

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

TESIS

“EVALUACION DE LA INTERACCION DE LA PROTEÍNA DE MATRIZ DEL VIRUS  
SINCITAL RESPIRATORIO HUMANO (VSRH) CON LA PROTEINA NUCLEOLAR  
FIBRILARINA”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

B.E. JOSÉ MANUEL ULLOA AGUILAR

CO-DIRECTOR EXTERNO: **DR. MOISÉS LEÓN JUÁREZ**

DEPTO. DE INMUNOBIOQUÍMICA, INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA.

CO-DIRECTORA INTERNA: **DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA**

DPTO. DE CIENCIAS DE LA SALUD, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA

ASESOR: **DR. RAMÓN ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA-CONDE**

LAB. DE VIROLOGÍA MOLECULAR, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MORELOS

**Ciudad de México**

**Agosto, 2022**

### Declaración de originalidad

El que suscribe **José Manuel Ulloa Aguilar**, alumno (a) del posgrado de **Biología Experimental**, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: “**EVALUACION DE LA INTERACCION DE LA PROTEÍNA DE MATRIZ DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO HUMANO (VSRH) CON LA PROTEINA NUCLEOLAR FIBRILARINA**”,

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el **H. Jurado** para lo obtención del grado de **Maestro en Biología Experimental** es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 26 de agosto del 2022.

Atentamente

---

José Manuel Ulloa Aguilar

*Este documento debe ser firmado con tinta azul y debe anexarse copia en la tesis o idónea comunicación de resultados (tesina, reporte, etc.), el documento original será conservado por el Coordinador del Posgrado.*

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Numero de registro de beca otorgado por CONACYT:

El H. jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

JURADO

**Dr. Ramón Antonio González García Conde**

Investigador Titular B Laboratorio de Virología Molecular Universidad Autónoma del Estado de Morelos

**Dra. Leticia Cedillo Barrón**

Profesor-Investigadora 3C del Departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV

**Dr. Julio García Cordero**

Investigador Adjunto del Departamento de Biomedicina Molecular CINVESTAV

**Dr. Héctor Fernando Serrano**

Profesor-Investigador Titular C del Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr. Moisés León que hace aproximadamente 4 años me abrió las puertas de su laboratorio. Gracias a él, he tenido un crecimiento tanto académico como personal que me han ayudado a poder desenvolverme de mejor manera. Quisiera agradecer a la Dra. Roxana Uri, quien también ha sido una de las académicas que me ha inspirado. Agradezco el entusiasmo y forma de transmitir el gran conocimiento que posee.

Debo de agradecer a mi equipo de laboratorio del INPer, pues cada uno de ellos me apoyo a lo largo de estos años que he estado en el laboratorio. Sin ellos este trabajo no se hubiera realizado. Gracias por todos los momentos de risa y diversión que pasamos tanto en el laboratorio como fuera de el. Adicionalmente me gustaría agradecer a los CeciBoys y al equipo COVID. Pues gracias a ellos aprendí y pude aportar un poco de mi conocimiento durante la pandemia

Quiero agradecer a mis amigos de licenciatura: Estela y José Antonio que fueron y siguen siendo un pilar fundamental en mi vida. Gracias por apoyarme, brindarme su amistad y estar en los momentos en los que más lo he necesitado. Adicionalmente me gustaría agradecer a mis compañeros de generación de maestría. Ya que de cada uno de ellos pude aprender muchas cosas. Sin embargo, me gustaría hacer una mención y agradecimiento a Sergio García. Quien no solo fue compañero de maestría, si no también en su momento lo fue en la licenciatura. También me gustaría agradecer a Juan José y Victor Zuñiga, miembros del Centro Cultural The Real Under y Circuit Music respectivamente. Por ayudarme a crecer en otro aspecto de mi vida. Y brindarme las herramientas necesarias para poder fungir como productor/dj.

Finalmente, pero no menos importante me gustaría dedicar este trabajo a mis padres (Martha y Manuel), así como a mi hermana (Brenda). Ma, siempre estaré en deuda contigo, no tengo palabras para describir lo muy afortunado que soy por tenerte como mamá y apoyarme en todos los aspectos durante todos estos años. Pa, gracias por todos los sabios consejos que me has dado todos estos años, sé que hubieras preferido que estudiara otra carrera, pero con mucho cariño te dedico mi trabajo, no te voy a defraudar. Gracias por creer en mí. Brenda, soy afortunado de tenerte como hermana, durante todos estos años he aprendido muchas cosas a tu lado, aunque no esté cerca, siempre podrás contar con mi apoyo. Ustedes tres siempre han sido mi brújula que ha llevado a este barco a nuevos horizontes.

