de los síntomas de la enfermedad. En la mayoría de las ocasiones el sistema inmune identifica y elimina al agente viral responsable del malestar. En las infecciones crónicas o persistentes los síntomas de la enfermedad desaparecen, existe una respuesta inmune en curso, aunque ineficaz, y el genoma viral está presente en células del hospedero; además, las proteínas y las partículas virales continúan siendo producidas de manera continua o intermitente por meses o años, sin causar el deceso del hospedero (Flint et al., 2015).

Para que el fenómeno de persistencia viral sea posible, el representante viral debe de cubrir tres requisitos; el primero consiste en la evasión de la respuesta inmune (Oldstone, 2006). Interferir con receptores tipo Toll (TLRs), alterar la presentación de antígenos, degradar la producción y acción de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad I y II (MHC-I y MHC-II) y la destrucción de células T activadas, son algunas de las estrategias que diversos virus emplean para abatir la respuesta inmune. El genoma de una gran variedad de gamma-herpesvirus y poxvirus codifican proteínas tipo anillo de unión a dedos de zinc con actividad E3 ubiquitina ligasa, las cuales interfieren con la presentación de antígenos de la clase MHC-I, estimulan la replicación viral e inhiben la apoptosis (Ghaemi-Bafghi & Haghparast, 2013; Heise & Virgin, 2013; Flint et al., 2015).

El segundo requisito involucra la subversión de moléculas o mecanismos propios del hospedero por parte del virus; por ejemplo, ciertos virus subvierten la función de proteínas relacionadas a la señalización de la respuesta inmune, interfieren con moléculas importantes para la apoptosis y ciclinas necesarias para el progreso del ciclo celular, suministrando señales intracelulares que favorecen estrategias de replicación únicas, donde el virus es capaz de regular la expresión de los genes del hospedero y los propios, residiendo en un estado no lítico y en equilibrio con el hospedero (Oldstone, 2006; Strauss & Strauss, 2008; Heise & Virgin, 2013). Un ejemplo práctico es el de las proteínas E5, E6 y E7 del virus del papiloma humano (HPV), las cuales han mostrado interferir con los procesos de apoptosis celular,

favoreciendo la supervivencia celular y asegurando la replicación y propagación de la progenie viral (Garnet & Duerksen-Hughes, 2006). Por otro lado, el virus de la inmunodeficiencia tipo 1 (HIV-1) y otros virus de la inmunodeficiencia de los primates, subvierten los mecanismos que regulan el ciclo celular para establecer una infección productiva (Rice & Kimata, 2015).

Finalmente, el último requisito se enfoca en la habilidad del virus para infectar células diferenciadas o especializadas. La replicación continua de un genoma extraño en una célula diferenciada puede causar el desorden de un gran número de procesos y funciones. Algunos ejemplos incluyen aquellos virus con la capacidad de infectar y persistir en tejidos y órganos con poca vigilancia del sistema inmune. En el ciclo replicativo de los papilomavirus la producción de partículas virales infectivas únicamente ocurre en células de la capa externa de la piel, lugar donde la respuesta inmune se dificulta debido a la ausencia de capilares (Doorbar et al., 2012).

Otro tipo de virus infectan y persisten en células del sistema inmune, como linfocitos, monocitos, células dendríticas y macrófagos; interfiriendo con sus funciones durante la respuesta inmune y causando inmunosupresión del hospedero, además de diseminar las partículas virales a otros tejidos y órganos. (Sevilla et al., 2000; Oldstone, 2006; Flint et al., 2015). El virus del sarampión (MeV), un miembro de la familia *Paramyxoviridae*, infecta previamente a monocitos y células linfoides que migran a ganglios linfáticos de drenaje. La infección de los tejidos linfáticos inmunodeprime transitoriamente al hospedero y conduce a la infección de neuronas y células epiteliales de pulmones y piel; no obstante, después de que el sistema inmune controla la enfermedad y se establece inmunidad contra el virus, el RNA de MeV es detectado en tejido linfoide, sangre, orina y secreciones respiratorias, durante semanas y meses (Griffin et al., 2012; Flint et al., 2015).

4.2.1 El fenómeno de persistencia en HRSV

A diferencia de MeV y otros virus, la persistencia viral de HRSV no se ha demostrado en seres humanos; sin embargo, infecciones severas por HRSV durante los primeros años de vida han sido asociadas, a largo plazo, con una reducción en la función de las vías respiratorias y al subsecuente desarrollo de sibilancias y asma (Sigurs et al., 2010). También, el mRNA de la nucleoproteína de HRSV ha sido detectado en tejido pulmonar proveniente de niños que murieron sin ningún síntoma aparente de la enfermedad (Cubie et al., 1997). Secuencias del genoma viral han sido detectadas en células estromales de médula ósea (BMSCs) de niños y adultos (Rezaee et al., 2011), además de muestras de sangre, secreciones de nariz, garganta, bronquios y aspirados o lavados nasales provenientes de pacientes que presentaban algún tipo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Seemungal et al., 2001; Rohde et al., 2003; Borg et al., 2003; Wilkinson et al., 2006; Falsey et al., 2006; Sikkell et al., 2008). Lo anterior sugiere que HRSV puede establecer una infección persistente en sitios inmunológicamente privilegiados dentro del pulmón, posiblemente neuronas o células del sistema inmune (Schwarze et al., 2004).

4.2.2 Modelos de persistencia del HRSV *in vivo*

El estudio de la persistencia de HRSV en modelos murinos ha resultado en enfermedad crónica caracterizada por hiperreactividad en las vías respiratorias (AHR) e inflamación de las mismas, una vez concluida la bronquiolitis aguda. La persistencia de AHR se ha asociado con el infiltrado de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos que se localizaron principalmente en torno a los vasos centrales y las vías respiratorias. También, el perfil de expresión génica de los pulmones de ratones infectados mostró alteraciones a partir del día 42, y el RNA mensajero y genómico del virus estuvo presente en homogenizados de pulmón durante 100 o más días posteriores a la infección (Schwarze et al., 2004; Chávez-Bueno et al., 2005; Mejías et al., 2008). Experimentos realizados en conejillos de indias han mostrado igualmente AHR e inflamación de las vías respiratorias; aunque, ésta se asoció a la infiltración de linfocitos, células polimorfonucleares y eosinófilos; además, la detección del genoma y proteínas virales fue posible hasta los 60 y 100 días después de la infección. Ensayos inmunohistoquímicos detectaron la presencia de proteínas intracitoplasmáticas de HRSV en células de las vías respiratorias, estroma y macrófagos alveolares, igualmente la persistencia de HRSV indujo la alteración en la expresión de proteínas de las vías respiratorias, la cual se asoció con el mal funcionamiento de las mismas (Hegele et al., 1994; Dakhama et al., 1997; Bramley et al., 1999; Sutton et al., 2007; Tan et al., 2008).

4.2.3 Modelos de persistencia del HRSV *in vitro*

A pesar de los esfuerzos realizados en los estudios antes mencionados, no ha sido posible determinar el reservorio celular y los mecanismos por los que HRSV establece persistencia. Experimentos *in vitro* han revelado que el virus es capaz de infectar y persistir en células de riñón, epiteliales de laringe y pulmón, BMSCs, linfocitos B, células dendríticas y macrófagos. En estos modelos los cultivos se caracterizaron por presentar alto porcentaje de células positivas para antígenos de HRSV, descenso en la producción de progenie viral infecciosa y la ausencia de la citopatología celular característica del virus (Pringle et al., 1978; Bangham & McMichael, 1986; Sarmiento et al., 2002; Valdovinos & Gómez, 2003; Hobson & Everard, 2008; Rezaee et al., 2011). Estudios más detallados en los que se emplearon líneas celulares HEp-2 y macrófagos murinos P388D1, han revelado la capacidad de HRSV para modificar el perfil de expresión de citocinas, quimiocinas, interleucinas y proteínas anti-apoptóticas (Guerrero-Plata et al., 2001; Martínez et al., 2009; Nakamura-López et al., 2011).

4.3 Ciclo Celular

La única forma de crear una célula nueva es duplicando una que ya existe. Este hecho tan simple fue establecido por primera vez a mitad del siglo diecinueve, y desde entonces, ha llevado consigo un profundo mensaje sobre la continuidad de la vida. Todos los seres vivos, desde una bacteria unicelular hasta un mamífero multicelular, son producto de repetidas rondas de crecimiento y división celular. Toda célula se reproduce ejecutando una secuencia ordenada de eventos en los que deberá replicar

su contenido genético para después dividirse en dos. Este ciclo de duplicación y división es conocido como ciclo celular, y es el mecanismo esencial por el que todos los seres vivos se reproducen. Su función más básica es duplicar fielmente la vasta cantidad de ácido desoxirribonucleico (DNA) contenido en los cromosomas y después segregarlo en dos células hijas genéticamente idénticas (Alberts et al., 2015).

4.3.1 Sistema de control del ciclo celular

El sistema de control del ciclo cuenta con un gran número de moléculas señal y blanco, influenciadas por una compleja red y sistemas de señalización que en conjunto dirigen los eventos del ciclo celular en una secuencia ordenada de vías dependientes, en las cuales, el inicio de los eventos tardíos depende de la conclusión de los eventos tempranos dentro de la vía. Este sistema se caracteriza por emplear interruptores bioquímicos conectados en serie y con un comportamiento binario (on/off); además, todo el sistema se considera altamente fiable y adaptable, ya que cuenta con mecanismos de soporte y otras características que le permiten trabajar bajo condiciones muy variadas (Hartwel & Weinert, 1989; Alberts et al., 2015).

En la mayoría de las células eucariontes el sistema controla el progreso del ciclo celular en cuatro puntos de control esenciales. El primero se encuentra en la etapa tardía de la fase *G1* (*G1-S*), regulando una etapa de preparación previa a la duplicación de los cromosomas; el segundo previene el inicio de la replicación del DNA en la fase *S* (intra-*S*); el tercero está presente en la transición de *G2* a *M* (*G2-M*), controlando los eventos de la mitosis temprana; finalmente, el cuarto punto de control se localiza en la transición de la *metafase* a la *anafase* (montaje del huso o SAC) (Figura 6). El término punto de control hace referencia a cascadas de vías de señalización capaces de censar y responder a errores dentro del desarrollo del ciclo celular, como daño al DNA o la incorrecta segregación de los cromosomas; aunque este término también puede ser utilizado para otros elementos que regulan las vías de señalización de manera positiva o negativa (Murray, 1994; Zhou & Elledge, 2000; Kastan & Bartek, 2004).

Muchos de los elementos positivos son proto-oncogenes, genes cuyos productos promueven el crecimiento y la división celular, y que en ocasiones permanecen constitutivamente activos debido a mutaciones, transformándose en oncogenes. De manera inversa, los elementos negativos son generalmente supresores de tumores, genes cuya actividad inhiben la proliferación celular y bloquean la acción de oncogenes. Un ejemplo importante de un gen supresor de tumores es p53, este sistema es responsable de responder a factores de estrés externos que generalmente causan daño al DNA, y dependiendo de la severidad, induce el arresto del ciclo celular o promueven la apoptosis (Kastan et al., 1995). Por otra parte, existen vías de señalización que previenen a las células de entrar en el ciclo celular, las cuales son llamadas anti-proliferativas. Un ejemplo importante de vía anti-proliferativa es la vía de señalización Smad, la cual es controlada por la súper familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (Massagué et al., 2000).

4.3.1.1 Cinasas dependientes de ciclinas

El componente principal de la maquinaria de control del ciclo celular es una familia de proteínas llamadas cinasas dependientes de ciclinas (Cdks). Estas proteínas se caracterizan por poseer una subunidad catalítica de aproximadamente 300 aminoácidos y permanecer constantes a lo largo de todo el ciclo celular; además, son capaces de fosforilar a otras proteínas, aunque para esto dependen de ciclinas. Generalmente su actividad aumenta y desciende conforme el ciclo celular progresa, induciendo cambios en la fosforilación de proteínas intracelulares que inician o regulan eventos clave del ciclo celular. Para asegurar que estos eventos ocurran de manera sincronizada y ordenada, la actividad de Cdks se encuentra regulada por una amplia variedad de mecanismos, proteínas y enzimas, entre las que destacan las ciclinas, proteínas que se distinguen por oscilar sus concentraciones durante el progreso del ciclo celular y poseer un dominio de aproximadamente 100 aminoácidos (cyclin box), el cual utilizan para interactuar y activar Cdks (Morgan, 1995).

La conformación del complejo ciclina/Cdk produce el desplazamiento de un bucle de proteínas que cubre el sitio activo de la Cdk, por lo que la interacción de estas dos proteínas resulta en una activación parcial del complejo. La activación completa del complejo ciclina/Cdk ocurre cuando una cinasa independiente, llamada cinasa Cdk-activando (CAK), fosforila un aminoácido del sitio activo de la Cdk, lo anterior produce un cambio conformacional en el complejo, permitiéndole a la Cdk fosforilar proteínas clave en ciertos eventos del ciclo celular (Russo et al., 1996; Pavletich, 1999). Al cumplir con este objetivo, el complejo Cdk-ciclina activado puede ser inhibido por la fosforilación de dos aminoácidos cercanos al amino terminal de la Cdk, o al entrar en contacto con proteínas inhibitoras de Cdks (CKIs), las cuales inducen un reordenamiento del sitio activo de la Cdk haciéndolo inactivo (Morgan, 1995; Alberts et al., 2015).

En células eucariontes cada Cdk forma complejos con al menos un tipo de ciclina en una fase específica del ciclo celular. De manera general a lo largo del ciclo celular, ambas familias de moléculas interactúan de la siguiente manera:

1. **Ciclina D + Cdks-G1:** de las tres isoformas de la ciclina D, la D1 es la más ampliamente expresada en células eucariontes. Ésta interactúa con la Cdk4 y Cdk6 induciendo los eventos tempranos de la fase *G1*.
2. **Ciclina E + Cdk-G1/S:** la ciclina E es una proteína nuclear que forma complejos con Cdk2, promoviendo el progreso de la fase *G1* y contribuyendo al inicio de la síntesis de DNA.
3. **Ciclina A + Cdks-S:** la ciclina A es una proteína nuclear con dos isoformas, generalmente la isoforma A1 se expresa en células germinales, mientras que la isoforma A2 está presente en el resto de las células; aunque, en cualquier caso, esta ciclina interactúa con Cdk1 y Cdk2 controlando la transición de la fase *G1* a *S* y de *G2* a *M*.

-
-
4. Ciclina B + Cdk-*M*: el complejo ciclina-B/Cdk1 controla y regula la ruptura de la envoltura nuclear y el montaje del huso mitótico, además de la separación de los cromosomas y la citocinesis.

4.3.1.2 Familia de proteínas *pocket*

La familia de proteínas *pocket* se encuentra representada por la proteína del retinoblastoma (pRb), un tipo de proteína supresora de tumores que desempeña un papel fundamental en el control negativo del ciclo celular. La familia de pRbs incluye tres miembros: Rb/105, p107 y Rb2/p130; en conjunto, estas proteínas mantienen a la célula en la fase *G0* a través del control de la familia de factores de transcripción E2F, los cuales regulan la expresión de un gran número de componentes del ciclo celular, como: la ciclina A, ciclina E, Cdc25A y E2F (Giacinti y Giordano, 2006).

4.3.1.3 Puntos de control y señales de daño al DNA

El daño en el DNA ocurre frecuentemente durante el período de vida de una célula, por lo que existe el riesgo de mutaciones y el desarrollo de cáncer. Afortunadamente existen señales y puntos de control que responden en caso de daños al DNA. Los sistemas encargados de dar esta respuesta consisten de sensores de daño al DNA, adaptadores y mediadores que ensamblan señales complejas e influyen principalmente en Cdks, ciclinas y otros substratos efectoros; además, todo este sistema de vigilancia forma parte de la compleja red del ciclo celular que regula de manera fiel y ordenada el progreso del mismo, así que muchos de los sensores de daño y moléculas de señal, participan en los cuatro puntos de control antes mencionados, o juegan un papel fundamental en un punto específico (Kastan & Bartek, 2004). Algunos de los complejos encargados de censar y detectar daño al DNA, incluyen los complejos 9-1-1, Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN), MSH2/MSH6, etc. De manera independiente o en conjunto, estos complejos activan las vías ATM, ATR, Rad17-RFC, entre otras, iniciando así cascadas de señalización que inducen la activación de p53 y otros sistemas que intervienen principalmente con Cdks y ciclinas. Lo anterior resulta en el arresto del ciclo celular en alguno de los puntos de control, la reparación del DNA o apoptosis (Sancar et al., 2004; Parrilla-Castellar et al., 2004; Lee & Paull, 2005).

4.3.1.4 Familia de cinasas PIKK

Las cinasas PIKK son un grupo de proteínas que consta de aproximadamente 2,547-4,128 aminoácidos, poseen un dominio cinasa ubicado en el carboxilo terminal que se encuentra flanqueado por otros dos dominios llamados FAT y FATC, ambos necesarios en la regulación de la actividad cinasa de estas proteínas. Su función principal es fosforilar cientos de proteínas encargadas de mantener la integridad del genoma a través del progreso del ciclo celular; entre sus representantes más destacados se encuentran ATM y ATR (Lovejoy & Cortez, 2009).

ATM se localiza predominantemente en el núcleo celular, siendo reclutado principalmente por el complejo MRN cuando ocurre la ruptura de la doble cadena de DNA o se presentan cambios en la estructura de la cromatina, aunque también se ha reportado su activación por la auto-fosforilación del residuo serina 1,981. Como resultado, ATM regula el progreso del ciclo celular en un punto de control determinado, al fosforilar: (1) p53 en el punto de control *G1-S*; (2) SMC1 en *intra-S*; (3) la cinasa Chk2 en *G2-M*. Ofreciendo el tiempo necesario entre la reparación del DNA y la división celular (Ambrose & Gatti, 2013).

ATR es una proteína esencial para la viabilidad de células en replicación, ésta es activada durante la fase *S* de cada ciclo replicativo con el propósito de regular el inicio de la replicación del DNA, ejecutar sistemas de reparación del mismo y prevenir el inicio prematuro de la mitosis. Su activación se produce en respuesta a una gran variedad de lesiones al DNA, entre las que se incluyen: aductos, entrecruzamientos, rupturas de la doble cadena, estrés replicativo y principalmente huecos de una sola hebra (ssDNA). El reclutamiento de ATR en presencia de ssDNA ocurre gracias a la proteína ATRIP, la cual reconoce indirectamente ssDNA al interactuar con la proteína de replicación A (RPA), lo anterior da lugar a la activación de ATR y una gran variedad de vías de señalización se coordinan para reparar el DNA; además, el ciclo celular es detenido en los puntos de control *intra-S* o *G2-M* al fosforilar Chk1 (Cimprich, & Cortez, 2008).

4.3.1.5 Cinasas Chk1 y Chk2

Chk1 y Chk2 son cinasas serina/treonina sin ninguna relación estructural, aunque ambas son activadas en respuesta a una gran variedad de lesiones genotóxicas y su función principal es retransmitir señales de las cinasas ATM y ATR. Chk2 es una proteína estable durante todo el proceso del ciclo celular y aparenta no estar activa en ausencia de daño al DNA; no obstante, al ocurrir la ruptura de la doble cadena de DNA, esta proteína es activada río abajo de la cascada de señalización desencadenada por ATM. En contraste, Chk1 es una proteína lábil restringida a las fases *S* y *G2*, la cual es activada río abajo de la cascada de señalización producida por ATR en respuesta a ssDNA, aunque su actividad se ha reportado en ciclos celulares sin perturbación, probablemente regulando la integridad del DNA durante la replicación. En cualquiera de estos dos casos, Chk1 y Chk2 convergen en la vía de las fosfatasa Cdc25, un tipo de proteínas que regulan la transición del ciclo celular al activar Cdks. La fosforilación de Cdc25 por Chk1 o Chk2, inhibe su actividad y previene la activación de Cdks (Bartek & Lukas, 2003; Reinhardt & Yaffe, 2009).

4.3.1.6 Complejo promotor de la anafase o ciclosoma

El complejo promotor de la anafase o ciclosoma (APC/C) es un complejo E3 ubiquitina ligasa encargado esencialmente de ensamblar cadenas poliubiquitina sobre ciclinas, marcándolas de esta manera para su destrucción por el proteosoma 26S. APC/C se compone de al menos 12 subunidades básicas y dos cofactores adicionales (Cdc20 y Cdh1) que interactúan con APC/C y regulan su actividad. A través de este complejo y

la intervención de sistemas de control y reguladores del mismo, APC/C modula y regula la actividad de ciclinas y otros componentes esenciales para el progreso del ciclo celular, al marcarlos y destruirlos en etapas en las que ya no son necesarios o interfieren con procesos clave (Manchado et al., 2010). Otros componentes ubiquitina ligasa con funciones similares a APC/C, incluyen al complejo SCF y proteínas culina (Vodermaier, 2004).

4.3.1.7 Cinasas *Polo-like*

Las cinasas *Polo-like* (Plks) se caracterizan por tener un amino terminal cinasa y dos carboxilos terminales con dominios *Polo-box* (PB1 y PB2) que emplean para unirse a sus respectivos sustratos, aunque también poseen un dominio *D-box*, el cual ayuda a regular su marcaje y destrucción a través de APC/C. La familia de Plks incluye Plk1, Plk2 y Plk3; en donde Plk1 participan especialmente en el inicio de la mitosis, contribuyendo en la activación del complejo ciclina-B/Cdk1; asimismo, estas proteínas ayudan en la maduración de los centrosomas, la formación del huso mitótico y la *citocinesis* (Lowery et al., 2005; Archambault & Glover, 2009).

4.3.1.8 Cinasas Aurora

Aurora es el nombre que se le ha dado a una familia de proteínas cinasas serina/treonina que regulan diferentes procesos de la división celular (estructura y función de los centrosomas, montaje del huso, alineación de los cromosomas y la *citocinesis*). Su activación depende de la interacción con cofactores (BORA, TPX2, INCENP, etc.) y la fosforilación de una secuencia hidrofóbica presente en el carboxilo terminal. En células de mamíferos se han identificado al menos tres tipos de Auroras (A, B y C). Durante la mitosis, esta familia de proteínas regula la estructura y función del citoesqueleto y los cromosomas, así como la interacción de estos dos con el cinetocoro; además, son requeridas durante la *citocinesis* y también regulan la señalización del punto de control de montaje del huso mitótico (Carmena & Earnshaw, 2003).

4.3.2 Fases del ciclo celular eucarionte

La secuencia de eventos que ocurren cuando una célula es estimulada para crecer y dividirse, usualmente se organiza en cuatro fases: *G0/G1*, *S*, *G2* y *M*. El período de síntesis del DNA (fase *S*) y la mitosis (fase *M*), se encuentran separadas por intervalos o brechas en los que se monitorea el ambiente celular externo e interno y se favorece el crecimiento celular, estos periodos son llamados *G1* y *G2*. En cultivo, el tiempo típico para que todas las fases se completen es de aproximadamente 24 horas. En conjunto las fases *G1*, *S* y *G2* son llamadas *interfase*, la cual ocupa 23 horas del tiempo total mientras que la fase *M* sólo emplea una hora para completar los estadios en los que se encuentra subdividida (*profase*, *prometáfase*, *metáfase*, *anafase*, *telofase* y *citocinesis*) (Figura 6) (Lodish et al., 2013).

4.3.2.1 Fase *G0/G1*

La primera fase es conocida como un estado especializado de reposo nombrado *G0*, en este período la célula entra en un estado quiescente en el que puede permanecer por días, semanas e incluso años. Generalmente esta etapa es inducida por las condiciones desfavorables del ambiente o señales extracelulares propias del organismo, el cambio favorable de estas condiciones y el estímulo inducido por mitógenos, provocarán que la célula entre en la fase conocida como *G1*; en la cual, la célula retrasa o niega el progreso del ciclo celular con el fin de tener el tiempo suficiente para sintetizar todas las proteínas necesarias, alcanzar el tamaño adecuado y monitorear las condiciones internas y externas del ambiente, asegurándose de que sean ideales antes de continuar. Esto hace a esta etapa variable en el tiempo y dependiente de los diversos parámetros ambientales; además, si las condiciones no son idóneas, la célula regresará a la fase *G0*, por lo que actualmente resulta difícil diferenciar las fases *G0* y *G1*, así que ambas etapas suelen nombrarse *G0/G1* (Alberts et al., 2015).

La interacción de mitógenos con la superficie celular desencadena múltiples cascadas de señalización que favorecen el inicio del ciclo celular. Entre las más importantes se encuentra Ras, la cual beneficia la activación de la vía de señalización de proteínas cinasas mitógeno-activado (MAPK), permitiendo un incremento en la producción de proteínas reguladoras de la transcripción, entre las que se incluye Myc. Esta última favorece el incremento en la expresión de genes que codifican ciclinas D y como consecuencia, la actividad de Cdk4 y Cdk6 (Adhikary & Eilers, 2005).

El complejo ciclina-D/Cdk4/Cdk6 activado es capaz de fosforilar Rb (entre otras proteínas), lo anterior termina con la represión del gen E2F, induciéndose la transcripción del mismo, además de los correspondientes a la ciclina E, ciclina A, Cdc25A, entre otros (Van Den Heuvel & Dyson, 2008). La actividad de Cdc25A permite la activación del complejo ciclina-E/CDK2; este último promueve el progreso de la fase *G1* a *S* al: (1) continuar fosforilando Rb; (2) incrementar la actividad de la histona acetiltransferasa; (3) regular la transcripción de histonas necesarias en la fase *S*; (4) iniciar el proceso de duplicación de los centrosomas a través de la fosforilación de NPM1 en la fase tardía de *G1* (Hwang & Clurman, 2005). De manera adicional, durante la transición de la fase *G1* a *S* se ha observado que el complejo ciclina-E/Cdk2 coopera con Cdc6 permitiendo la formación de los complejos pre-replicativos (preRC), los cuales serán activados por el complejo ciclina-A/Cdk1/Cdk2 y otras proteínas durante la fase *S* (Coverley et al., 2002).

4.3.2.2 Fase de síntesis *S*

Una vez se alcanza el final de la fase *G1*, existe un punto de restricción (R) en el que el progreso del ciclo celular ya no depende del estímulo inducido por mitógenos, si no del sistema de control del mismo. Al superar este punto la célula comienza con la fase de síntesis (*S*), etapa en la que deberá duplicar sus cromosomas una sola vez y con extrema precisión (Alberts et al., 2015). Conforme el ciclo progresa hacia la fase *S* la

forma monomérica de la ciclina E es degradada por la proteína Cul-3, mientras que el complejo ciclina-E/CDK2 es destruido por el complejo ubiquitin ligasa SCF^{Fbw7} (Minella & Clurman, 2005). Esto permite al complejo ciclina-A/Cdk1/Cdk2 controlar los eventos de la fase S, donde su activación favorecerá el inicio de la replicación del DNA una vez cada ciclo (Coverley et al., 2002; Katsuno et al., 2009).

Para que el último evento acontezca de manera ordenada y exitosa, la duplicación de los cromosomas ha sido dividida en dos pasos que ocurren en diferentes tiempos del ciclo celular. El primero de estos pasos es llamado concesión de licencias de replicación, y toma lugar durante la etapa temprana de G1 cuando los complejos de DNA helicasas (MCM) son cargados en el origen de replicación para formar los preRC. Este paso es llevado a cabo por el complejo de reconocimiento del origen (ORC) y el complejo ciclina-E/Cdk2, además de las proteínas Cdc6 y Cdt1 (Arias & Walter, 2007). El segundo paso ocurre al inicio de la fase S, cuando el complejo MCM es activado por los complejos Cdc7-Dbf4 y ciclina-A/Cdk1/Cdk2, iniciando de esta manera el desempaquetamiento y replicación del DNA. Durante este proceso el complejo ciclina-A/Cdk1/Cdk2 media la translocación y degradación de Cdc6, evitando que los orígenes de replicación sean cargados nuevamente con preRC durante las fases S y G2 (Petersen et al., 1999; Masai et al., 2010).

4.3.2.3 Fase G2

Al final de la fase S cada cromosoma replicado consiste de un par de cromátidas hermanas unidas a lo largo de su longitud. La cohesión mantenida entre las cromátidas hermanas depende del complejo proteico llamado cohesin, el cual consiste de cuatro subunidades (Smc1, Smc3, Scc1 y Scc3) que son depositadas a lo largo de cada cromátida hermana conforme el DNA es replicado en la fase S. Al concluir con esta etapa, la célula entra en la segunda etapa de brecha o crecimiento conocida como G2, durante este período se llevará a cabo la síntesis de energía y biomasa necesaria para concretar la mitosis, y la mayoría de los orgánulos celulares serán reconstruidos o modificados (citoesqueleto, aparato de Golgi, etc.) (Lodish et al., 2013).

En la coordinación de estos eventos y los que tomaran lugar durante la mitosis, participan los complejos ciclina-A/Cdk2 y ciclina-B/Cdk1 (Mitra & Enders, 2004). En muchas estirpes celulares las síntesis de ciclina B incrementa durante las etapas G2 y M, lo que lleva a la acumulación del complejo ciclina-B/Cdk1 conforme la célula se aproxima a la mitosis; sin embargo, durante la fase G2 este complejo es mantenido en el citoplasma por la acción de la proteína de exporte CRM1 (Alberts et al., 2015). Lo anterior permite al complejo ciclina-B/Cdk1 mantenerse en citoplasma durante la fase G2 e interactuar con la proteína de entrecruzamiento Filamin-A (FLNa), provocando un decaimiento en la actividad de esta proteína para entrecruzar actina al fosforilarla en el residuo serina 1,436, fenómeno que provocara cambios en el citoesqueleto de actina y el aparato de Golgi (Cukier et al., 2007). Por otra parte, una fracción del complejo se localiza en la matriz mitocondrial, en donde fosforilara al

complejo I (CI) de la maquinaria productora de ATP de la cadena respiratoria. Esto resulta en un incremento en el consumo de oxígeno y la generación de ATP, que será necesario para cubrir la demanda bioenergética requerida durante la mitosis (Wang et al., 2014).

4.3.2.4 Mitosis *M*

En la etapa tardía de la fase *G2* el complejo ciclina-B/Cdk1 es fosforilado en: (1) el residuo treonina 161 de la subunidad Cdk1 por la acción de la CAK compuesta por la Cdk7, ciclina H y la proteína RING-finger MAT1; (2) la región CRM (señal de retención citoplasmática) de la subunidad ciclina B por la Cdk1 (S126 y S128) y Plk1 (S147), acción que bloquea el sitio de unión a CRM1, permitiendo el transporte del complejo dentro del núcleo a través de la proteína de transporte nuclear Importin β . Una vez en el núcleo, el complejo es inactivado por la proteína Wee1 y Mty1 al fosforilar la subunidad Cdk1 en los residuos tirosina 15 y treonina 14 respectivamente (Porter & Donoghue, 2003).

Al final de la fase *G2* el complejo ciclina-B/Cdk1 inactivo es acumulado en el núcleo celular, lugar en el que será activado por la acción de las fosfatasa Cdc25B y Cdc25C para dar comienzo a la mitosis (Boutros et al., 2007). Etapa del ciclo celular en la que ocurrirán tres eventos importantes: (1) la ruptura de la membrana nuclear y el montaje del huso mitótico; (2) la separación de los cromosomas; (3) la *citocinesis*. Debido al comportamiento de los cromosomas durante el tiempo en que ocurren estos eventos, tradicionalmente la fase *M* del ciclo celular ha sido subdividida en seis etapas:

1. *Profase*: en este período los cromosomas replicados comienzan a condensarse para formar las cromátidas hermanas, los centrosomas del huso mitótico son separados y la membrana nuclear comienza a romperse.
2. *Prometáfase*: ésta comienza con la abrupta ruptura de la membrana nuclear, el huso mitótico termina de ensamblarse y los microtúbulos de éste comienzan a anclarse a los cinetocoros de los cromosomas.
3. *Metafase*: las cromátidas son alineadas en el ecuador del huso mitótico (placa de la metafase) y los microtúbulos ejercen una ligera tensión entre éstas.
4. *Anafase*: hasta que todas las cromátidas han sido apropiadamente alineadas, el complejo APC/C ejecuta la señal que dará comienzo con la escisión de las moléculas que las mantienen unidas; al mismo tiempo, éstas son separadas lentamente al polo opuesto de cada huso mitótico debido a la tensión que ejercen los microtúbulos del mismo.
5. *Telofase*: cada conjunto de cromosomas independientes es condensado y una nueva membrana nuclear es formada alrededor de cada uno de éstos; además, un anillo de actina y miosina comienza a ser ensamblado en la zona media de los microtúbulos interpolares del huso.
6. *Citocinesis*: durante esta etapa el citoplasma es dividido en dos por la actividad del anillo contráctil de filamentos de actina y miosina, el cual formará un surco de escisión entre las dos células y generará la fuerza necesaria para separarlas.

4.3.2.4.1 Ruptura de la membrana nuclear y montaje el uso mitótico

Durante la *interface* los cromosomas duplicados se encuentran rodeados por la membrana nuclear, mientras que los centrosomas que formaran el uso mitótico están localizados en el citoplasma. Con el fin de que ambas unidades interactúen e inicie la segregación de los cromosomas, la membrana nuclear debe ser desmantelada durante la mitosis. La envoltura nuclear es una doble membrana con extensión al retículo endoplasmático, la capa interna de ésta se encuentra asociada con la lámina nuclear, una malla de filamentos compuesta por las proteínas nucleares de la lámina A, B y C (Lodish et al., 2013).

Al inicio de la mitosis el complejo ciclina-B/Cdk1 activo en núcleo debilitará las asociaciones entre la cromatina y la membrana nuclear, fosforilando principalmente residuos serina de los tres componentes que conforman la lámina nuclear, y de manera secundaria a componentes del complejo del poro nuclear (NPC), proteínas de la membrana nuclear interna (INM) y cromatina. Esto afecta severamente las interacciones que sostienen la arquitectura de la membrana nuclear y facilita la desintegración de la misma (Burke & Ellenberg, 2002). Otro blanco importante del complejo ciclina-B/Cdk1 activo durante la *profase* es el complejo de proteínas llamado condensin, este último se compone de cinco subunidades proteicas, dos de ellas con actividad ATPasa (SMC4 y SMC2) que al fosforilarse hidrolizan ATP e interactúan con otras proteínas del complejo para iniciar la condensación de los cromosomas (Hirano, 2002).

Por otra parte, el uso mitótico es un arreglo bipolar de microtúbulos que se asocia con los cromosomas durante la *prometáfase*. Sus funciones dependen de un gran número de proteínas motoras que forman dos grandes familias: proteínas kinesin-related, las cuales se encuentran al final de la parte positiva de los microtúbulos; y dineínas, que se asocian a la parte negativa de los microtúbulos (Alberts et al., 2015). Los eventos necesarios para el montaje del uso toman lugar durante la etapa tardía de la fase *G1*, período en el que como anteriormente se mencionó, el complejo ciclina-E/CDK2 promueve la duplicación de los centrosomas, evento que continuara durante las fases *S* y *G2*. Al iniciar la mitosis, los complejos ciclina-A/Cdk2 y ciclina-B/Cdk1 se coordinan para fosforilar proteínas kinesin-related, estimulando la separación de los centrosomas en el citoplasma; asimismo, se ha observado que la cinasa Aurora A y ciertas Plks colaboran en la fosforilación de proteínas del centrosoma, ayudando en su separación y maduración durante la mitosis (De Boer et al., 2008; Wang et al., 2011; Lodish et al., 2013).

Durante la *prometáfase* los efectos del complejo ciclina-B/Cdk1 activo en núcleo culminan con la disociación de la membrana nuclear, lo anterior permitirá a los microtúbulos que emergen de los centrosomas interactuar con los cromosomas. Una gran variedad de proteínas actúa durante este proceso (MAPS, Aurora B, etc.) e incluso los cromosomas crean un microambiente que favorece la nucleación de los microtúbulos y su asociación con los cinetocoros (Alberts et al., 2015).

4.3.2.4.2 Separación de los cromosomas

Múltiples mecanismos generan la fuerza que moverá a los cromosomas una vez son anclados al uso mitótico; sin embargo, a lo largo de la mitosis tres de éstos sobresalen:

1. El primero de ellos está asociado con la cromatina que se encuentra a lo largo del microtúbulo del cinetocoro y con dirección al polo del huso. En gran parte, la fuerza que ayuda en la alineación y separación de los cromosomas proviene de proteínas del cinetocoro (complejo Ndc80) que se encuentran en la parte positiva del microtúbulo, éstas se despolimerizan y generan una fuerza con dirección al polo del cinetocoro.
2. La segunda fuerza es producida por un mecanismo llamado flujo de los microtúbulos, donde los microtúbulos generan una fuerza de tensión en dirección a su respectivo centrosoma al ser empujados y al mismo tiempo desmantelados en la parte negativa. La fuerza necesaria para el empuje es generada, en parte, por proteínas motoras de la parte negativa del polo en despolimerización (dineínas). Durante la *metafase* la adición de tubulina en la parte positiva del microtúbulo compensa la pérdida en la parte negativa del mismo a consecuencia del flujo de los microtúbulos.
3. La tercera fuerza es llamada viento polar o fuerza de eyección polar, proteínas kinesin-related ubicadas en los brazos de los cromosomas y con dirección a la parte positiva de los microtúbulos, interactúan con los mismos transportando a los cromosomas lejos de los polos del uso mitótico.

En conjunto, estas tres fuerzas y la acción de múltiples complejos proteicos comprenden el mecanismo que alinea a las cromátidas hermanas a lo largo de la placa metafásica durante la *prometafase* y *metafase* (Alberts et al., 2015).

La transición de la *metafase* a la *anafase* se encuentra gobernada por el punto de control de montaje del huso, el cual emplea a las proteínas Mad2, BubR1, Bub3 y MPS1 para detectar cinetocoros libres durante la *metafase* y mantener inactivo al complejo APC/C antes de la *anafase*. Una vez asegurada la correcta alineación de los cromosomas y el adecuado anclaje de los microtúbulos a los cinetocoros, el punto de control de montaje del huso es completado y la separación de los cromosomas comienza con un proceso aparentemente accionado por el incremento en el Ca^{+2} intracelular, el cual iniciara una secuencia de eventos que activaran al complejo APC/C. Este último se encargará de marcar y destruir al inhibidor de la proteína separase (securin), permitiéndole a esta proteína cortar las subunidades del complejo cohesin, liberando de esta manera a las cromátidas hermanas e iniciando la segregación de los cromosomas en un proceso en el que también intervienen las fuerzas de separación antes mencionadas (Pines, 2011).

4.3.2.4.3 Citocinesis

La separación de los cromosomas representa el final de la *anafase* y la transición a la *telofase*, en esta etapa el uso mitótico es desmantelado y una nueva membrana

nuclear se forma alrededor de cada conjunto de cromosomas. Lo anterior es posible gracias a la activación de fosfatasa y del complejo APC/C al inicio de la *anafase*; el cual, además de promover la acción de la proteína separase, también interactúa con CDH1, un cofactor que media la degradación de una gran variedad de proteínas mitóticas (ciclinas A y B, Plks, cinasas Aurora A y B, entre otras) y de replicación del DNA (Cdc6 y Skp2), evitando sus funciones al concluir la *anafase* y durante la fase *G0/G1* de un nuevo ciclo celular (Malumbres & Barbacid, 2009). En la etapa tardía de la *telofase* el citoplasma y los orgánulos son distribuidos entre las dos futuras células; además, en la zona media del uso mitótico diversas proteínas comienzan a ensamblar un anillo contráctil compuesto de actina y miosina. Durante la citocinesis, la GTPasa RhoA controla la contracción gradual de este anillo y la fusión de vesículas intracelulares con la membrana plasmática, ambos acontecimientos escinden a la célula en dos y representan el fin de un ciclo de replicación celular (Alberts et al., 2015).