## ÍNDICE GENERAL

### ABREVIATURAS

### INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### RESUMEN

### ABSTRACT

#### 1. Introducción

##### 1.1 Aspectos generales del VSRH

##### 1.2 Características generales del genoma viral del VSRH

##### 1.3 Características funcionales y estructurales de las proteínas del VSRH

###### 1.3.1 Glicoproteína (G)

###### 1.3.2 Proteína de fusión (F)

###### 1.3.3 Fosfoproteína (P)

###### 1.3.4 Nucleoproteína (N)

###### 1.3.5 Polimerasa viral o proteína L

###### 1.3.6 Proteína M (M2-1/M2-2)

###### 1.3.7 Proteína SH

###### 1.3.8 Proteína de Matriz

###### 1.3.9 Proteínas no estructurales (NS1 y NS2)

##### 1.4 Ciclo de replicación del VSRH

###### 1.4.1 Interacción virus-célula e internalización de partícula viral

###### 1.4.2 Transcripción y replicación viral

###### 1.4.3 Ensamblaje y liberación de partícula viral

##### 1.5 Papel de núcleo durante las infecciones virales

#### 2. Antecedentes

#### 3. Justificación

#### 4. Hipótesis

## **5. Objetivos**

### **5.1 Objetivo general**

### **5.2 Objetivos específicos**

## **6. Metodología**

## **7. Resultados**

## **8. Discusión**

## **9. Conclusiones**

## **10. Prospectivas**

## **11. Referencias Bibliográficas**

### **ABREVIATURAS:**

VSRH: Virus Sincitial Respiratorio Humano

MPVH: Metapneumovirus

VNC: Virus Newcastle

TRS: Infecciones del tracto respiratorio superior

MOI: Multiplicidad de infección

MOCK: Células falsamente infectadas

SNC: Sistema nervioso central

DVG: Genomas virales defectuosos

GAG: Glicosaminoglicanos

RNP: Complejo ribonucleoproteico

CI: Cuerpos de inclusión

GL: Gotas lipídicas

NCP: Complejos de poros nucleares

FBL: Fibrilarina

B23: Nucleofosmina

snoRNA: ARN nucleolares pequeños

RMSF: Raíz cuadrada del promedio de fluctuaciones

RMN: Resonancia magnética nuclear

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Fig.1 Agentes etiológicos de las infecciones respiratorias agudas

Fig.2 Representación esquemática de una partícula filamentosa del VSRH y su genoma.

Fig.3 Representación esquemática del ciclo de replicación del VSRH.

Fig. 4 Evaluación de la purificación de la proteína de matriz del VSRH por azul de coomassie.

Fig. 5 Evaluación de la purificación de la proteína de matriz del VSRH por Western Blot.

Fig.6 Evaluación de la presencia de anticuerpos IgGs contra la proteína recombinante de matriz del VSRH en sueros de ratas Wistar.

Fig.7 Evaluación de los sueros de ratas Wistar inmunizadas con la proteína recombinante de matriz del VSRH.

Fig.8 Evaluación de la presencia de la proteína Fibrilarina en la línea celular A549.

Fig.9 Cinética de infección en células A549 para evaluar la co-localización de la proteína de matriz del VSRH y la proteína celular fibrilarina.

Fig. 10 Alineamiento de la secuencia proteínica de la proteína de matriz del VSRH y el virus Hendra.

Fig. 11 Modelado in silico de las proteínas de matriz del VSRH, virus Hendra y la proteína celular fibrilarina.

Fig. 12 Análisis in silico para determinar los posibles sitios de contacto de la proteína fibrilarina con la proteína de matriz del VSRH y el virus Hendra.