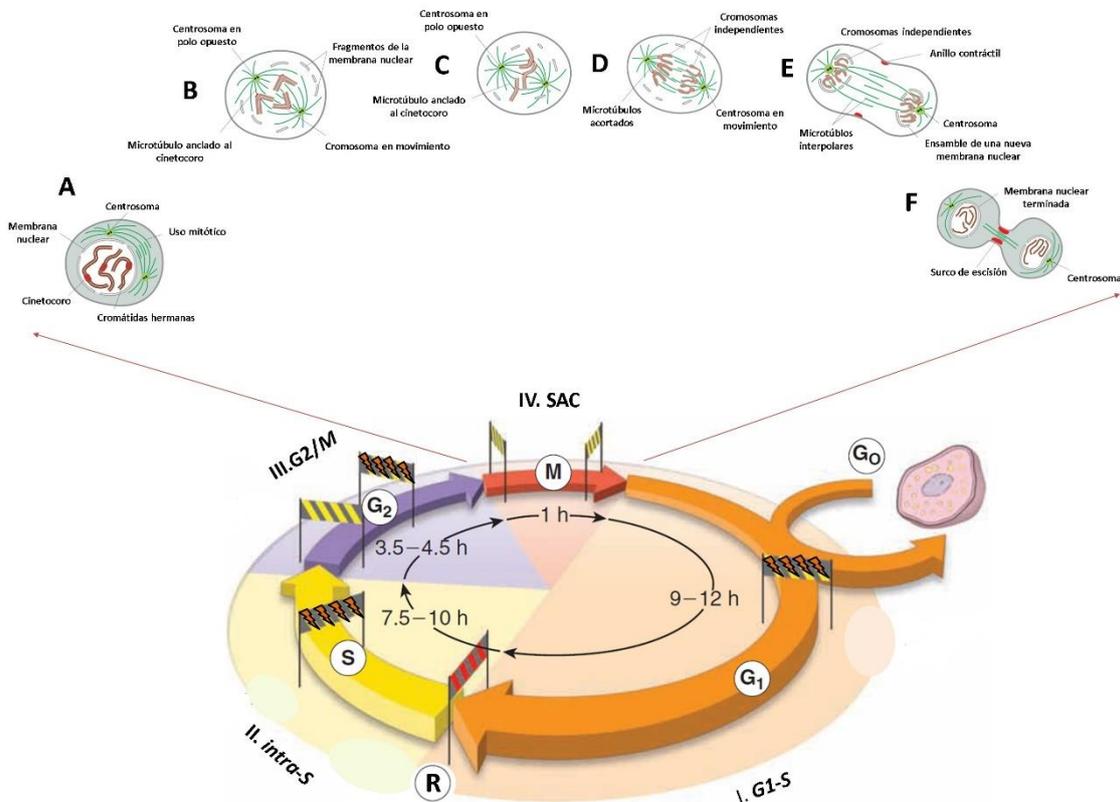


Figura 6: Esquema del ciclo celular eucarionte, en la figura se representan las cuatro fases del ciclo celular (*G0/G1*, *S*, *G2* y *M*) así como el tiempo aproximado que toma completar cada una de éstas; de la misma manera, se aprecia el punto de restricción (R) con un banderín rojo; los puntos de control *G1-S* (I.), *intra-S* (II.), *G2/M* (III.) y el de montaje del huso (IV.SAC) con banderines amarillos, además de las etapas en las que es importante censar el daño al DNA (banderines naranjas). En la parte superior se encuentran las seis etapas en las que se ha subdividido la fase *M* del ciclo celular: (A) *profase*, (B) *prometafase*, (C) *metafase*, (D) *anafase*, (E) *telofase* y (F) *citocinesis* (Tomado y modificado de Alberts et al., 2015; Pawlina, 2016).

4.4 Subversión del ciclo celular durante infecciones virales

Debido a su naturaleza parasitaria y la falta de maquinaria para la replicación del genoma, es común que los virus subviertan alguno de los estadios del ciclo celular. Esto resulta en la proliferación e inmortalización de células quiescentes o en el arresto de alguna etapa del ciclo, fenómenos que facilitarán condiciones especiales en favor de la replicación viral, evasión de la respuesta inmune y en algunas ocasiones la persistencia viral (De Beeck & Caillet-Fraquet, 1997). Para cumplir con estos objetivos los virus afectan la expresión y acción de una gran variedad de reguladores del ciclo celular (Cdks y ciclinas), crean señales de daño al DNA o intervienen en el proceso de segregación de los cromosomas, tarea que regularmente cumplen gracias a proteínas virales con capacidad para mimetizar e interferir con la compleja red de señalización del ciclo celular; aunque, en ciertos virus de DNA se ha demostrado que la presencia del genoma es suficiente para generar una respuesta de daño al DNA celular (Chaurushiya & Weitzman, 2009).

De acuerdo con el genoma y la estrategia de replicación, existen tres categorías de entes virales con capacidad para interferir con el ciclo celular. La primera es conformada por virus de DNA, que en relación al tamaño del genoma interfieren con el ciclo celular a través de dos estrategias básicas. Una de ellas consiste en inducir un estado quiescente en una etapa específica del ciclo celular, y usualmente se encuentra asociada a entes virales con un gran genoma de DNA y el potencial considerable para codificar diferentes proteínas. Un ejemplo habitual de esta estrategia se presenta en herpesvirus, donde la proteína viral ICP27 ha mostrado reducir los niveles de mRNA de la ciclina D1, negando de esta manera el progreso del ciclo celular en la fase *G0/G1* (Song et al., 2001). La otra estrategia de control del ciclo celular es típica de virus con un genoma de DNA pequeño y capaces de codificar proteínas que interfieren directamente con los componentes de regulación del ciclo celular. Los ejemplos más comunes incluyen a las oncoproteínas virales E7 y E1A de HPV y adenovirus respectivamente, ya que ambas han mostrado interferir con pRb acelerando la transición a la fase *S* del ciclo y promoviendo la proliferación celular (Felsani et al., 2006).

La segunda categoría de entes virales que ha mostrado interferir con el ciclo celular incluye a los retrovirus, donde el representante más destacado es VIH. La proteína viral Vpr que posee este virus es una de las más estudiadas y versátiles para interferir con los mecanismos de regulación del punto de control *G2-M*, lo que resulta en un arresto en este periodo, limita la expansión clonal de linfocitos-T e incrementa el número de provirus integrados (Davy & Doorbar, 2007). La tercera y última categoría se compone por virus de RNA de cadena positiva y negativa. En el caso de virus de RNA de cadena positiva, la proteína N del virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV) ha manifestado interactuar con p53, produciendo un arresto en las fases *S* y *G2/M*, además de la subsecuente muerte celular (Ding et al., 2014). En contraste, virus de RNA de cadena negativa como MeV, son capaces de inmunosuprimir linfocitos-T al interferir con pRb, y posiblemente con los complejos ciclina-D/Cdk4/Cdk6 y ciclina-

E/Cdk2, negando el progreso del ciclo celular en la fase *G0/G1* (Naniche et al., 1999; Engelking et al., 1999).

5. Antecedentes

Las infecciones por HRSV generalmente se limitan a AECs; a pesar de esto, el virus ha mostrado infectar y alterar las funciones de otras estirpes celulares, como células dendríticas y macrófagos alveolares (Collins, 2008). Debido a su amplia distribución en órganos y tejido conectivo, los macrófagos constituyen una de las primeras líneas de defensa en la respuesta inmune contra patógenos, ya que fagocitan y destruyen agentes microbianos, así como células muertas o apoptóticas; además, producen citosinas inflamatorias que reclutan a otras células del sistema inmune y tienen la función de activar linfocitos T a través del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II) (Abbas et al., 2015).

Infectar y alterar las funciones de células diferenciadas como las del sistema inmune, es un paso clave en el establecimiento de una infección viral persistente (Oldstone, 2006; Flint et al., 2015), y a pesar que de la infección crónica con HRSV no se ha demostrado, algunos estudios revelan la presencia del genoma viral en aspirados nasofaríngeos de pacientes con EPOC (Sikkel et al., 2008) y en lavados bronco alveolares de niños con síntomas agudos y severos de LRTI (Midulla et al., 1993). Asimismo, experimentos *in vitro* demuestran que aislados de macrófagos alveolares humanos son capaces de soportar la replicación prolongada del virus sin efectos aparentes en la viabilidad celular, sugiriendo que éste tipo de células puedan ser un reservorio importante para el establecimiento de una infección persistente con HRSV (Panuska et al., 1990).

En el laboratorio de virología de la facultad de medicina de la UNAM se ha establecido y caracterizado un modelo *in vitro* de macrófagos murinos P388D1 infectados persistentemente con HRSV. Como anteriormente se mencionó, este modelo se caracteriza por presentar un alto porcentaje de células positivas para antígenos de HRSV, un descenso en la producción de progenie viral infecciosa y la ausencia de la citopatología celular característica del virus (Sarmiento et al., 2002). Algunos estudios llevados a cabo sobre éste cultivo han revelado que la infección persistente con HRSV modifica la fagocitosis mediada por receptores Fcγ, además de afectar la actividad biológica del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), y el perfil de expresión de interleucinas y proteínas anti-apoptóticas (Guerrero-Plata et al., 2001; Nakamura-López et al., 2011; Gaona et al., 2014).

La subversión del ciclo celular durante infecciones virales es un fenómeno que se ha relacionado con estrategias de replicación únicas que conducen al establecimiento de una infección viral persistente (Davy & Doorbar, 2007; Strauss & Strauss 2008). Estudios *in vitro* revelan que durante la infección aguda con HRSV, cultivos primarios de células del epitelio bronquial humano (HBEpC) y líneas de células epiteliales (A549) se encuentran arrestadas en la fase *G0/G1* del ciclo celular. En el transcurso de la experimentación, éste fenómeno se relacionó con la expresión de TGF- β, la

translocación de la ciclina D del nucleó al citoplasma y una disminución en la abundancia de la Cdk4 y Cdk1 (Gibbs et al., 2009; Wu et al., 2011). Además, la transfección de la proteína viral M de HRSV ha mostrado inducir un arresto en la fase *G0/G1* de células A549, y en las fases *G0/G1* y *G2/M* de HBEpC, a través de un proceso que depende de la activación de p53 y p21 (Bian et al., 2012).

6. Justificación

Con el fin de establecer una infección persistente los virus modifican el progreso del ciclo celular y evaden la respuesta inmune del hospedero (Wang et al., 2003; Davy & Doorbar, 2007; Rice & Kimata, 2015). HRSV es un virus capaz subvertir el ciclo celular durante una infección aguda; sin embargo, muy pocos estudios se han enfocado al análisis del ciclo celular durante el fenómeno de persistencia viral, por lo que se desconoce el talento y los efectos que pueda producir la subversión del mismo durante este tipo de infecciones virales. Asimismo, estudiar los cambios que produce la persistencia viral de HRSV en procesos celulares como el ciclo celular, aportaría información relevante que ayudaría a evidenciar y comprender los mecanismos celulares e inmunológicos por los cuales HRSV podría establecer una infección persistente, proporcionando información que a largo plazo ayude en el desarrollo de estrategias para su tratamiento y prevención. Es debido a esto que el presente trabajo se encuentra enfocado en evaluar el progreso del ciclo celular de macrófagos murinos P388D1 infectados persistentemente con HRSV.

7. Hipótesis

La persistencia del virus sincitial respiratorio humano modifica el ciclo celular de macrófagos murinos P388D1.

8. Objetivos

8.1 General

- Evaluar el progreso del ciclo celular de macrófagos P388D1 infectados persistentemente con HRSV.

8.2 Particulares

- Analizar el progreso del ciclo celular de macrófagos murinos P388D1 infectados persistentemente con HRSV.
- Evaluar la proliferación de macrófagos P388D1 infectados persistentemente con HRSV.

9. Materiales y métodos

9.1 Líneas celulares

En el estudio del ciclo celular se empleó la línea celular murina (*Mus musculus*) P388D1 (M ϕ N) (American Type Culture Collection ATCC: CCL-46) adquirida por Dawe

& Potter (1957), así como su variante infectada persistentemente con HRSV (MφP) obtenida y caracterizada por Sarmiento et al (2002). Los cultivos celulares de MφN y MφP se propagaron en medio RPMI 1640 (GIBCO/BRL, Grand Island, NY) suplementado al 1% v/v con antibióticos (penicilina-estreptomicina 5000u/ml) y suero fetal bovino (FBS) al 5% v/v, éstos se mantuvieron a 37°C, 80% de humedad y 5% de CO₂ en una incubadora Thermo Electron Corporation modelo 3110.

9.2 Detección del antígeno viral HRSV

Veinticuatro horas posteriores a la siembra, aproximadamente 5×10^5 células de MφP se cosecharon con 1 ml de PBS y se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos; después, el sobrenadante fue descartado y al pellet celular se le adicionaron 100 µl de una solución de paraformaldehído al 4%, para después ser incubado en hielo durante 15 minutos con una agitación cada 5 minutos. Al concluir el período de incubación las muestras se centrifugaron (3000 rpm/ 3 minutos) y lavaron con 200 µl de PBS; en seguida, cada muestra se incubó 15 minutos a 37 °C con 100 µl de una solución de saponina al 0.3%; posterior a este paso, nuevamente las muestras se centrifugaron y lavaron con 200 µl PBS para luego ser resuspendidas en 100 µl de una solución de bloqueo (suero de neonato al 5 % en PBS), e incubarse en hielo durante 30 minutos con una agitación cada 7 minutos. Al concluir este proceso nuevamente cada muestra se centrifugó para después ser incubada durante 30 minutos a 4°C y protegida de la luz, en 50 µl de una solución de anticuerpo policlonal: α-RSV conjugado con FITC (IMAGE™ Respiratory Syncytial Virus, OXOID) diluido en solución de suero de neonato al 3% (13:100). Finalmente se efectuaron dos lavados vía centrifugación con 200 µl de PBS y cada muestra se analizó por citometría de flujo FACScan (Becton Dickinson) y el software CellQuest. Los resultados correspondientes se procesaron con el software FlowJo vX.0.7 y se representaron gráficamente como porcentaje de células que expresan antígeno viral.

9.3 Análisis del ciclo celular

Para determinar la distribución de células en las diferentes fases del ciclo celular de MφN y MφP, a estos dos cultivos se les permitió alcanzar una confluencia relativa del 80%-90%, esto con el fin de detener la proliferación celular y obtener el mayor número de células en la fase *G0/G1* del ciclo celular (Nelson & Daniel, 2002). Posteriormente, los cultivos se cosecharon e independientemente se sembraron 5×10^5 células/pozo de MφN y MφP en sus respectivas placas de seis pozos, a éstas se les añadió 1 ml RPMI al 5% de FBS y fueron incubadas a 37°C, 80% de humedad y 5% de CO₂. Al momento de la siembra (T0) y transcurridas 24, 48 y 72 horas posteriores a ésta, se realizó una cosecha con 2 ml de PBS; después, cada muestra se centrifugó a 1200 rpm y 4°C durante 5 minutos. Al concluir con este paso, se adicionaron 500 µl de etanol al 70% (-20°C) y las muestras se incubaron durante 1 hora a -20°C. En seguida, a cada muestra se le adicionaron 2 ml de PBS y nuevamente se centrifugaron con las mismas condiciones para después ser incubadas durante 30 minutos a 4°C y protegidas de la luz, con 100 µl de 7-aminoactinomicin D (7-AAD) (1µg/µl). Después

de concluir con el período de incubación, a cada muestra se le agregaron 500 µl de PBS e inmediatamente fueron analizadas por citometría de flujo FACScan (Becton Dickinson) y el software CellQuest. Más tarde, la distribución del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular se determinó con el software FlowJo vX.0.7 y los resultados correspondientes se representaron con histogramas.

9.4 Evaluación de la proliferación celular

De manera independiente 2×10^6 células de MφN y MφP se suspendieron en 1.9 ml de medio RPMI sin FBS, después se les adicionaron 10 µl diacetato de carboxifluoresceína succinimidil éster (CFDA-SE) (stock 5mM) diluidos en 90 µl de PBS y se incubaron a 37°C durante 10 minutos con agitación cada 2 minutos. Una vez concluido el período de incubación, a las muestras se les adicionó 2 ml de medio RPMI al 10 % de FBS y cada una se centrifugó a 1200 rpm y 4°C durante 5 minutos, el sobrenadante fue descartado y el paso anterior fue repetido nuevamente. Posteriormente se tomaron alícuotas para independientemente sembrar 5×10^5 células/pozo de MφN y MφP en sus respectivas placas de seis pozos. Finalmente, cada muestra se analizó por citometría de flujo FACScan (Becton Dickinson) y el software CellQuest, antes de sembrarse (T0), 24, 48 y 72 horas posteriores a la siembra. Tiempo después el número de células de cada generación se obtuvo con el software FlowJo 7.6.3 y la distribución hipotética de la fluorescencia de CFSE se representó gráficamente con un histograma. Además, se calculó el índice de proliferación (Pi) y división (Di) de acuerdo con las formulas propuesta por Roederer (2011).

$$P_i = \frac{\sum_1^i (i) \left(\frac{N_i}{2^i}\right)}{\sum_1^i \frac{N_i}{2^i}} \qquad D_i = \frac{\sum_0^i (i) \left(\frac{N_i}{2^i}\right)}{\sum_0^i \frac{N_i}{2^i}}$$

Donde:

i : número de la generación (0 corresponde a una población sin dividir).

N_i : número de células de la generación i .

9.5 Análisis estadístico

A menos que se indique lo contrario los datos se muestran como la media aritmética \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas entre los grupos se determinaron con una prueba de t-student elaborada con el programa GraphPad Prism 5.03. Las diferencias denotadas con *, se consideraron significativas cuando se obtuvo un valor de $P < 0.05$ y las indicadas con **, corresponden a un valor de $P < 0.01$.

10. Resultados

10.1 Antígeno viral HRSV

Veinticuatro horas posteriores a la siembra de M ϕ N y M ϕ P se procedió a comprobar el porcentaje de células que expresaban el antígeno viral de HRSV mediante inmunofluorescencia directa por citometría de flujo. En el cultivo de M ϕ N el 99.27% \pm 0.38% del total de la población se encontró negativa en la expresión del antígeno viral HRSV (Figura 7a), mientras que en el cultivo de M ϕ P 93.93% \pm 2.46% del total poblacional expresaba antígenos virales de HRSV (Figura 7b).

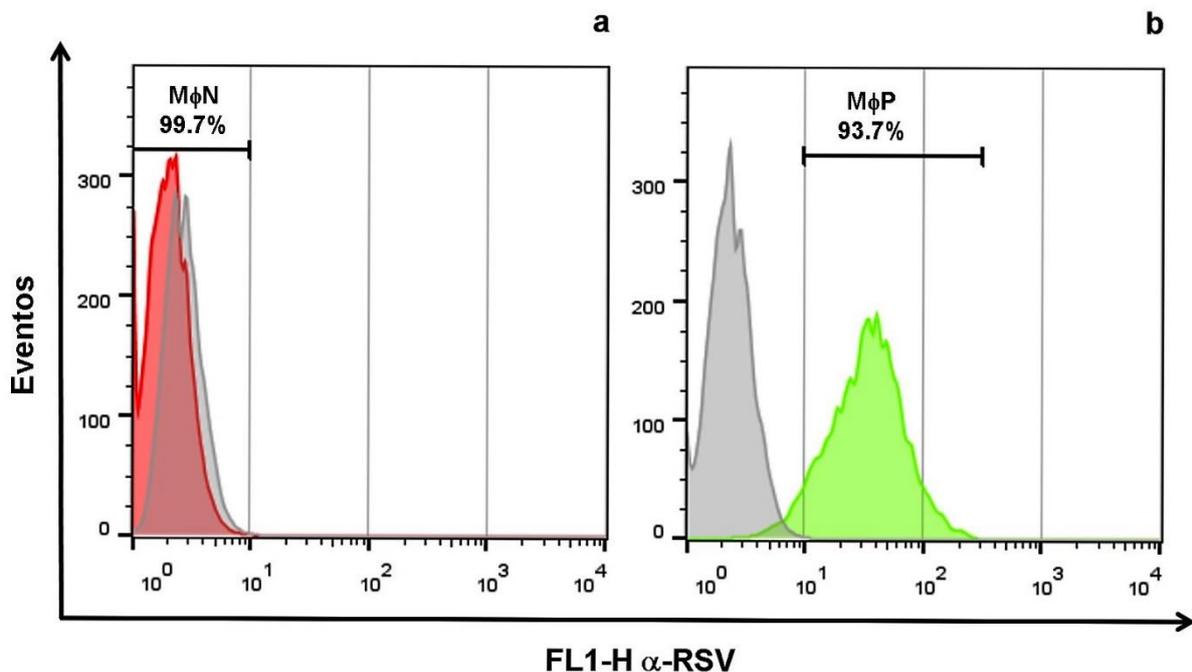


Figura 7: Histograma del análisis de antígeno viral HRSV aplicado a M ϕ N y M ϕ P. En la figura se aprecia la intensidad de fluorescencia del anticuerpo policlonal α -RSV conjugado con FITC (FL1-H α -RSV) contra el número de eventos registrados en un ensayo representativo. (a) El área bajo la curva en color gris representa el control negativo de autofluorescencia, mientras que el color rojo corresponde a M ϕ N y el verde a M ϕ P (b).

10.2 Ciclo celular

Con el fin de analizar el efecto de la persistencia viral de HRSV en el progreso del ciclo celular de M ϕ P, previo al inicio de los experimentos a este cultivo y al no infectado (M ϕ N) se les sincronizó en la fase *G0/G1* mediante inhibición por contacto (IC). Después, las células fueron sembradas a una baja densidad y posteriormente cosechadas al momento de la siembra (T0), 24, 48 y 72 horas posteriores a ésta. En seguida las muestras fueron sometidas a un proceso de tinción con 7-AAD, un compuesto químico con una gran afinidad por el DNA. De esta manera el material tratado con 7-AAD incorpora una cantidad del compuesto que es proporcional a la cantidad de DNA celular; además, el compuesto es fluorescente, por lo que el material teñido con él puede ser analizado por citometría de flujo y la intensidad de

fluorescencia captada será igualmente proporcional a la cantidad de DNA celular. Aunque en una población celular puede identificarse al menos 3 subpoblaciones con una cantidad de DNA diferente, aquellas con un contenido diploide ($2n$), otras con el doble de contenido ($4n$) y las de estado intermedio (Nunez, 2001). A partir de este principio las muestras cosechadas y teñidas en los tiempos antes mencionados se analizaron por citometría de flujo. Los histogramas obtenidos mediante este proceso fueron cuantitativamente analizados usando un software de ajuste de curvas que permitió diferenciar entre las fases $G0/G1$ ($2n$), S y $G2/M$ ($4n$), además de determinar el porcentaje de células correspondiente a cada fase del ciclo celular (Figura 8).

En el tiempo determinado $T0$, el análisis de la distribución de células dentro de las diferentes fases del ciclo celular de $M\phi N$ registró un promedio igual a $60.97\% \pm 9.69\%$ para la fase $G0/G1$, $17.63\% \pm 3.93\%$ en la fase S y $6.95\% \pm 0.99\%$ en la fase $G2/M$. En el caso de $M\phi P$ durante esta etapa el cultivo manifestó un promedio de $63.97\% \pm 9.81\%$, $16.84\% \pm 6.95\%$ y $9.62\% \pm 7.54\%$ para las fases $G0/G1$, S y $G2/M$ respectivamente. Igualmente, durante este período estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre las fases del ciclo celular de ambos cultivos (Figura 9), sugiriendo que éstos se encontraban sincronizados al momento de ser sembrados.

Después de 24 horas en cultivo a una baja densidad celular (Figura 10), se observó un decremento en el promedio del porcentaje de células de la fase $G0/G1$ de ambos cultivos ($M\phi N$: $56.77\% \pm 1.68\%$ & $M\phi P$: $36.40\% \pm 4.60\%$). En cambio, el promedio del porcentaje de células de las fases S y $G2/M$ de este mismo tiempo incrementó para los dos cultivos ($M\phi N$: $S= 21.13\% \pm 3.92\%$, $G2/M= 13.68\% \pm 4.81\%$ & $M\phi P$: $S= 21.61\% \pm 11.56\%$, $G2/M= 35.70\% \pm 11.74\%$). Lo anterior sugiere que el ciclo celular de ambas líneas celulares volvió a activarse en su totalidad después que éstas fueron liberadas del fenómeno de inhibición por contacto, permitiendo a gran parte de las células que se encontraban en la fase $G0/G1$ durante el tiempo determinado $T0$, incorporarse a las fases de síntesis y $G2/M$. A pesar de esto, estadísticamente se identificaron diferencias significativas entre los grupos en las fases $G0/G1$ ($56.77\% \pm 1.68\%$ vs $36.40\% \pm 4.60\%$) y $G2/M$ ($13.68\% \pm 4.81\%$ vs $35.70\% \pm 11.74\%$) de este mismo período (Figura 9).

Al transcurrir 48 horas de cultivo el promedio del porcentaje de células presente en la fase $G0/G1$ de $M\phi N$ ($65.53\% \pm 4.53\%$) y $M\phi P$ ($45.00\% \pm 12.23\%$) aumento con respecto al tiempo anterior (Figura 9), sugiriendo que en ambos cultivos ocurrió una transición de la fase $G2/M$ a $G0/G1$ de un nuevo ciclo. En cuanto a las fases S y $G2/M$ de esta misma etapa, el cultivo de $M\phi N$ mostró una reducción en el porcentaje de células presente en las fases S ($17.83\% \pm 6.06\%$) y $G2/M$ ($6.28\% \pm 1.59\%$). Un fenómeno similar fue observado para la últimas dos fases del ciclo celular del cultivo de $M\phi P$ ($S= 19.74\% \pm 9.93\%$, $G2/M= 28.17\% \pm 8.40\%$), sólo que en este caso se identificaron diferencias significativas entre los grupos para la fase $G2/M$ ($6.28\% \pm 1.59\%$ vs $28.17\% \pm 8.40\%$) (Figura 9).

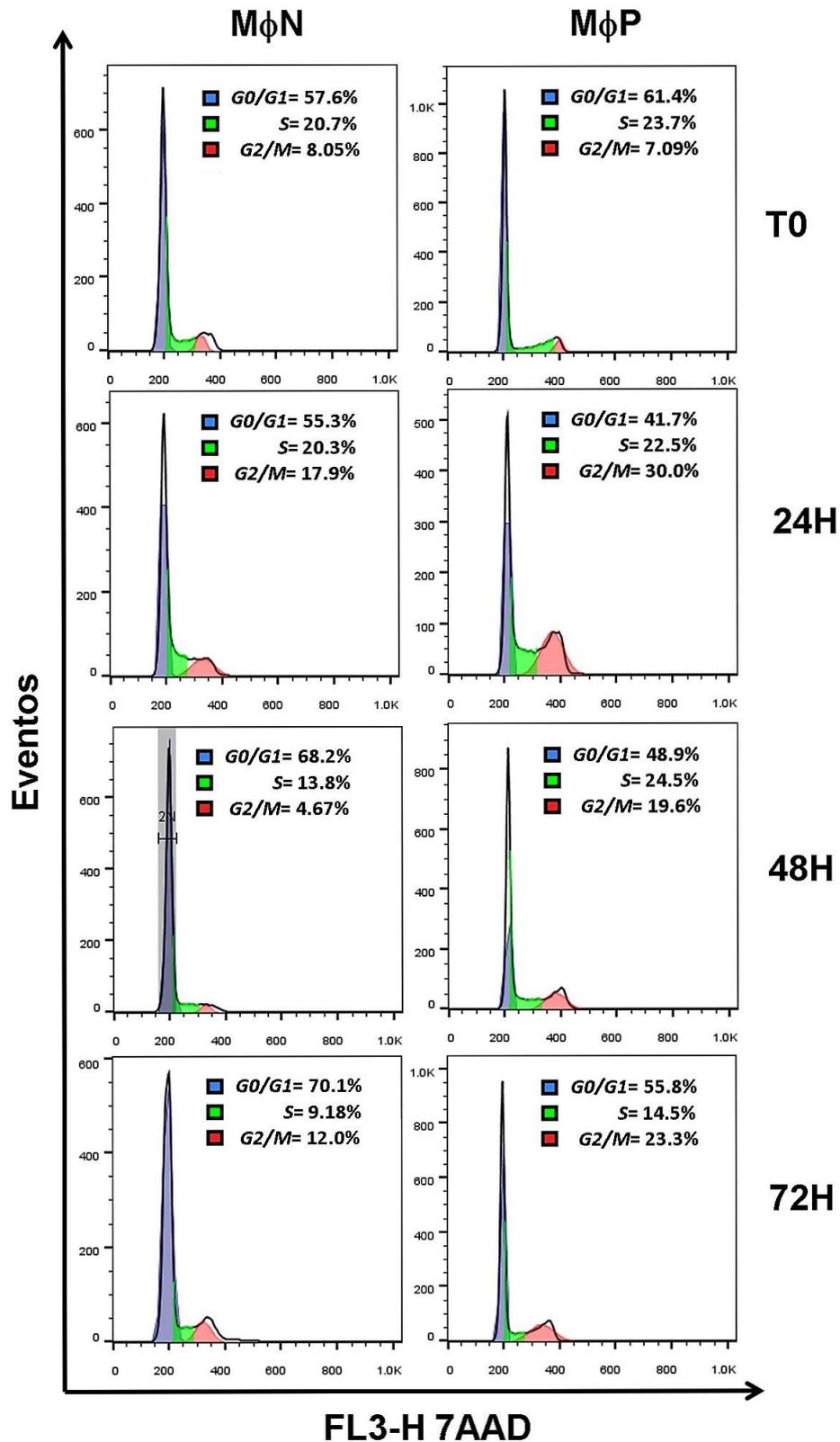


Figura 8: Histogramas obtenidos del análisis por citometría de flujo del ciclo celular de MφN y MφP de un ensayo representativo. Se aprecia la cantidad relativa de DNA contra el número de eventos capturados, así como el porcentaje de células en cada fase del ciclo observadas al momento de sembrar (T0), 24, 48 y 72 horas posteriores a ésta.

Finalmente, después de 72 horas el cultivo de MφN alcanzó una confluencia relativa del 80% (Figura 10), lo que en parte favoreció que a este tiempo el promedio registrado para la fase *G0/G1* se mantuviera relativamente constante ($65.47\% \pm 4.39\%$) y disminuyera en la fase *S* ($12.96\% \pm 3.30\%$), ya que nuevamente el cultivo comenzaba a ser influenciado por el fenómeno de IC; sin embargo, el promedio de células encontrado en la fase *G2/M* ($9.17\% \pm 2.64\%$) de este mismo cultivo aumentó en comparación con el tiempo anterior, por lo que podría especularse que algunas células aún se encontraban proliferando (Figura 9).

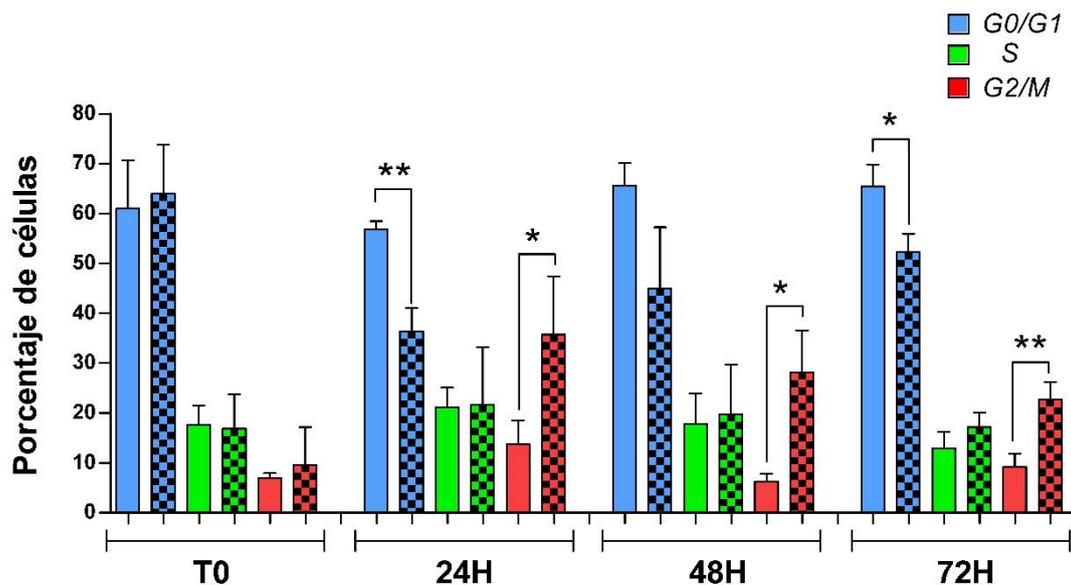


Figura 9: Histogramas representando el porcentaje de células de MφN y MφP (cuadrícula) en las fases *G0/G1* (azul), *S* (verde) y *G2/M* (rojo) del ciclo celular, al momento de la siembra (T0), 24, 48 y 72 horas posteriores a ésta. Los datos presentados son la media aritmética \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas (*, $P < 0.05$ y **, $P < 0.01$) entre los grupos.

Por otra parte, en el cultivo de MφP la confluencia apreciada para este mismo tiempo fue aproximadamente del 60% (Figura 10) y el promedio de células registrado para la fase *G0/G1* volvió a incrementar ($52.20\% \pm 3.70\%$) y disminuyó en las fases *S* ($17.17\% \pm 2.93\%$) y *G2/M* ($22.67\% \pm 3.59\%$); además, nuevamente se identificaron diferencias significativas entre los grupos en las fases *G0/G1* ($65.47\% \pm 4.39\%$ vs $52.20\% \pm 3.70\%$) y *G2/M* ($9.17\% \pm 2.64\%$ vs $22.67\% \pm 3.59\%$) (Figura 9). Esto sugiere que células de la fase *G2/M* del tiempo anterior continuaron con la transición de la fase *G2/M* a *G0/G1* de un nuevo ciclo; sin embargo, la confluencia observada en conjunto con las diferencias significativas identificadas en las fases *G0/G1* y *G2/M*, sugieren que el cultivo de MφP procede de manera lenta a través de la fase *G2/M* en comparación con el cultivo no infectado.

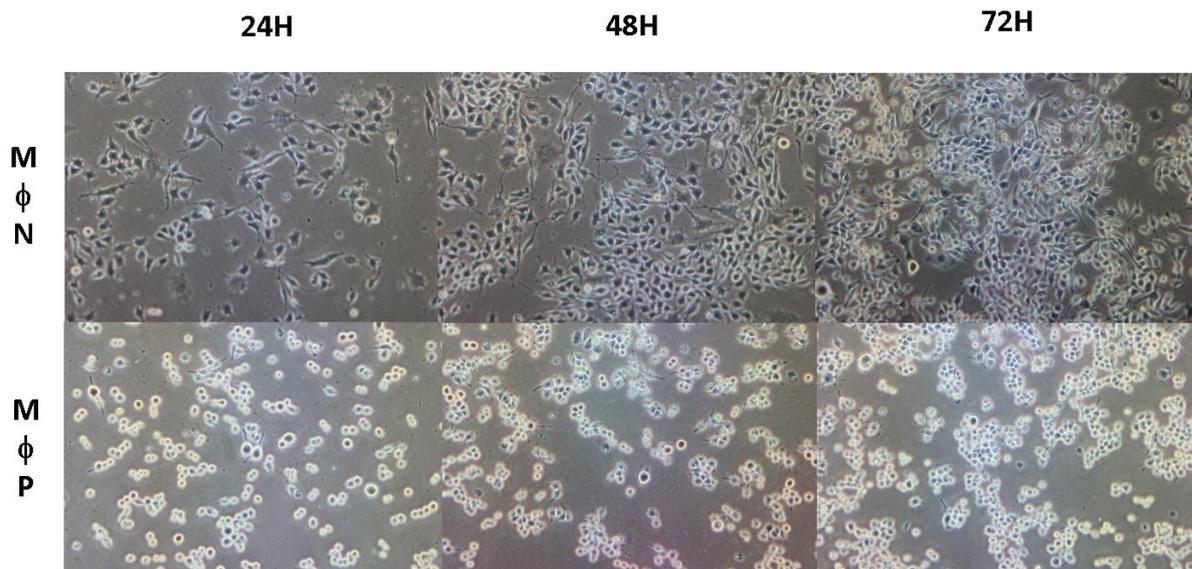


Figura 10: Fotografías a 100X de la confluencia relativa observada 24, 48 y 72 horas posteriores a la siembra de MφN y MφP. Después de 24 horas en cultivo ambas líneas celulares exhibieron una confluencia relativa del 30%. A las 48 y 72 horas el cultivo de MφN mostro una confluencia del 60% y 80% respectivamente, mientras que el de MφP fue del 40% para las 48 horas y 60% a las 72 horas.

10.3 Proliferación

En conjunto con cada experimento de ciclo celular se evaluó la proliferación de los cultivos de MφN y MφP a través de un ensayo basado en la dilución del colorante llamado carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE), que es la forma no acilada del CFDA-SE, un compuesto que después de difundir a través de la membrana celular pierde dos grupos acilo debido a la interacción con esterasas celulares. Lo anterior permite la acumulación del compuesto dentro de la célula y facilita la formación de enlaces covalentes entre el grupo succinimidil éster de la molécula de CFSE y una gran variedad de proteínas celulares. De esta manera el compuesto permanece covalentemente unido a la célula por largos periodos de tiempo y cada que ésta se divide distribuye uniformemente una porción del colorante a la célula hija. Esta porción del colorante reduce con cada ronda de división celular y puede detectarse mediante citometría de flujo, ya que el CFSE tiene un máximo de excitación a los 490 nm y un máximo de emisión a los 520 nm si se le excita con un láser azul (Wallace et al., 2008).

Partiendo de este principio un determinado número de células de MφN y MφP fueron incubadas con CFDA-SE y analizadas por citometría de flujo al momento de ser sembradas, 24, 48 y 72 horas posteriores a ésta. Los datos obtenidos por este proceso fueron cuantitativamente analizados para determinar el número de células que se originaron de la población precursora (Ge0) y obtener el índice de proliferación y división de cada línea celular. Los histogramas y el plot de contorno representativos de MφN y MφP obtenidos a través de este análisis se muestran en las figuras 11a y 11b.