Tabla 1. Condiciones de ratas inmunizadas con la proteína de matriz de VSRH

## RESUMEN

El Virus Sincicial Respiratorio Humano (VSRH) es uno de los principales agentes etiológicos causantes de infecciones respiratorias en infantes. Sin embargo, pueden ocurrir reinfecciones a lo largo de la vida. El VSRH suele ser un problema de salud pública que afecta a diversos grupos de edad. Es por ello, que generar información acerca de los mecanismos de infección viral se vuelve necesario, para así poder ofrecer tratamientos farmacológicos que permitan que los pacientes cursen una infección moderada y sin complicaciones clínicas. Uno de los mecanismos de interacción virus y huésped que en los últimos años se ha estado estudiando en VSRH, es la translocación de proteínas virales al núcleo. En este sentido, se tiene conocimiento que durante las primeras horas de infección por VSRH la proteína de matriz y la proteína NS1 pueden encontrarse en el núcleo, para poder modular la expresión de genes que le permitan al virus continuar con su ciclo de infección de manera eficaz. Si bien, ya existe un mecanismo por el cual se ha descrito que la proteína de matriz puede regular la transcripción celular nosotros decidimos explorar otro posible mecanismo por el cual dicha proteína pudiera estar regulando dicho proceso. Por ello, nuestro trabajo se centró en evaluar la distribución subcelular de la proteína de matriz en células A549 infectadas, así como en el análisis de la posible interacción de la proteína de matriz con la proteína fibrilar, proteína altamente relacionada con la transcripción celular. Se encontró que durante las primeras horas de infección por VSRH, la proteína de matriz presentaba una distribución perinuclear y citoplasmática y no nuclear como ya se había reportado. También se encontró, al realizar el análisis de la colocalización de la proteína de matriz y fibrilarina, que dicha colocalización no se daba, por tanto no está presente. Sin embargo, observamos que la distribución subcelular de la proteína fibrilarina era la misma en células falsamente infectas e infectadas. Finalmente, al realizar un análisis *in silico*, nuestros datos nos indican que la interacción de estas dos proteínas mencionadas posiblemente no es viable. A pesar de que todos nuestros datos no fueron los esperados, aún existen incógnitas que en un futuro nos pueden permitir explorar nuevos mecanismos virales.