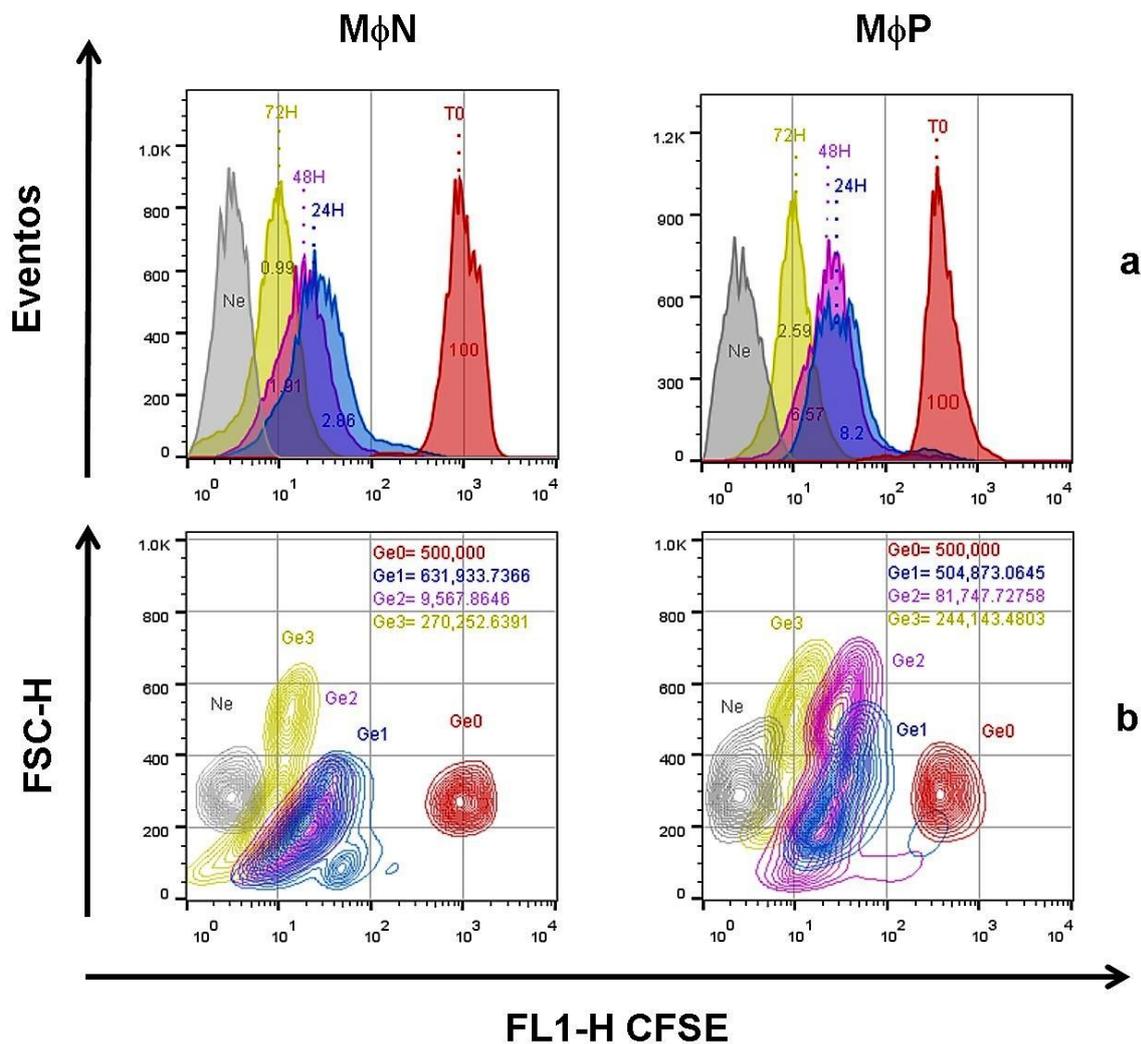


Figura 11: (a) Histogramas de la distribución hipotética de la fluorescencia de CFSE de MφN y MφP a T0 (rojo), 24 (azul), 48 (violeta) y 72 (amarillo) horas posteriores al marcaje. En la figura se aprecia la intensidad de fluorescencia de CFSE (FL1-H CFSE) contra los eventos capturados, además del control de autofluorescencia (Ne). (b) Plot de contorno de las generaciones obtenidas mediante el análisis de dilución de CFSE. En la figura se presenta la intensidad de fluorescencia de CFSE (FL1-H CFSE) contra el área relativa de la población celular (FSC-H). Cada generación corresponde con el tiempo de cosecha de la figura anterior e igualmente se presenta el control de autofluorescencia (Ne).

En ambos cultivos se obtuvieron al menos 3 generaciones procedentes de la Ge0, las cuales correspondieron con los tiempos de análisis posteriores al marcaje con CFSE; además, la intensidad de fluorescencia relativa para el colorante disminuyó de manera progresiva con respecto al tiempo (Figuras 11a y 12a) y el área relativa de las dos líneas celulares varió con cada generación, aunque frecuentemente se encontró en un rango de 50 a 700 a partir de la primera generación en adelante (Figura 11b). Lo antes mencionado sugiere que los cultivos comenzaron a proliferar después de su siembra, ya que el cambió en el área, así como la pérdida de fluorescencia de CFSE son indicios de proliferación celular (Lyons, 2000).

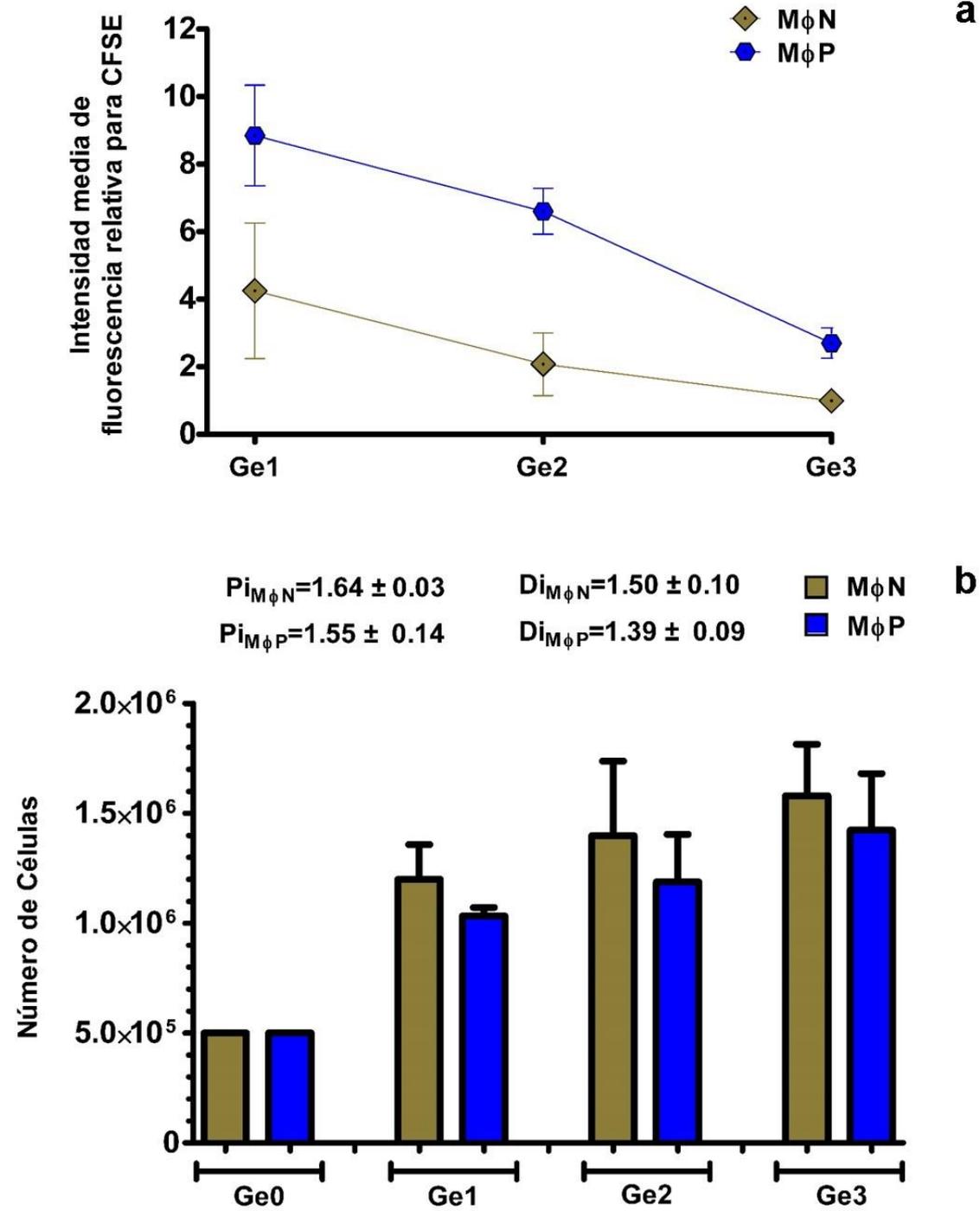


Figura 12: (a) Intensidad media de fluorescencia relativa para CFSE de la primera (Ge1), segunda (Ge2) y tercera (Ge3) generación de MφN y MφP. El valor de la generación precursora (Ge0) de ambos cultivos no se muestra, ya que se normalizo a un valor de 100 debido a las diferencias de marcaje con CFSE entre las dos líneas celulares. (b) Intensidad media de fluorescencia relativa para CFSE de la primera (Ge1), segunda (Ge2) y tercera (Ge3) generación de MφN y MφP. El valor de la generación precursora (Ge0) de ambos cultivos no se muestra, ya que se normalizo a un valor de 100 debido a las diferencias de marcaje con CFSE entre las dos líneas celulares.

La Ge0 de ambas líneas celulares consideró un promedio de 500,000 células (Figura 12b) y se caracterizó por distribuirse en un rango de área relativa de 200 a 400 (Figura 11b). Por otro lado, la intensidad media de fluorescencia de esta generación varió ampliamente entre los cultivos, por lo que ésta se normalizó a un valor relativo de 100 (Figura 11a y 12a). La primera generación (Ge1) de MφN presentó un promedio total de $1,198,650 \pm 158,602$ células y una intensidad media de fluorescencia relativa para CFSE de 4.25 ± 2.0 . Por otro lado, la Ge1 de MφP exhibió un promedio igual a $1,031,720 \pm 39,333$ células, así como una intensidad media de fluorescencia relativa de 8.84 ± 1.49 (Figuras 12a y 12b).

Para la segunda generación (Ge2) el cultivo de MφN alcanzó un promedio de $1,397,490 \pm 340,050$ células, mientras que el cultivo de MφP presentó un promedio de $1,187,770 \pm 216,582$ células (Figura 12b). En cuanto a la intensidad media de fluorescencia relativa de esta generación, el cultivo de MφN manifestó un promedio de 2.08 ± 0.93 y el de MφP fue de 6.6 ± 0.67 (Figura 12a). La última generación (Ge3) de MφN y MφP abarcó un promedio de $1,578,870 \pm 234,256$ y $1,422,660 \pm 258,213$ células respectivamente. La intensidad media de fluorescencia relativa de esta misma generación fue de 0.99 ± 0.27 para MφN y 2.69 ± 0.45 en el caso de MφP (Figuras 12a y 12b). Estadísticamente no se identificaron diferencias significativas entre los grupos en el promedio total de células de cada generación (Figura 12b). De la misma manera, el cálculo del Pi y del Di del cultivo de MφN indicó un promedio de 1.64 ± 0.03 y 1.50 ± 0.10 respectivamente. En la línea celular infectada persistentemente con HRSV el Pi fue igual a 1.55 ± 0.14 y el Di tuvo un valor de 1.39 ± 0.09 (Figura 12b). El Pi indica el promedio de células que se han dividido después de responder a un estímulo; mientras que el valor del Di denota el número promedio de divisiones de todas las células en el cultivo (Roederer, 2011). Esto sugiere que la línea celular de MφN tiene un rango de proliferación relativamente mayor al de MφP, aunque estadísticamente éste no es significativo (Figura 12b).

11. Discusión

A través de la evolución los virus han desarrollado una gran variedad de mecanismos para infectar de manera efectiva a sus hospederos. Entre éstos destaca el interferir con los sistemas de regulación celular, afectar vías de señalización y la subversión del ciclo celular (Bruggeman, 2007). Una gran variedad de virus con genoma de RNA de sentido negativo han mostrado subvertir el ciclo celular del hospedero, creando en la mayoría de los casos, condiciones intercelulares que promueven la producción de la progenie viral (He et al., 2010) y en otras ocasiones la evasión de la respuesta inmune y el fenómeno de persistencia viral (Niewiesk et al., 1999; Planz et al., 2003).

Estudios previos han evidenciado la capacidad de HRSV para interferir con el ciclo celular del hospedero y crear condiciones que promueven la progenie viral del mismo (Gibbs et al., 2009; Wu et al., 2011). Además, en diferentes estudios elaborados en el laboratorio de virología de la Facultad de Medicina de la UNAM, se ha observado que la línea celular de macrófagos murinos P388D1 infectada persistentemente con HRSV

prolifera lentamente en comparación con su variante no infectada. Es así como estas observaciones nos llevaron a hipotetizar que la persistencia de HRSV altera el ciclo celular de macrófagos murinos P388D1.

Para comprobar esta hipótesis se emplearon cultivos de M ϕ P que expresaban más del 90% de células positivas para antígenos de HRSV (Figura 7). Por otra parte, previo al inicio de los experimentos los cultivos fueron sincronizados mediante inhibición por contacto, esto con el fin de hacer a los grupos comparables y evitar una mala interpretación de los resultados, ya que se sabe que el fenómeno de inhibición por contacto produce un estado quiescente en la fase *G0/G1* de diversas estirpes celulares. Lo anterior ocurre gracias a que la elevada densidad celular permite la interacción y asociación de moléculas de adhesión celular, principalmente complejos cadherina-catenina, los cuales influyen en la activación de la vía Hippo, produciendo la fosforilación y exclusión del núcleo celular a complejos transcripcionales (TAZ) que regulan la expresión de genes encargados del crecimiento y proliferación celular (TEAD) (Gumbier & Kim, 2014).

Esto permitió que al momento de la siembra al menos un 60% de células de M ϕ N y M ϕ P se encontrarán en la fase *G0/G1* y el resto se distribuyera en las fases *S* y *G2/M* del ciclo celular (Figura 9), ya que inducir un estado quiescente total en la fase *G0/G1* de líneas celulares se vuelve complicado por las alteraciones que éstas presentan (Rosner et al., 2013). A pesar de esto, al momento de la siembra no se identificaron diferencias significativas entre los grupos para ninguna de sus fases y el área relativa que exhibieron los cultivos fue muy similar (Figuras 9 y 11b), por lo que se podría decir que en este tiempo los cultivos se encontraban sincronizados.

La cosecha y posterior siembra a baja densidad de estos cultivos terminaría con los procesos por los que se presenta el fenómeno de inhibición por contacto, permitiendo la reactivación del ciclo celular de ambas líneas celulares. De acuerdo con los resultados obtenidos, la proliferación celular de ambos cultivos fue evidente a partir de las 24 horas en adelante (Figuras 11a, 11b, 12a y 12b); sin embargo, en todos los tiempos en los que se realizó el análisis fue posible apreciar un mayor porcentaje de células en la fase *G2/M* del cultivo de M ϕ P, el cual fue estadísticamente significativo y se encontró acompañado de un menor porcentaje de células en la fase *G0/G1*, que en algunas ocasiones, igualmente fue estadísticamente significativo (Figura 9).

Con base en estas observaciones y la confluencia relativa percibida a lo largo del experimento (Figura 10), surgió la idea de un posible arresto en la fase *G2/M* del cultivo de M ϕ P, el cual pudiera estar afectando la manera en la que la línea celular prolifera. Por esta razón cada experimento de ciclo celular fue acompañado de un ensayo de proliferación basado en la dilución de CFSE (Figuras 11a y 11b). Éste permitió obtener el número total de células de cada generación, así como los índices de proliferación y división (Figura 12b). En base a los resultados obtenidos en este ensayo, en todas las generaciones de M ϕ N el número total de células superó al del cultivo infectado persistentemente con HRSV, y los índices de proliferación y división

fueron relativamente superiores en la línea celular de M ϕ N, a pesar de esto no se identificaron diferencias significativas entre los grupos en el total de células de cada generación y en los índices obtenidos (Figura 12b). No obstante, es importante considerar que tanto la escala logarítmica con la que se capturaron los datos de proliferación, así como el número de repeticiones que se presentan en este estudio, son factores que influyen en el análisis y estado estadístico correspondiente al total de células obtenidas en cada generación, y a los índices de proliferación y división; ya que después de normalizar los resultados correspondientes a la intensidad media de fluorescencia relativa para CFSE, fue posible apreciar, en comparación con la línea celular no infectada, el doble de la intensidad del colorante en la Ge1 en adelante del cultivo de M ϕ P (Figura 12a), sugiriendo que el rango de proliferación de esta línea celular pueda ser menor al obtenido en este trabajo (Figuras 11a y 12b).

A pesar de esto, en conjunto los resultados indica que los altos porcentajes observados en la fase *G2/M* del cultivo de M ϕ P (Figura 9) no son producto de un arresto en esta etapa del ciclo celular, sino de un estado prolongado capaz de afectar el rango de proliferación del cultivo, aunque en este caso, no de manera significativa (Figura 12b). Un fenómeno similar se ha observado durante infecciones agudas con el virus de los simios 5 (SV5), un miembro de la familia *Paramyxoviridae* género *Rubulavirus*, el cual retrasa ligeramente la progresión de las fases *G0/G1* y *S*, además de causar la acumulación de células en la fase *G2/M* del ciclo celular, afectando el crecimiento y proliferación de células HeLa T4, aunque no de manera significativa (Lin & Lamb, 2000).

Una característica importante de muchas infecciones virales es la subversión del ciclo celular. Frecuentemente este fenómeno involucra la alteración e interferencia directa o indirecta con la compleja red del ciclo celular, afectando la manera en la que progresan una o más fases, creando un estado quiescente en un determinado período o favoreciendo la transición a una etapa específica del ciclo celular (De Beeck & Caillet-Frauquet, 1997). Alterar la fase *G2/M* del ciclo celular es una peculiaridad que presentan virus de DNA, RNA y retrovirus con capacidad para establecer una infección persistente (Davy & Doorbar, 2007).

La persistencia viral es un estado que requiere de la subversión de moléculas o mecanismos propios del hospedero por parte del virus, de tal manera que durante la infección se suministren señales intracelulares que favorezcan estrategias de replicación únicas, donde el virus es capaz de regular la expresión de los genes del hospedero y los propios, residiendo en un estado no lítico y en equilibrio con el hospedero (Oldstone, 2006). A través de una gran variedad de mecanismos, múltiples entes virales alteran o regulan la expresión de diversas proteínas necesarias durante la fase *G2/M* del ciclo celular, a menudo con el propósito de controlar la expresión de genes virales o celulares que son de importancia para el ciclo de replicación viral (Davy & Doorbar, 2007).

Durante infecciones agudas con HRSV, análisis proteómicos y transcriptómicos han revelado una baja en la expresión de proteínas importantes para la fase *G2/M* del ciclo celular, entre las que perfilan la Cdk1, Cdk7, Cdc20 y las ciclinas A y B (Munday et al., 2010; Wu et al., 2011). La ciclina A forma predominantemente complejos con la Cdk2, mientras que la ciclina B interactúa y forma complejos con la Cdk1, en cualquier caso, la participación de los complejos ciclina-A/Cdk2 y ciclina-B/Cdk1 es esencial en el transcurso de la fase *G2/M* del ciclo celular (Mittra & Enders, 2004). Durante la fase *G2* el complejo ciclina-B/Cdk1 es mantenido en el citoplasma por la acción de la proteína de exporte CRM1 (Alberts et al., 2015), permitiendo al complejo interactuar con proteínas del citoesqueleto de actina (FLNa) y de la maquinaria productora de ATP de la matriz mitocondrial (CI), favoreciendo de esta manera, cambios en la estructura celular y en la síntesis de energía que serán necesarios durante la mitosis (Cukier et al., 2007; Lodish et al., 2013; Wang et al., 2014).

Al final de la fase *G2* el complejo ciclina-B/Cdk1 es fosforilado en diferentes residuos por la acción de diversas proteínas (Cdk7, ciclina-H, RING-finger MAT1, Cdk1 y Plk1), permitiendo su exporte dentro del núcleo a través de la proteína de transporte nuclear Impotin β . Una vez en el núcleo, el complejo es inactivado por la proteína Wee1 y Mty1 al fosforilar la subunidad Cdk1 en los residuos tirosina 15 y treonina 14 respectivamente (Porter & Donoghue, 2003). En la etapa tardía de la fase *G2* el complejo ciclina-B/Cdk1 inactivo será acumulado en el núcleo celular para después ser activado por la acción de las fosfatasa Cdc25B y Cdc25C (Boutros et al., 2007); la cuales, previamente requieren ser activadas por la acción del complejo ciclina-A/Cdk2 durante las fases *S* y *G2* respectivamente (Mittra & Enders, 2004). La actividad del complejo ciclina-B/Cdk1 activo en núcleo debilitará las asociaciones que mantienen la estructura de la membrana nuclear al fosforilar una gran variedad de componentes de la misma (lámina nuclear, poro nuclear, proteínas de la membrana nuclear interna y cromatina), finalizando de esta manera la fase *G2* e iniciando la mitosis (Burke & Ellenberg, 2002).

Inhibir o alterar la actividad del complejo ciclina-B/Cdk1 es una de las estrategias moleculares más frecuente en entes virales que causan un estado quiescente en la fase *G2/M* del ciclo celular. Los mecanismos moleculares que estos virus emplean para interferir con el complejo ciclina-B/Cdk1 suelen variar ampliamente y en ocasiones son desconocidos, aunque algunos de los más comunes involucran el uso de proteínas virales multifuncionales capaces de interactuar o de mimetizar las funciones de la ciclina B, previniendo la formación de complejos por competencia con la unión a la Cdk1 o por secuestro de la ciclina B, y en ocasiones de todo el complejo, evitando así su exporte y acción en el núcleo celular (Davy & Doorbar, 2007).