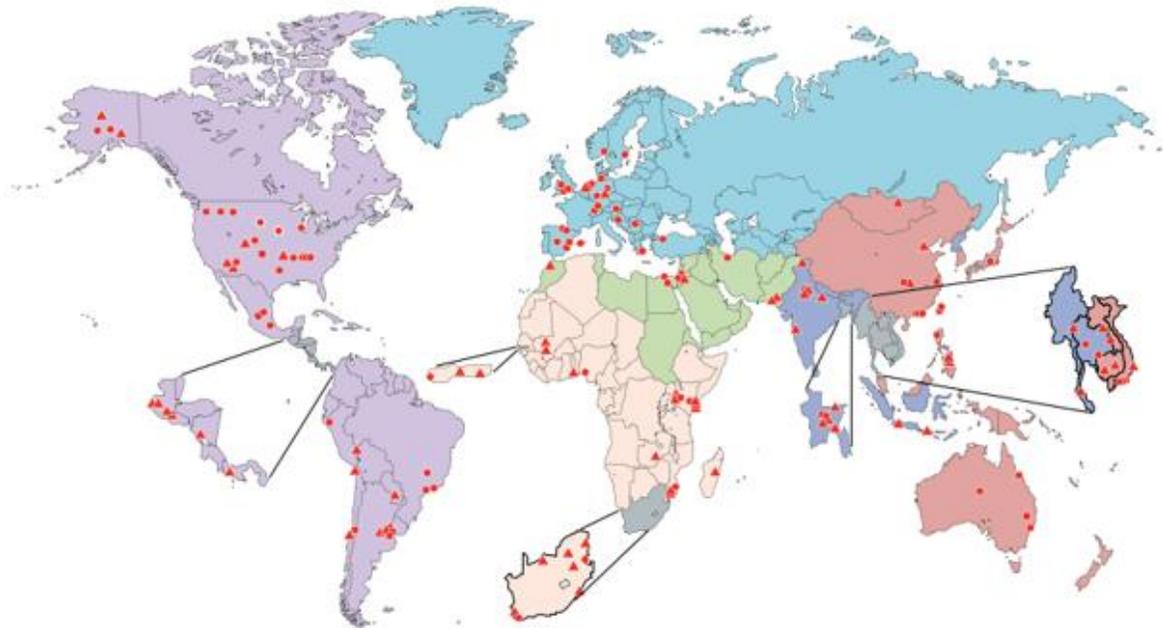
## ABSTRACT

The Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) is one of the main etiological agents causing respiratory infections in infants. However, reinfections can occur throughout life. Therefore, HRSV is often a public health problem that affects various age groups. That is why generating information about the mechanisms of viral infection becomes necessary in order to be able to offer pharmacological treatments that allow patients to have a moderate infection without clinical complications. One of the virus-host interaction mechanisms studied in recent years in HRSV is the translocation of viral proteins to the nucleus. In this sense, during the first hours of HRSV infection, the matrix protein and the NS1 protein can be found in the nucleus to modulate the expression of genes that allow the virus to continue its infection cycle in a more efficient way. Although there is already a mechanism by which the matrix protein can regulate cell transcription, we decided to explore another possible mechanism by which said protein could regulate the said process. Therefore, our work focused on evaluating the subcellular distribution of the matrix protein in infected A549 cells, as well as analysis of the possible interaction of the matrix protein with the fibrillary protein, a protein highly related to cell transcription. During the first hours of HRSV infection, the matrix protein presented a perinuclear and cytoplasmic distribution, not a nuclear one, as previously reported. When performing the analysis of the colocalization of the matrix protein and fibrillarin, the colocalization did not occur. Therefore it is not present. However, we observed that the subcellular distribution of fibrillarin protein was the same in mock-infected and infected cells. Finally, when performing an in-silico analysis, our data indicate that the interaction of these two mentioned proteins is possibly not viable. Although all our data were not as expected, there are still unknowns that may allow us to explore new viral mechanisms in the future.

## 1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con estudios epidemiológicos realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), las infecciones del tracto respiratorio superior (IRAS), dentro de las cuales podemos identificar enfermedades tales como laringitis, faringitis, rinitis y nasofaringitis; son un grupo de enfermedades que desaparecen aproximadamente en un lapso de 10 o 15 días (Jin et al., 2021)(Assane et al., 2018). No obstante, en algunas ocasiones se pueden generar complicaciones como la neumonía, otitis media, miocarditis y glomerulonefritis. Los agentes etiológicos que causan principalmente las IRAS incluyen a los virus y bacterias, pero se estima que aproximadamente el 80% de dichas enfermedades son de etiología viral, siendo los rinovirus, coronavirus, virus sincicial respiratorio humano (VSRH) y metapneumovirus humano (MPVH) los principales agentes relacionados a producir estas enfermedades (Assane et al., 2018; Fernandes-Matano et al., 2017, p.; Jin et al., 2021).

A nivel mundial se estima que el VSRH es responsable de la hospitalización de aproximadamente 33 millones de personas y de 76,600 muertes por año, siendo los menores de 5 años los más afectados (Tabor et al., 2020). Mientras que en México anualmente se presenten aproximadamente ochocientos mil casos de IRAS, siendo los virus más prevalentes VSRH y MPVh (Fernandes-Matano et al., 2017). Si bien, el grupo más afectado suelen ser los infantes, se ha reportado que en ancianos y adultos inmunocomprometidos el VSRH suelen estar relacionado con hospitalizaciones y muertes (Staadegaard et al., 2021). El VSRH a nivel mundial es un agente de preocupación por la baja inmunidad protectora que el cuerpo genera al exponerse al patógeno, ya que los anticuerpos neutralizantes generados durante la infección proporcionan una protección parcial. Además de existir una baja activación de células T al momento de una reinfección (Bont et al., 2002), por lo que es normal ver que niños y adultos tengan reinfecciones a lo largo de su vida (Fuentes et al., 2016).



**Fig.1 Distribución demográfica del VSRH a nivel mundial.** Países que han detectado al VSRH en neonatos que ingresaron a hospitales debido a infecciones respiratorias agudas. Los círculos rojos simbolizan los casos reportados y publicados, mientras que los triángulos rojos los casos reportados, pero no publicados. Modificado de (Shi et al., 2017)

### 1.1 Aspectos generales del VSRH

El VSRH es un virus de ARN monocatenario de polaridad negativa perteneciente a la familia *Pneumoviridae*. Estructuralmente el VSRH es un virus pleomórfico, la partícula viral puede existir en dos conformaciones: en una forma esférica o filamentosa. Las partículas virales esféricas tiene un tamaño aproximadamente 150 o 250 nm de diámetro, mientras que en el caso de la forma filamentosa presentan un tamaño de 10  $\mu\text{m}$  de largo.(Shi et al., 2017)

El VSRH, posee una cubierta lipídica que adquiere de la membrana plasmática de la célula huésped. Si bien, el VSRH solo posee un serotipo, existen dos grupos antígenicos: A y B, los cuales se diferencian por tener una variación en la secuencia

de aminoácidos. Habiendo una homología del 35% si se comparan ambas secuencias (L. Wang et al., 2022).