Este tipo de estrategia es empleada por baculovirus, cuya proteína OdV-ec27 tiene homología con ciclinas celulares y es capaz de interactuar con Cdks del hospedero (Herniou et al., 2003). En el caso de entes virales con capacidad para establecer una infección persistente, la proteína viral 16E1 \wedge E4 de HPV16 evita el exporte nuclear del complejo ciclina-B/Cdk1 al mantenerlo secuestrado en una red de citoqueratina, en

tanto que la nucleoproteína del virus de la enfermedad de borna (BVD), un miembro del orden *Mononegavirales*, interactúa con el complejo ciclina-B/Cdk1 para prolongar la fase G2 del ciclo celular (Planz et al., 2003; Davy et al., 2005). En cuanto a HRSV, actualmente no existe información relevante sobre alguna proteína multifuncional que sea capaz de interactuar y alterar las funciones del complejo ciclina-B/Cdk1, aunque en HBEpC infectados de manera aguda con este mismo virus han manifestado la translocación de las ciclinas D1 y D2 del núcleo al citoplasma, ocasionando un arresto en la fase G0/G1 de estos cultivos (Wu et al., 2011).

Otros de los mecanismos empleados para inhibir la actividad del complejo ciclina-B/Cdk1 involucran la activación de inhibidores de Cdks producto de vías de señalización relacionadas con daño al DNA celular, como ATR, ATM y p53. El último de éstos produce un aumento en la expresión de la proteína p21, un inhibidor importante de Cdks, mientras que ATR y ATM inducen la fosforilación y activación de Chk1 y Chk2, las cuales inactivarán a las fosfatasa Cdc25 evitando la activación del complejo ciclina-B/Cdk1 ubicado en núcleo celular (Bartek & Lukas, 2003; Reinhardt & Yaffe, 2009; Chaurushiya & Weitzman, 2009). La presencia del genoma viral en el núcleo celular parece ser la forma más simple en la que un virus puede provocar una respuesta de daño al DNA del hospedero, aparentemente las inusuales estructuras del genoma de virus adeno asociados y parvovirus son suficientes para activar una respuesta de este tipo (Davy & Doorbar, 2007). Sin embargo, esta característica es propia de virus con genoma de DNA, por lo que virus de RNA y retrovirus generalmente emplean proteínas multifuncionales capaces de crear señales de estrés o interactuar con componentes de la maquinaria de reparación del DNA, determinando de esta manera, que vía de reparación es aprovechada o inactivada (Zhao & Elder, 2005; Chaurushiya & Weitzman, 2009).

Algunos ejemplos de estos virus incluyen potenciales patógenos para seres humanos, como el virus linfotrópico de células T humanas, HIV-1, influenza A, dengue, rabia y HRSV; asimismo, se integran algunos agentes infecciosos del ganado, como el virus de la fiebre del valle de Rift, encefalitis equina venezolana y bronquitis aviar infecciosa. Para conseguir una respuesta de daño al DNA celular, la manera en la que estas proteínas virales interactúan con los sistemas de señalización y componentes de la maquinaria de reparación del DNA celular, es muy variada, aunque un punto esencial implica el transporte de estas proteínas al núcleo celular (Caly et al., 2012; Ryan et al., 2016), un fenómeno que presenta la proteína viral M de diferentes miembros del orden *Mononegavirales*, como el virus Nipah, Hendra, Sendai y HRSV (Ghildyal et al., 2003; Pentecost et al., 2015). El transporte de esta proteína viral se ha observado durante la etapa temprana de la infección con HRSV y su actividad en núcleo celular ha sido asociada con la inhibición transcripcional de genes del hospedero y la activación de p53, lo que produce la síntesis de p21 y el subsecuente arresto del ciclo celular en las fases G0/G1 y G2/M de células A549 y HBEpC (Ghildyal et al., 2003; Bian et al., 2011).

La síntesis de p21 igualmente se ha visto alterada en macrófagos infectados de manera aguda con HIV (Vázquez et al., 2005), en donde la proteína viral Vpr ha

mostrado ser la responsable en la síntesis de este inhibidor de Cdks, y en el arresto de la fase *G2/M* de linfocitos T (Chowdhury et al., 2003). Resulta importante mencionar que Vpr es una de las proteínas virales con mayor versatilidad para alterar la fase *G2/M* del ciclo celular, demostrando que el cambio de manera directa o indirecta en la actividad del complejo ciclina-B/Cdk1 no es la única manera de conseguir un estado quiescente en la fase *G2/M*. Algunos de los métodos alternativos por los que Vpr puede causar un estado quiescente en la fase *G2/M* incluyen, cambios en la actividad de la cinasa Wee1, las fosfatasas Cdc25 y PP2A, manipulación del sistema de ubiquitinación del proteosoma, regulación a la baja de genes relacionados a la vía MAPK, entre otros (Zhao & Elder, 2005; Yoshizuka et al., 2005; Ryan et al., 2016).

Por otra parte, diferentes entes virales también han desarrollado mecanismos alternativos para afectar la fase *G2/M* del ciclo celular, como trastornar la actividad del complejo APC/C (Mo et al., 2012), el cual es activado por un proceso relacionado con el incremento en el Ca^{+2} intracelular después de que el punto de control de montaje del huso mitótico es completado al final de la *metafase*. Una vez activado, este complejo se encargará de mediar la degradación de una gran variedad de proteínas relacionadas con la replicación del DNA (Cdc6 y Skp2) y la mitosis (ciclina A y B, Plks, cinasas Aurora A y B, entre otras); además, su actividad en conjunto con las fuerzas de tensión creadas por los microtúbulos del huso mitótico, serán fundamentales durante la liberación de las cromátidas hermanas y en la segregación de los cromosomas (Malumbres & Barbacid, 2009; Pines, 2011).

De esta manera la alteración del complejo APC/C durante una infección viral se puede reflejar en la acumulación y lenta degradación de complejos ciclina/Cdk, un fenómeno observado en células Hela T4 infectadas de manera aguda con SV5 (ciclina-A/Cdk2) (Lin & Lamb, 2000). También puede permitir al hospedero desarrollar la fase *G2* e iniciar, pero no concluir de manera normal con la mitosis, ocasionando que los cromosomas no se segreguen de manera correcta, evento que puede llegar a producir la immortalización del hospedero celular y permitir a la infección viral persistir (Matsuoka & Jeang, 2007; Giam & Jeang, 2007). Otra forma en la que la mitosis procede de manera aberrante durante una infección viral, implica el uso de proteínas virales capaces de interferir con la amplificación de los centrosomas o la unión de los microtúbulos del uso mitótico con los cinetocoros de los cromosomas, aunque también existen proteínas virales que interfieren con reguladores del punto de control de montaje del huso mitótico (hMad-1 y Check-1), evitando que éste se complete (Lomonte et al., 2001; Chaurushiya & Weitzman, 2009; Boxus & Willems, 2009).

Actualmente solo se ha identificado que la infección aguda con HRSV produce una baja en la expresión de la proteína Cdc20 (Wu et al., 2011), uno de los dos cofactores que regula la actividad del complejo APC/C y lo activa durante la etapa temprana de la mitosis (Peters, 2006). Sin embargo, no existen reportes que indiquen la alteración del complejo APC/C o del punto de control de montaje del huso mitótico durante una infección aguda o persistente con HRSV, aunque se conoce que células infectadas con este virus expresan en su superficie a la proteína viral SH, la cual se ha

caracterizado como una viroporina (Fuentes et al., 2007). Este tipo de proteínas virales destacan por actuar como canales iónicos o de protones que afectan la permeabilidad de la membrana celular del hospedero, favoreciendo la formación y liberación de la progenie viral o la citopatogenicidad de la infección por el aumento en la concentración de Ca^{+2} intracelular (Nieva & Carraso, 2015; Nieto-Torres et al., 2015). De tal manera que uno de los posibles mecanismos moleculares por los que HRSV consigue prolongar la fase *G2/M* del ciclo celular durante una infección persistente, pueda estar relacionado con la regulación de las concentraciones de Ca^{+2} intracelular mediadas por la proteína viral SH de HRSV, afectando de manera indirecta la activación y función del complejo APC/C durante este tipo de infecciones virales. No obstante, para comprobar esta teoría y aquellas que se encuentran relacionadas con la translocación de ciclinas o la inactivación del complejo ciclina-B/Cdk1 por medio de la proteína viral M, es necesario llevar a cabo estudios especializados que ayuden a establecer la relación que pueda existir entre algunas de las proteínas virales de HRSV antes mencionadas, y el mecanismo molecular por el que el virus afecta y prolonga la fase *G2/M* durante una infección persistente.

Asimismo es considerable definir la importancia que tiene para el virus prolongar la fase *G2/M* del ciclo celular durante este tipo infección, ya que en otros virus se han observado ciertos beneficios, como el incremento en los niveles de expresión de proteínas virales o la actividad de polimerasas virales (Mouland et al., 2002; Dove et al., 2006), la evasión de la respuesta antiviral al prevenir la expansión clonal de células del sistema inmune (Zimmerman et al., 2006), o beneficiar ciertos eventos del ciclo de replicación viral que también favorecen el establecimiento de una infección persistente, como la integración del genoma viral durante la infección con HIV (Groschel & Bushman, 2005) y la asociación del genoma viral de BVD con los cromosomas del hospedero, evento que ocurre durante la *metafase* y permite al virus asegurar una infección persistente al segregar su genoma junto con los cromosomas del hospedero (Matsumoto et al., 2012).

Uno de los avances notables dentro de la virología moderna ha sido evidenciar la existencia de la persistencia viral como un hecho común; sin embargo, los mecanismos por los que esta es establecida y mantenida, así como las consecuencias patológicas, aún continúan siendo desconocidas (Oldstone, 2006); por lo que en base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se proponen algunas perspectivas que ayuden a comprender la manera en la que HRSV afecta la fase *G2/M* del ciclo celular durante una infección persistente.

12. Conclusiones

- La persistencia viral de HRSV prolonga la fase *G2/M* del ciclo celular de macrófagos murinos P388D1.
- Este fenómeno produce un decaimiento en la proliferación de la línea celular, aunque estadísticamente no de manera significativa.

13. Perspectivas

- Evaluar el perfil de ciclinas de macrófagos murinos P388D1 infectados persistentemente con HRSV.
- Localizar intracelularmente a las ciclinas A y B, así como a la proteína viral M de HRSV.
- Evaluar en la línea celular de macrófagos murinos P388D1 infectada persistentemente con HRSV, el estado de transcripción y activación de p21.
- Determinar si las proteínas virales M y SH favorecen el estado prolongado de la fase G2/M observado en macrófagos murinos P388D1 infectados persistentemente con HRSV.
- Analizar el perfil de replicación y transcripción de HRSV durante la etapa G2/M del ciclo celular de macrófagos murinos P388D1 infectados persistentemente con este virus.

14. Referencias

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Cellular and Molecular Immunology* (8ª ed.). Philadelphia: Elsevier Saunders.

Adhikary, S., & Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(8), 635-645.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell*. (6ª ed.). New York: Garland Science.

Ambrose, M., & Gatti, R. A. (2013). Pathogenesis of ataxia-telangiectasia: the next generation of ATM functions. *Blood*, 121(20), 4036-4045.

Archambault, V., & Glover, D. M. (2009). Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(4), 265-275.

Arias, E. E., & Walter, J. C. (2007). Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes & Development*, 21(5), 497-518.

Asenjo, A., & Villanueva, N. (2000). Regulated but not constitutive human respiratory syncytial virus (HRSV) P protein phosphorylation is essential for oligomerization. *FEBS letters*, 467(2), 279-284.

Asenjo, A., González-Armas, J. C., & Villanueva, N. (2008). Phosphorylation of human respiratory syncytial virus P protein at serine 54 regulates viral uncoating. *Virology*, 380(1), 26-33.

Asenjo, A., Rodríguez, L., & Villanueva, N. (2005). Determination of phosphorylated residues from human respiratory syncytial virus P protein that are dynamically dephosphorylated by cellular phosphatases: a possible role for serine 54. *Journal of General Virology*, 86(4), 1109-1120.

Bangham, C. R. M., & McMichael, A. J. (1986). Specific human cytotoxic T cells recognize B-cell lines persistently infected with respiratory syncytial virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(23), 9183-9187.

Bartek, J., & Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, 3(5), 421-429.

Battisti, A. J., Meng, G., Winkler, D. C., McGinnes, L. W., Plevka, P., Steven, A. C., Morrison, T. G., & Rossmann, M. G. (2012). Structure and assembly of a paramyxovirus matrix protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(35), 13996-14000.

Behera, A. K., Matsuse, H., Kumar, M., Kong, X., Lockey, R. F., & Mohapatra, S. S. (2001). Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection. *Biochemical and biophysical research communications*, 280(1), 188-195.

Bermingham, A., & Collins, P. L. (1999). The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(20), 11259-11264.

Bhella, D., Ralph, A., Murphy, L. B., & Yeo, R. P. (2002). Significant differences in nucleocapsid morphology within the Paramyxoviridae. *Journal of General Virology*, 83(8), 1831-1839.

Bian, T., Gibbs, J. D., Örvell, C., & Imani, F. (2012). Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Induces Lung Epithelial Cell Cycle Arrest Through a p53 Dependent Pathway. *PLoS One*, 7(5), e38052.

Bitko, V., Shulyayeva, O., Mazumder, B., Musiyenko, A., Ramaswamy, M., Look, D. C., & Barik, S. (2007). Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF- κ B-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth. *Journal of Virology*, 81(4), 1786-1795.

Blondot, M. L., Dubosclard, V., Fix, J., Lassoued, S., Aumont-Nicaise, M., Bontems, F., Eléouët, J. F., & Sizun, C. (2012). Structure and functional analysis of the RNA- and viral phosphoprotein-binding domain of respiratory syncytial virus M2-1 protein. *PLoS Pathogens*, 8(5), 1-13.

Borg, I., Rohde, G., Löseke, S., Bittscheidt, J., Schultze-Werninghaus, G., Stephan, V., & Bufe, A. (2003). Evaluation of a quantitative real-time PCR for the detection of respiratory syncytial virus in pulmonary diseases. *European Respiratory Journal*, 21(6), 944-951.

Boutros, R., Lobjois, V., & Ducommun, B. (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: Key players? Good targets?. *Nature Reviews Cancer*, 7(7), 495-507.

Boxus, M., & Willems, L. (2009). Mechanisms of HTLV-1 persistence and transformation. *British Journal of Cancer*, 101(9), 1497-1501.

Bramley, A. M., Vitalis, T. Z., Wiggs, B. R., & Hegele, R. G. (1999). Effects of respiratory syncytial virus persistence on airway responsiveness and inflammation in guinea-pigs. *European Respiratory Journal*, 14(5), 1061-1067.

Bruggeman, L. A. (2007). Viral Subversion Mechanisms in Chronic Kidney Disease Pathogenesis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2(1), S13-S19.

Burke, B., & Ellenberg, J. (2002). Remodelling the walls of the nucleus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(7), 487-497.

Burke, E., Mahoney, N. M., Almo, S. C., & Barik, S. (2000). Profilin is required for optimal actin-dependent transcription of respiratory syncytial virus genome RNA. *Journal of Virology*, 74(2), 669-675.

Caly, L., Wagstaff, K. M., & Jans, D. A. (2012). Nuclear trafficking of proteins from RNA viruses: Potential target for antivirals?. *Antiviral Research*, 95(3), 202-206.

Cane, P. A. (2002). Respiratory Syncytial Virus. En Leitner, T. (Ed), *The Molecular Epidemiology of Human Viruses* (pp. 329-350). New York: Springer.

Carmena, M., & Earnshaw, W. C. (2003). The cellular geography of Aurora kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(11), 842-854.

Carromeu, C., Simabuco, F. M., Tamura, R. E., Arcieri, L. F., & Ventura, A. M. (2007). Intracellular localization of human respiratory syncytial virus L protein. *Archives of Virology*, 152(12), 2259-2263.

Cartee, T. L., Megaw, A. G., Oomens, A. G. P., & Wertz, G. W. (2003). Identification of a single amino acid change in the human respiratory syncytial virus L protein that affects transcriptional termination. *Journal of Virology*, 77(13), 7352-7360.

Castagné, N., Barbier, A., Bernard, J., Rezaei, H., Huet, J.C., Henry, C., Da Costa, B., & 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.

Chang, T. H., Segovia, J., Sabbah, A., Mgbemena, V., & Bose, S. (2012). Cholesterol-rich lipid rafts are required for release of infectious human respiratory syncytial virus particles. *Virology*, 422(2), 205-213.

Chaurushiya, M. S., & Weitzman, M. D. (2009). Viral manipulation of DNA repair and cell cycle checkpoints. *DNA repair*, 8(9), 1166-1176.

Chávez-Bueno, S., Mejías, A., Gómez, A. M., Olsen, K. D., Ríos, A. M., Fonseca-Aten, M., Ramilo, O., & Jafri, H. S. (2005). Respiratory syncytial virus-induced acute and

chronic airway disease is independent of genetic background: An experimental murine model. *Virology Journal*, 2(1), 1-14.

Cheng, X., Park, H., Zhou, H., & Jin, H. (2005). Overexpression of the M2-2 protein of respiratory syncytial virus inhibits viral replication. *Journal of Virology*, 79(22), 13943-13952.

Chowdhury, I. H., Wang, X. F., Landau, N. R., Robb, M. L., Polonis, V. R., Birx, D. L., & Kim, J. H. (2003). HIV-1 Vpr Activates Cell Cycle Inhibitor p21/Waf1/Cip1: A Potential Mechanism of G2/M Cell Cycle Arrest. *Virology*, 305(2), 371-377.

Cimprich, K. A., & Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 9(8), 616-627.

Collins, P. L. (1991). The molecular biology of human respiratory syncytial viruses (RSV) of the genus Pneumovirus. En Kingsbury, D. W. (Ed.), *The paramyxoviruses* (pp 103–162.). New York: Plenum Publishing.

Collins, P. L. (2008). Human Respiratory Syncytial Virus. En Mahy, B. W. J. & Van Regenmortel, M. H. V. (Ed.), *Encyclopedia of virology third edition* (pp 542-550). Oxford: Elsevier Inc.

Collins, P. L., & Mottet, G. (1993). Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus. *Journal of General Virology*, 74, 1445-1445.

Collins, P. L., Fearn, R., & Graham, B. S. (2013). Respiratory Syncytial Virus: Virology, Reverse Genetics, and Pathogenesis of Disease. En Anderson, L. J., & Graham, B. S. (Ed), *Challenges and Opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccines* (pp. 03-38). Berlin: Springer.

Collins, P. L., Hill, M. G., Cristina, J., & Grosfeld, H. (1996). Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(1), 81-85.

Collins, P.L. & Karron, R. A. (2013). Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. En Knipe, D. M. & Howley, P. M. (Ed.), *Fields Virology sexta edición* (pp. 1086-1123). Philadelphia: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS.

Coverley, D., Laman, H., & Laskey, R. A. (2002). Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation. *Nature Cell Biology*, 4(7), 523-528.

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*, 17(6), 927-938.

Cukier, I. H., Li, Y., & Lee, J. M. (2007). Cyclin B1/Cdk1 binds and phosphorylates Filamin A and regulates its ability to cross-link actin. *FEBS letters*, 581(8), 1661-1672.

Dakhama, A., Vitalis, T. Z., & Hegele, R. G. (1997). Persistence of respiratory syncytial virus (RSV) infection and development of RSV-specific IgG1 response in a guinea-pig model of acute bronchiolitis. *European Respiratory Journal*, 10(1), 20-26.

Davy, C. E., Jackson, D. J., Raj, K., Peh, W. L., Southern, S. A., Das, P., Sorathia, R., Laskey, P., Middleton, K., Nakahara, T., Wang, Q., Masterson, P. J., Lambert, P. F., Cuthill, S., Millar, J. B. A., & Doorbar, J. (2005). Human Papillomavirus Type 16 E1/E4-Induced G2 Arrest is Associated with Cytoplasmic Retention of Active Cdk1/cyclin B1 Complexes. *Journal of Virology*, 79(7), 3998-4011.

Davy, C., & Doorbar, J. (2007). G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses. *Virology*, 368(2), 219-226.

Dawe, C. J., & Potter, M. (1957, January). Morphologic and Biologic Progression of a Lymphoid Neoplasm of the Mouse in vivo and in vitro. *American Journal of Pathology*, 33(1), 603-604.

De Beeck, A. O., & Caillet-Fauquet, P. (1997). Viruses and the cell cycle. En Meijer, L., Guidet, S., & Philippe, M.(Ed.) *Progress in cell cycle research Volume 3* (pp. 1-19). New York: Springer US.

De Boer, L., Oakes, V., Beamish, H., Giles, N., Stevens, F., Somodevilla-Torres, M., DeSouza, C., & Gabrielli, B. (2008). Cyclin A/cdk2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events. *Oncogene*, 27(31), 4261-4268.

Ding, L., Huang, Y., Du, Q., Dong, F., Zhao, X., Zhang, W., Xu, X., & Tong, D. (2014). TGEV nucleocapsid protein induces cell cycle arrest and apoptosis through activation of p53 signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 445(2), 497-503.

Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30, F55-F70.

Dove, B., Brooks, G., Bicknell, K., Wurm, T., & Hiscox, J. A. (2006). Cell Cycle Perturbations Induced by Infection with the Coronavirus Infectious Bronchitis Virus and Their Effect on Virus Replication. *Journal of Virology*, 80(8), 4147-4156.

Dupuy, L. C., Dobson, S., Bitko, V., & Barik, S. (1999). Casein kinase 2-mediated phosphorylation of respiratory syncytial virus phosphoprotein P is essential for the transcription elongation activity of the viral polymerase; phosphorylation by casein kinase 1 occurs mainly at Ser215 and is without effect. *Journal of Virology*, 73(10), 8384-8392.

Dyer, K. D., Percopo, C. M., Fischer, E. R., Gabryszewski, S. J., & Rosenberg, H. F. (2009). Pneumoviruses infect eosinophils and elicit MyD88-dependent release of chemoattractant cytokines and interleukin-6. *Blood*, 114(13), 2649-2656.

Eisenhut, M. (2006). Extrapulmonary manifestations of severe respiratory syncytial virus infection—a systematic review. *Critical Care*, 10(4), 1-6.

Elliott, J., Lynch, O. T., Suessmuth, Y., Qian, P., Boyd, C. R., Burrows, J. F., Buick, R., Stevenson, N. J., Touzelet, O., Gadina, M., Power, U. F., & Johnston, J. A. (2007). Respiratory syncytial virus NS1 protein degrades STAT2 by using the Elongin-Cullin E3 ligase. *Journal of Virology*, 81(7), 3428-3436.

Engelking, O., Fedorov, L. M., Lilischkis, R., Ter Meulen, V., & Schneider-Schaulies, S. (1999). Measles virus-induced immunosuppression in vitro is associated with deregulation of G1 cell cycle control proteins. *Journal of general Virology*, 80(7), 1599-1608.

Falsey, A. R., Formica, M. A., Hennessey, P. A., Criddle, M. M., Sullender, W. M., & Walsh, E. E. (2006). Detection of respiratory syncytial virus in adults with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173(6), 639-643.

Fearns, R., & Collins, P. L. (1999). Model for polymerase access to the overlapped L gene of respiratory syncytial virus. *Journal of Virology*, 73(1), 388-397.

Fearns, R., & Collins, P. L. (1999). Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *Journal of Virology*, 73(7), 5852-5864.

Felsani, A., Mileo, A. M., & Paggi, M. G. (2006). Retinoblastoma family proteins as key targets of the small DNA virus oncoproteins. *Oncogene*, 25(38), 5277-5285.

Fix, J., Galloux, M., Blondot, M. L., & Eléouët, J. F. (2011). The insertion of fluorescent proteins in a variable region of respiratory syncytial virus L polymerase results in fluorescent and functional enzymes but with reduced activities. *The Open Virology Journal*, 5, 103-108.

Fleming, E. H., Kolokoltssov, A. A., Davey, R. A., Nichols, J. E., & Roberts, N. J. (2006). Respiratory syncytial virus F envelope protein associates with lipid rafts without a requirement for other virus proteins. *Journal of Virology*, 80(24), 12160-12170.

Flint, J., Racaniello, V. R., Rall, G. F., Skalka, A. M., & Enquist, L. W. (2015). *Principles of virology 4th edition, volume II pathogenesis and control*. Washington, DC: ASM press.

Förster, A., Maertens, G. N., Farrell, P. J., & Bajorek, M. (2015). Dimerization of Matrix protein is required for budding of Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Virology*, 89(8), 4624-4635.

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.

Galloux, M., Tarus, B., Blazevic, I., Fix, J., Duquerroy, S., & Eléouët, J. F. (2012). Characterization of a viral phosphoprotein binding site on the surface of the respiratory syncytial nucleoprotein. *Journal of Virology*, 86(16), 8375-8387.

Gaona, J., Santiago-Olivares, C., Ortega, E., & Gómez, B. (2014). Respiratory Syncytial Virus Persistence in Macrophages Upregulates Fcγ Receptors expression. *Viruses*, 6(2), 624-639.

García, J., García-Barreno, B., Vivo, A., & 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.

Garnett, T. O., & Duerksen-Hughes, P. J. (2006). Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Archives of Virology*, 151(12), 2321-2335.

Ghaemi-Bafghi, M., & Haghparast, A. (2013). Viral Evasion and Subversion Mechanisms of the Host Immune System. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 15(10), 1-6.

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. *Archives of Virology*, 148(7), 1419-1429.

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.

Ghildyal, R., Ho, A., Dias, M., Soegiyono, L., Bardin, P. G., Tran, K. C., Teng, M. N., and Jans, D. A. (2009) The respiratory syncytial virus matrix protein possesses a Crm1-mediated nuclear export mechanism. *Journal of Virology*, 83(11), 5353–5362.

Ghildyal, R., Ho, A., Wagstaff, K. M., Dias, M. M., Barton, C. L., Jans, P., Bardin, P., and Jans, D. A. (2005) Nuclear import of the respiratory syncytial virus matrix protein is mediated by importin beta1 independent of importin alpha. *Biochemistry*, 44(38), 12887–12895.

Ghildyal, R., Li, D., Peroulis, I., Shields, B., Bardin, P. G., Teng, M. N., Collins, P. L., Meanger, J., & Mills, J. (2005). Interaction between the respiratory syncytial virus G glycoprotein cytoplasmic domain and the matrix protein. *Journal of General Virology*, 86(7), 1879-1884.

Giacinti, C., & Giordano, A. (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene*, 25(38), 5220-5227.

Giam, C. Z., & Jeang, K. T. (2007). HTLV-1 Tax and Adult T-cell Leukemia. *Frontiers in Bioscience*, 12(4), 1496-1507.

Gibbs, J. D., Ornoff, D. M., Igo, H. A., Zeng, J. Y., & Imani, F. (2009). Cell Cycle Arrest by Transforming Growth Factor β 1 Enhances Replication of Respiratory Syncytial Virus in Lung Epithelial Cells. *Journal of Virology*, 83(23), 12424-12431.

Gomez, R. S., Guisle-Marsollier, I., Bohmwald, K., Bueno, S. M., & Kalergis, A. M. (2014). Respiratory syncytial virus: Pathology, therapeutic drugs and prophylaxis. *Immunology Letters*, 162(1), 237-247.

Gould, P. S., & Easton, A. J. (2007). Coupled translation of the second open reading frame of M2 mRNA is sequence dependent and differs significantly within the subfamily Pneumovirinae. *Journal of Virology*, 81(16), 8488-8496.

Gower, T. L., Peebles, M. E., Collins, P. L., & Graham, B. S. (2001). RhoA is activated during respiratory syncytial virus infection. *Virology*, 283(2), 188-196.

Griffin, D. E., Lin, Wen-Hsuan., & Pan, Chien-Hsiung. (2012). Measles virus, immune control, and persistence. *FEMS microbiology reviews*, 36(3), 649-662.

Groschel, B., & Bushman, F. (2005). Cell Cycle Arrest in G2/M Promotes Early Steps of Infection by Human Immunodeficiency Virus. *Journal of Virology*, 79(9), 5695-5704.

Grosfeld, H., Hill, M. G., & Collins, P. L. (1995). RNA replication by respiratory syncytial virus (RSV) is directed by the N, P, and L proteins; transcription also occurs under these conditions but requires RSV superinfection for efficient synthesis of full-length mRNA. *Journal of Virology*, 69(9), 5677-5686.

Groskreutz, D. J., Babor, E. C., Monick, M. M., Varga, S. M., & Hunninghake, G. W. (2010). Respiratory syncytial virus limits α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α) phosphorylation to maintain translation and viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, 285(31), 24023-24031.

Guerrero-Plata, A., Ortega, E., & Gomez, B. (2001). Persistence of respiratory syncytial virus in macrophages alters phagocytosis and pro-inflammatory cytokine production. *Viral Immunology*, 14(1), 19-30.

Gumbiner, B. M., & Kim, N. G. (2014). The Hippo-YAP signaling pathway and contact inhibition of growth. *Journal of Cell Science*, 127(4), 709-717.

Hallak, L. K., Collins, P. L., Knudson, W., & Peebles, M. E. (2000). Iduronic acid-containing glycosaminoglycans on target cells are required for efficient respiratory syncytial virus infection. *Virology*, 271(2), 264-275.

Hanley, L. L., McGivern, D. R., Teng, M. N., Djang, R., Collins, P. L., & Fearn, R. (2010). Roles of the respiratory syncytial virus trailer region: Effects of mutations on genome production and stress granule formation. *Virology*, 406(2), 241-252.

Hardy, R. W., & Wertz, G. W. (2000). The Cys3-His1 motif of the respiratory syncytial virus M2-1 protein is essential for protein function. *Journal of Virology*, 74(13), 5880-5885.

Hartwell, L. H., & Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: Controls That Ensure the Order of Cell Cycle Events. *Science*, 246(1), 629-634.

He, Y., Xu, K., Keiner, B., Zhou, J., Czudai, V., Li, T., Liu, C. J., Klenk, H. D., Shu, Y. L., & Sun, B. (2010). Influenza A Virus Replication Induces Cell Cycle Arrest in G0/G1 Phase. *Journal of Virology*, 84(24), 12832-12840.

Hegele, R. G., Hayashi, S., Bramley, A. M., & Hogg, J. C. (1994). Persistence of respiratory syncytial virus genome and protein after acute bronchiolitis in guinea pigs. *CHEST Journal*, 105(6), 1848-1854.

Heise, M. T., & Virgin, H. W. (2013). Pathogenesis of viral infection. En Knipe, D. M. & Howley, P. M. (Ed.), *Fields Virology sexta edición* (pp. 254-285). Philadelphia: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS.

Herniou, E. A., Olszewski, J. A., Cory, J. S., & O'Reilly, D. R. (2003). The Genome Sequence and Evolution of Baculoviruses. *Annual Review of Entomology*, 48(1), 211-234.

Hirano, T. (2002). The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes & Development*, 16(4), 399-414.

Hobson, L., & Everard, M. L. (2008). Persistent of respiratory syncytial virus in human dendritic cells and influence of nitric oxide. *Clinical & Experimental Immunology*, 151(2), 359-366.

Hwang, H. C., & Clurman, B. E. (2005). Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene*, 24(17), 2776-2786.

Johnson, J. E., Gonzales, R. A., Olson, S. J., Wright, P. F., & Graham, B. S. (2007). The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. *Modern Pathology*, 20(1), 108-119.

Johnson, S. M., McNally, B. A., Ioannidis, I., Flano, E., Teng, M. N., Oomens, A. G., Walsh, E. E., & Peeples, M. E. (2015). Respiratory Syncytial Virus Uses CX3CR1 as a Receptor on Primary Human Airway Epithelial Cultures. *PLoS Pathogens*, 11(12), 1-16.

Johnson, T. R., Johnson, C. N., Corbett, K. S., Edwards, G. C., & Graham, B. S. (2011). Primary human mDC1, mDC2, and pDC Dendritic Cells are Differentially Infected and Activated by Respiratory Syncytial Virus. *PLoS one*, 6(1), e16458.

Kastan, M. B., & Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432(7015), 316-323.

Kastan, M. B., Canman, C. E., & Leonard, C. J. (1995). P53, cell cycle control and apoptosis: Implications for Cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 14(1), 3-15.

Katsuno, Y., Suzuki, A., Sugimura, K., Okumura, K., Zineldeen, D. H., Shimada, M., Niida, H., Mizuno, T., Hanaoka, F., & Nakanishi, M. (2009). Cyclin A–Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3184-3189.

King, A. M., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. (2012). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, volume 9. San Diego, CA: Elsevier.

Kuo, L., Fearn, R., & Collins, P. L. (1996). The Structurally Diverse Intergenic Regions of Respiratory Syncytial Virus Do Not Modulate Sequential Transcription by a Dicistronic Minigenome. *Journal of Virology*, 70(9), 6143-6150.

Lamb, R. A., & Parks, G. D. (2013). *Paramyxoviridae*. En Knipe, D. M. & Howley, P. M. (Ed.), *Fields Virology sexta edición* (pp. 957-995). Philadelphia: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS.

Lay, M. K., González, P. A., León, M. A., Céspedes, P. F., Bueno, S. M., Riedel, C. A., & Kalergis, A. M. (2012). 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.

Lee, J. H., & Paull, T. T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*, 308(5721), 551-554.

LeVine, A. M., Elliott, J., Whitsett, J. A., Srikiatkachorn, A., Crouch, E., DeSilva, N., & Korfhagen, T. (2004). Surfactant protein-d enhances phagocytosis and pulmonary clearance of respiratory syncytial virus. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 31(2), 193-199.

Li, D., Jans, D. A., Bardin, P. G., Meanger, J., Mills, J., & Ghildyal, R. (2008). Association of respiratory syncytial virus M protein with viral nucleocapsids is mediated by the M2-1 protein. *Journal of Virology*, 82(17), 8863-8870.

Li, X. Q., Fu, Z. F., Alvarez, R., Henderson, C., & Tripp, R. A. (2006). Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infects Neuronal Cells and Processes that Innervate the Lung by a Process Involving RSV G Protein. *Journal of Virology*, 80(1), 537-540.

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.

Liljeroos, L., Krzyzaniak, M. A., Helenius, A., & Butcher, S. J. (2013). Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(27), 11133-11138.

Lin, G. Y., & Lamb, R. A. (2000). The Paramyxovirus Simian Virus 5 V Protein Slows Progression of the Cell Cycle. *Journal of Virology*, 74(19), 9152-9166.

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.

Liuzzi, M., Mason, S. W., Cartier, M., Lawetz, C., McCollum, R. S., Dansereau, N., Bolger, G., Lapeyre, N., Gaudette, Y., Lagacé, L., Massariol, Marie-Josée., Dô, F., Whitehead, P., Lamarre, L., Scouten, E., Bordeleau, J., Landry, S., Rancourt, J., Fazal, G., & Simoneau, B. (2005). Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscriptional mRNA guanylation by viral RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of Virology*, 79(20), 13105-13115.

Lo, M. S., Brazas, R. M., & Holtzman, M. J. (2005). Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness. *Journal of Virology*, 79(14), 9315-9319.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., & Scott, M. P. (2013). *Molecular Cell Biology*. (7^a ed.). New York: W. H. Freeman and Company.

Lomonte, P., Sullivan, K. F., & Everett, R. D. (2001). Degradation of Nucleosome-associated Centromeric Histone H3-like Protein CENP-A Induced by Herpes Simplex Virus Type 1 Protein ICP0. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5829-5835.

Lovejoy, C. A., & Cortez, D. (2009). Common mechanisms of PIKK regulation. *DNA Repair*, 8(9), 1004-1008.

Low, K. W., Tan, T., Ng, K., Tan, Boon-Huan., & Sugrue, R. J. (2008). The RSV F and G glycoproteins interact to form a complex on the surface of infected cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 366(2), 308-313.

Lowery, D. M., Lim, D., & Yaffe, M. B. (2005). Structure and function of Polo-like kinases. *Oncogene*, 24(2), 248-259.

Lu, B., Ma, C. H., Brazas, R., & Jin, H. (2002). The major phosphorylation sites of the respiratory syncytial virus phosphoprotein are dispensable for virus replication in vitro. *Journal of Virology*, 76(21), 10776-10784.

Lyons, A. B. (2000). Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *Journal of Immunological Methods*, 243(1), 147-154.

Malhotra, R., Ward, M., Bright, H., Priest, R., Foster, M. R., Hurle, M., Blair, E., & Bird, M. (2003). Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor (s) on epithelial cells. *Microbes and Infection*, 5(2), 123-133.

Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9(3), 153-166.

Manchado, E., Eguren, M., & Malumbres, M. (2010). The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C): cell-cycle-dependent and-independent functions. *Biochemical Society Transactions*, 38(1), 65-71.

Martinelli, M., Frati, E. R., Zappa, A., Ebranati, E., Bianchi, S., Pariani, E., Amendola, A., Zehender, G., & Tanzi, E. (2014). Phylogeny and population dynamics of respiratory syncytial virus (Rsv) A and B. *Virus Research*, 189(1), 293-302.

Martínez, I., Lombardía, L., Herranz, C., García-Barreno, B., Domínguez, O., & Melero, J. A. (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.

Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N., & Oda, M. (2010). Eukaryotic chromosome DNA replication: Where, when, and how?. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 89-130.

Massagué, J., Blain, S. W., & Lo, R. S. (2000). TGF β Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders. *Cell*, 103(2), 295-309.

Matsumoto, Y., Hayashi, Y., Omori, H., Honda, T., Daito, T., Horie, M., Ikuta, K., Fjino, K., Nakamura, S., Schneider, U., Chase, G., Yoshimori, T., Schwemmle, M., & Tomonaga, K. (2012). Bornavirus Closely Associates and Segregates with Host Chromosomes to Ensure Persistent Intranuclear Infection. *Cell Host & Microbe*, 11(5), 492-503.

Matsuoka, M., & Jeang, K. T. (2007). Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nature Reviews Cancer*, 7(4), 270-280.

McGivern, D. R., Collins, P. L., & Fearn, R. (2005). Identification of internal sequences in the 3' leader region of human respiratory syncytial virus that enhance transcription and confer replication processivity. *Journal of Virology*, 79(4), 2449-2460.

Mejías, A., Chávez-Bueno, S., Gómez, A. M., Somers, C., Estripeaut, D., Torres, J. P., Jafri, H. S., & Ramilo, O. (2008). Respiratory syncytial virus persistence: evidence in the mouse model. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 27(10), S60-S62.

Melero, J. A. (2007). Molecular Biology of Human Respiratory Syncytial Virus. En Kane, P. (Ed.), *Perspectives in medical virology volume 14, Respiratory Syncytial Virus*. (pp. 1-42). Amsterdam: Elsevier B. V.

Melero, J. A., & Moore, M. L. (2013). Influence of Respiratory Syncytial Virus Strain Differences on Pathogenesis and Immunity. En. Anderson, L. J., & Graham, B. S. (Ed), *Challenges and Opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccines* (pp. 59-82). Berlin: Springer.

Midulla, F., Villani, A., Panuska, J. R., Dab, I., Kolls, J. K., Merolla, R., & Ronchetti, R. (1993). Respiratory Syncytial Virus Lung Infection in Infants: Immunoregulatory Role of Infected Alveolar Macrophages. *Journal of Infectious Diseases*, 168(6), 1515-1519.

Minella, A. C., & Clurman, B. E. (2005). Mechanisms of tumor suppression by the SCFFbw7. *Cell cycle*, 4(10), 1356-1359.

Mink, M. A., Stec, D. S., & Collins, P. L. (1991). Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology*, 185(2), 615-624.

Mitra, J., & Enders, G. H. (2004). Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells. *Oncogene*, 23(19), 3361-3367.

Mo, M., Shahar, S., Fleming, S. B., & Mercer, A. A. (2012). How viruses affect the cell cycle through manipulation of the APC/C. *Trends in Microbiology*, 20(9), 440-448.

Money, V. A., McPhee, H. K., Mosely, J. A., Sanderson, J. M., & Yeo, R. P. (2009). Surface features of a Mononegavirales matrix protein indicate sites of membrane interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(11), 4441-4446.

Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature*, 374(6518), 131-134.

Mouland, A. J., Coady, M., Yao, X. J., & Cohen, É. A. (2002). Hypophosphorylation of Poly (A) Polymerase and Increased Polyadenylation Activity are Associated with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Expression. *Virology*, 292(2), 321-330.

Mullins, J. A., Lamonte, A. C., Bresee, J. S., & Anderson, L. J. (2003). Substantial variability in community respiratory syncytial virus season timing. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 22(10), 857-863.

Munday, D. C., Emmott, E., Surtees, R., Lardeau, C. H., Wu, W., Duprex, W. P., Dove, B. K., Barr, J. N., & Hiscox, J. A. (2010). Quantitative Proteomic Analysis of A549 Cells Infected with Human Respiratory Syncytial Virus. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(11), 2438-2459.

Munday, D. C., Wu, W., Smith, N., Fix, J., Noton, S. L., Galloux, M., Touzelet, O., Armstrong, S. D., Dawson, J. M., Aljabar, W., Easton, A. J., Rameix-Welti, Marie-Anne., Peres, O. A., Simabuco, F. M., Ventura, A. M., Hughes, D. J., Barr, J. N., Fearn, R., Digard, P., Eléouët, J. F., & Hiscox, A. J. (2015). Interactome analysis of the human respiratory syncytial virus RNA polymerase complex identifies protein chaperones as important cofactors that promote L-protein stability and RNA synthesis. *Journal of Virology*, 89(2), 917-930.

Munir, S., Le, N. C., Luongo, C., Buchholz, U. J., Collins, P. L., & Bukreyev, A. (2008). Nonstructural proteins 1 and 2 of respiratory syncytial virus suppress maturation of human dendritic cells. *Journal of Virology*, 82(17), 8780-8796.

Murphy, L. B., Loney, C., Murray, J., Bhella, D., Ashton, P., & Yeo, R. P. (2003). Investigations into the amino-terminal domain of the respiratory syncytial virus nucleocapsid protein reveal elements important for nucleocapsid formation and interaction with the phosphoprotein. *Virology*, 307(1), 143-153.

Murray, A. (1994). Cell cycle checkpoints. *Current opinion in cell biology*, 6(6), 872-876.

Murray, J., Loney, C., Murphy, L. B., Graham, S., & Yeo, R. P. (2001). Characterization of monoclonal antibodies raised against recombinant respiratory syncytial virus nucleocapsid (N) protein: identification of a region in the carboxy terminus of N involved in the interaction with P protein. *Virology*, 289(2), 252-261.

Nair, H., Nokes, D. J., Gessner, B. D., Dherani, M., Madhi, S. A., Singleton, R. J., O'Brien, K. L., Roca, A., Wright, P. F., Bruce, N., Chandran, A., Theodoratou, E., Sutanto, A., Sedyaningsih, E. R., Ngama, M., Munywoki, P. K., Kartasasmita, C., Simões, E., Rudan, I., & Weber, M. W. (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.

Nakamura-López, Y., Villegas-Sepúlveda, N., Sarmiento-Silva, R. E., & Gómez, B. (2011). Intrinsic apoptotic pathway is subverted in mouse macrophages persistently infected by RSV. *Virus Research*, 158(1), 98-107.

Naniche, D., Reed, S. I., & Oldstone, M. B. (1999). Cell cycle arrest during measles virus infection: a G0-like block leads to suppression of retinoblastoma protein expression. *Journal of Virology*, 73(3), 1894-1901.

Nelson, P. J., & Daniel, T. O. (2002). Emerging targets: Molecular mechanisms of cell contact-mediated growth control. *Kidney international*, 61(1), S99-S105.

Nieto-Torres, J. L., Verdiá-Báguena, C., Castaño-Rodríguez, C., Aguilera, V. M., & Enjuanes, L. (2015). Relevance of Viroporin Ion Channel Activity on Viral Replication and Pathogenesis. *Viruses*, 7(7), 3552-3573.

Nieva, J. L., & Carrasco, L. (2015). Viroporins: Structures and Functions beyond Cell Membrane Permeabilization. *Viruses*, 7(10), 5169-5171.

Niewiesk, S., Ohnimus, H., Schnorr, J. J., Götzelmann, M., Schneider-Schaulies, S., Jassoy, C., & ter Meulen, V. (1999). Measles Virus-induced immunosuppression in cotton rats is associated with cell cycle retardation in uninfected lymphocytes. *Journal of General Virology*, 80(8), 2023-2029.

-
-
- Nunez, R. (2001). DNA Measurement and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. *Current Issues in Molecular Biology*, 3(3), 67-70.
- Oldstone, M. B. A. (2006). Viral persistence: parameters, mechanisms and future predictions. *Virology*, 344(1), 111-118.
- Panuska, J. R., Cirino, N. M., Midulla, F., Despot, J. E., McFadden Jr, E. R., & Huang, Y. T. (1990). Productive Infection of Isolated Human Alveolar Macrophages by Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Clinical Investigation*, 86(1), 113-119.
- Parrilla-Castellar, E. R., Arlander, S. J. H., & Karnitz, L. (2004). Dial 9-1-1 for DNA damage: The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA repair*, 3(8), 1009-1014.
- Pavletich, N. P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdk, their cyclin activators, and cip and INK4 inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, 287(5), 821-828.
- Pawlina, W. (2016). *Histology a Text and Atlas with correlated Cell and Molecular Biology*. (7^a ed.). Baltimore: Wolters Kluwer.
- Pentecost, M., Vashisht, A. A., Lester, T., Voros, T., Beaty, S. M., Park, A., Wang, Y. E., Yun, T. E., Freiberg, A. N., Wohlschlegel, J. A., & Lee, B. (2015). Evidence for Ubiquitin-Regulated Nuclear and Subnuclear Trafficking among *Paramyxovirinae* Matrix Proteins. *PLoS Pathogens*, 11(3), 1-33.
- Peters, J. M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(9), 644-656.
- Petersen, B. O., Lukas, J., Sørensen, C. S., Bartek, J., & Helin, K. (1999). Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *The EMBO Journal*, 18(2), 396-410.
- Pines, J. (2011). Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(7), 427-438.
- Planz, O., Pleschka, S., Oesterle, K., Berberich-Siebelt, F., Ehrhardt, C., Stitz, L., & Ludwig, S. (2003). Borna Disease Virus Nucleoprotein Interacts with the CDC2-cyclin B1 Complex. *Journal of Virology*, 77(20), 11186-11192.
- Planz, O., Pleschka, S., Oesterle, K., Berberich-Siebelt, F., Ehrhardt, C., Stitz, L., & Ludwig, S. (2003). Borna Disease Virus Nucleoprotein Interacts with the CDC2-cyclin B1 complex. *Journal of Virology*, 77(20), 11186-11192.
- Porter, L. A., & Donoghue, D. J. (2003). Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators. *Progress in Cell Cycle Research*, 5(1), 335-347.

Pringle, C. R., Shirodaria, P. V., Cash, P., Chiswell, D. J., & Malloy, P. (1978). Initiation and maintenance of persistent infection by respiratory syncytial virus. *Journal of Virology*, 28(1), 199-211.

Radhakrishnan, A., Yeo, D., Brown, G., Zu Myaing, M., Iyer, L. R., Fleck, R., Tan, Boon-Huan., Aitken, J., Sanmun, D., Tang, K., Yarwood, A., Brink, J., & Sugrue, R. J. (2010). Protein analysis of purified respiratory syncytial virus particles reveals an important role for heat shock protein 90 in virus particle assembly. *Molecular y Cellular Proteomics*, 9(9), 1829-1848.

Reimers, K., Buchholz, K., & Werchau, H. (2005). Respiratory syncytial virus M2-1 protein induces the activation of nuclear factor kappa B. *Virology*, 331(2), 260-268.

Reinhardt, H. C., & Yaffe, M. B. (2009). Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Current opinion in cell biology*, 21(2), 245-255.

Rezaee, F., Gibson, L. F., Piktel, D., Othumpangat, S., & Piedimonte, G. (2011). Respiratory syncytial virus infection in human bone marrow stromal cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 45(2), 277-286.

Rice, A. P., & Kimata, J. T. (2015). Subversion of Cell Cycle Regulatory Mechanisms by HIV. *Cell Host & Microbe*, 17(6), 736-740.

Rixon, H. W. M., Brown, G., Aitken, J., McDonald, T., Graham, S., & Sugrue, R. J. (2004). The small hydrophobic (SH) protein accumulates within lipid-raft structures of the Golgi complex during respiratory syncytial virus infection. *Journal of General Virology*, 85(5), 1153-1165.

Robinson, R. F. (2008). Impact of Respiratory Syncytial virus in the United States. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 65(23).

Rodríguez-Auad, J. P., Nava-Frías, M., Casasola-Flores, J., Johnson, K. M., Nava-Ruiz, A., Pérez-Robles, V., & Caniza, M. A. (2012). The epidemiology and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infection in children at a public pediatric referral hospital in Mexico. *International Journal of Infectious Diseases*, 16(7), e508-e513.

Roederer, M. (2011). Interpretation of Cellular Proliferation Data: Avoid the Panglossian. *Cytometry Part A*, 79(2), 95-101.

Rohde, G., Wiethège, A., Borg, I., Kauth, M., Bauer, T. T., Gillissen, A., Bufe, A., & Schultze-Werninghaus, G. (2003). Respiratory viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalisation: a case-control study. *Thorax*, 58(1), 37-42.

Rosner, M., Schipany, K., & Hengstschläger, M. (2013). Merging high-quality biochemical fractionation with a refined flow cytometry approach to monitor nucleocytoplasmic protein expression throughout the unperturbed mammalian cell cycle. *Nature Protocols*, 8(3), 602-626.

Russo, A. A., Jeffrey, P. D., & Pavletich, N. P. (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 3(8), 696-700.

Ryan, E. L., Hollingworth, R., & Grand, R. J. (2016). Activation of the DNA Damage Response by RNA Viruses. *Biomolecules*, 6(2), 1-24.

Saikh, F. Y., Cox, R. G., Lifland, A. W., Hotard, A. L., Williams, J. V., Moore, M. L., Santangelo, P. J., & Crowe, J. E. (2012). A critical phenylalanine residue in the respiratory syncytial virus fusion protein cytoplasmic tail mediates assembly of internal viral proteins into viral filaments and particles. *MBio*, 3(1), 1-10.

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 39-85.

San-Juan-Vergara, H., Sampayo-Escobar, V., Reyes, N., Cha, B., Pacheco-Lugo, L., Wong, T., Peeples, M. E., Collins, P. L., Castaño, M. E., & Mohapatra, S. S. (2012). Cholesterol-rich microdomains as docking platforms for respiratory syncytial virus in normal human bronchial epithelial cells. *Journal of Virology*, 86(3), 1832-1843.

Sarmiento, R. E., Tirado, R., & Gómez, B. (2002). Characteristics of a respiratory syncytial virus persistently infected macrophage-like culture. *Virus Research*, 84(1), 45-58.

Schwarze, J., O'Donnell, D. R., Rohwedder, A., & Openshaw, P. J. M. (2004). Latency and persistence of respiratory syncytial virus despite T cell immunity. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 169(7), 801-805.

Seemungal, T., Harper-Owen, R., Bhowmik, A., Moric, I., Sanderson, G., Message, S., MacCallum, P., Meade, T. W., Jeffries, D. J., Johnston, S. L., & Wedzicha, J. A. (2001). Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(9), 1618-1623.

Sevilla, N., Kunz, S., Holz, A., Lewicki, H., Homann, D., Yamada, H., Campbell, K. P., de la Torre, J. C., & Oldstone, M. B. A. (2000). Immunosuppression and resultant viral persistence by specific viral targeting of dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(9), 1249-1260.

Siegel, J. D., Rhinehart, E., Jackson, M., & Chiarello, L. (2007). 2007 guideline for isolation precautions: preventing transmission of infectious agents in health care settings. *American Journal of Infection Control*, 35(10), S65-S164.

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.

Sikkel, M. B., Quint, J. K., Mallia, P., Wedzicha, J. A., & Johnston, S. L. (2008). Respiratory Syncytial Virus Persistence in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 27(10), S63-S70.

Singh, M., Berger, B., & Kim, P. S. (1999). LearnCoil-VMF: computational evidence for coiled-coil-like motifs in many viral membrane-fusion proteins. *Journal of Molecular Biology*, 290(5), 1031-1041.

Song, B., Yeh, K. C., Liu, J., & Knipe, D. M. (2001). Herpes Simplex Virus Gene Products Required for Viral Inhibition of Expression of G1-Phase Functions. *Virology*, 290(2), 320-328.

Spann, K. M., Tran, K. C., Chi, B., Rabin, R. L., & Collins, P. L. (2004). Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages. *Journal of Virology*, 78(12), 6705.

Srinivasakumar, N., Ogra, P. L., & Flanagan, T. D. (1991). Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEp-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay. *Journal of Virology*, 65(8), 4063-4069.

Strauss, J. H., & Strauss, E. G. (2008). *Viruses and Human Disease, second edition*. California, SD: Academic Press.

Sutton, T. C., Tayyari, F., Khan, M. A., Manson, H. E., & Hegele, R. G. (2007). T helper 1 background protects against airway hyperresponsiveness and inflammation in guinea pigs with persistent respiratory syncytial virus infection. *Pediatric Research*, 61(5), 525-529.

Tan, Y. R., Yang, T., Liu, S. P., Xiang, Y., Qu, F., Liu, H. J., & Qin, X. Q. (2008). Pulmonary peptidergic innervation remodeling and development of airway hyperresponsiveness induced by RSV persistent infection. *Peptides*, 29(1), 47-56.

Tang, R. S., Nguyen, N., Cheng, X., & Jin, H. (2001). Requirement of cysteines and length of the human respiratory syncytial virus M2-1 protein for protein function and virus viability. *Journal of Virology*, 75(23), 11328-11335.

Tawar, R. G., Duquerroy, S., Vonrhein, C., Varela, P. F., Damier-Piolle, L., Castagné, N., MacLellan, K., Bedouelle, H., Bricogne, G., Bhella, D., Eléouët, J. F., & Rey, F. A.

(2009). Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science*, 326(5957), 1279-1283.

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.

Techaarpornkul, S., Collins, P. L., & Peeples, M. E. (2002). Respiratory syncytial virus with the fusion protein as its only viral glycoprotein is less dependent on cellular glycosaminoglycans for attachment than complete virus. *Virology*, 294(2), 296-304.

Thompson, W. W., Shay, D. K., E., Weintraub, E., Brammer, L., Cox, N., Anderson, L. J., & Fukuda, K. (2003). Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *Jama*, 289(2), 179-186.

Tran, T. L., Castagné, N., Dubosclard, V., Noinville, S., Koch, E., Moudjou, M., Henry, C., Bernard, J., Yeo, R. P., & Eléouët, J. F. (2009). The respiratory syncytial virus M2-1 protein forms tetramers and interacts with RNA and P in a competitive manner. *Journal of Virology*, 83(13), 6363-6374.

Utle, T. J., Ducharme, N. A., Varthakavi, V., Shepherd, B. E., Santangelo, P. J., Lindquist, M. E., Goldenring, J. L., & Crowe, J. E. (2008). Respiratory syncytial virus uses a Vps4-independent budding mechanism controlled by Rab11-FIP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(29), 10209-10214.

Valdovinos, M. R., & Gómez, B. (2003). Establishment of respiratory syncytial virus persistence in cell lines: association with defective interfering particles. *Intervirology*, 46(3), 190-198.

Van Den Heuvel, S., & Dyson, N. J. (2008). Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(9), 713-724.

Varga, S. M., & Braciale, T. J. (2013). The adaptive immune response to respiratory syncytial virus. En. Anderson, L. J., & Graham, B. S. (Ed), *Challenges and Opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccines* (pp. 155-171). Berlin: Springer.

Vázquez, N., Greenwell-Wild, T., Marinos, N. J., Swaim, W. D., Nares, S., Ott, D. E., Schubert, U., Henklein, P., Orenstein, J. M., Sporn, M. B., & Wahl, S. M. (2005). Human Immunodeficiency Virus Type 1-Induced Macrophage Gene Expression Includes the p21 Gene, a Target for Viral Regulation. *Journal of Virology*, 79(7), 4479-4491.

Vergara, H. S. J., Gutiérrez, M. A., & Mohapatra, S. S. (2006). Biología molecular del virus sincitial respiratorio y desarrollo de estrategias profilácticas. *Revista Científica Salud Uninorte*, 22(2), 135-153.

Verger, J. T., & Verger, E. E. (2012). Respiratory syncytial virus bronchiolitis in children. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 24(4), 555-572.

Villarreal, L. P. (2004). Are viruses alive?. *Scientific American-American Edition*, 291, 100-105.

Vodermaier, H. C. (2004). APC/C and SCF: Controlling Each Other and the Cell Cycle. *Current Biology*, 14(18), R787-R796.

Wallace, P. K., Tario, J. D., Fisher, J. L., Wallace, S. S., Ernstoff, M. S., & Muirhead, K. A. (2008). Tracking Antigen-Driven Responses by Flow Cytometry: Monitoring Proliferation by Dye Dilution. *Cytometry Part A*, 73(11), 1019-1034.

Wang, J. T., McElvain, L. E., & Whelan, S. P. (2007). Vesicular stomatitis virus mRNA capping machinery requires specific cis-acting signals in the RNA. *Journal of Virology*, 81(20), 11499-11506.

Wang, W. J., Soni, R. K., Uryu, K., & Tsou, M. F. B. (2011). The conversion of centrioles to centrosomes: essential coupling of duplication with segregation. *The Journal of cell biology*, 193(4), 727-739.

Wang, Z., Fan, M., Candas, D., Zhang, T. Q., Qin, L., Eldridge, A., Wachsmann-Hogiu, S., Ahmed, K. M., Chromy, B. A., Nantajit, D., Duru, N., He, F., Chen, M., Finkel, T., Weinstein, L. S., & Li, J. J. (2014). Cyclin B1/Cdk1 Coordinates Mitochondrial Respiration for Cell-Cycle G2/M progression. *Developmental cell*, 29(2), 217-232.

Whelan, S. (2013). Viral Replication Strategies. En Knipe, D. M. & Howley, P. M. (Ed.), *Fields Virology sexta edición* (pp. 105-126). Philadelphia: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS.

Wilkinson, T. M. A., Donaldson, G. C., Johnston, S. L., Openshaw, P. J. M., & Wedzicha, J. A. (2006). Respiratory syncytial virus, airway inflammation, and FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173(8), 871-876.

Wu, W., Munday, D. C., Howell, G., Platt, G., Barr, J. N., & Hiscox, J. A. (2011). Characterization of the Interaction between Human Respiratory Syncytial Virus and the Cell Cycle in Continuous Cell Culture and Primary Human Airway Epithelial Cells. *Journal of virology*, 85(19), 10300-10309.

Yoshizuka, N., Yoshizuka-Chadani, Y., Krishnan, V., & Zeichner, S. L. (2005). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr-Dependent Cell Cycle Arrest through a Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway. *Journal of Virology*, 79(17), 11366-11381.

Yuan, H., Kamata, M., Xie, Y. M., & Chen, I. S. Y. (2004). Increased Levels of Wee-1 Kinase in G2 are Necessary for Vpr-and Gamma Irradiation-induced G2 Arrest. *Journal of Virology*, 78(15), 8183-8190.

Zhao, R. Y., & Elder, R. T. (2005). Viral infections and cell cycle G2/M regulation. *Cell Research*, 15(3), 143-149.

Zhao, X., Singh, M., Malashkevich, V. N., & Kim, P. S. (2000). Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26), 14172-14177.

Zhou, B. B. S., & Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408(6811), 433-439.

Zhou, H., Cheng, X., & Jin, H. (2003). Identification of amino acids that are critical to the processivity function of respiratory syncytial virus M2-1 protein. *Journal of Virology*, 77(9), 5046-5053.

Zimmerman, E. S., Sherman, M. P., Blackett, J. L., Neidleman, J. A., Kreis, C., Mundt, P., Williams, S. A., Warmerdam, M., Kahn, J., Hecht, F. M., Grant, R. M., de Noronha, C. M. C., Weyrich, A. S., Greene, W. C., & Planelles, V. (2006). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Induces DNA Replication Stress In Vitro and In Vivo. *Journal of Virology*, 80(21), 10407-10418.