La nucleocápside del VSRH consta de 4 proteínas, las cuales son: nucleoproteína, la fosfoproteína, el factor de progresión M2-1 y la polimerasa viral, las cuales en conjunto forman el complejo de ribonucleoproteínas relacionadas con las síntesis de ARN. Adicionalmente la partícula viral posee una envoltura lipídica que obtiene de la membrana plasmática de la célula huésped. En dicha envoltura se encuentran 3 proteínas virales: la glicoproteína G, la proteína pequeña hidrofóbica (SH) y la proteína de fusión. Finalmente se ha descrito que entre la envoltura y el complejo ribonucleoprotéico, se encuentra la proteína de matriz (Cao et al., 2021).

El VSRH es un virus que principalmente posee un tropismo por células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio (Villenave et al., 2012; L.Zhang et al., 2002). Sin embargo, se ha reportado que puede infectar células de otros órganos y tejidos, como los del sistema nervioso central (SNC) y la placenta (Bokun et al., 2019; Kawashima et al., 2009; Velázquez-Cervantes et al., 2019). La transmisión del virus se da generalmente por contacto directo con saliva o con secreciones nasales, una vez que el VSRH entra en contacto con la nasofaringe y las vías respiratorias superiores del individuo, se lleva a cabo la primera replicación viral, posteriormente las nuevas partículas virales generadas son liberadas en los bronquiolos o alveolos de las vías respiratorias inferiores, en donde mayormente se llevara a cabo todo el ciclo de infección viral (Shang et al., 2021).

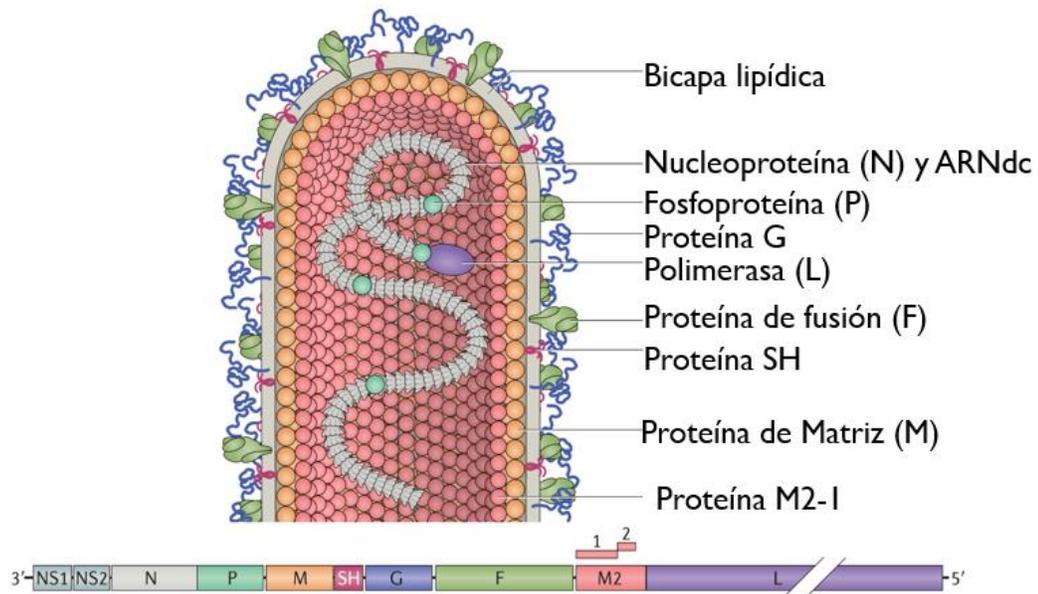
## **1.2 Características generales del genoma viral del VSRH**

El genoma del VSRH consta de un ARN monocatenario no segmentado de polaridad negativa de aproximadamente 15,200 nucleótidos, el cual contiene 10 genes que codifican 11 proteínas. El orden de la transcripción de los genes de VSRH son: NS1-NS2, N, P, M, SH, G, F, M2 (1-2) y L (Battles & McLellan, 2019). El comienzo y terminación de la transcripción de cada gen es mediado por las regiones de inicio (GS) y de termino (GE) que se encuentran flanqueando cada gen.

Existe evidencias que demuestran que durante la transcripción viral, para asegurar la protección de los ARNm virales frente a exonucleasas y receptores de reconocimiento de ARN monocatenario celulares, así como para asegurar el reconocimiento por parte de la maquinaria celular, ocurre modificaciones en los transcritos virales al adicionarse al ARNm viral en el extremo 5´ un Cap y en el extremo 3´ una cola de poliadeninas (Sutto-Ortiz et al., 2021).

El VSRH al ser un virus de ARN de polaridad negativa necesita generar un antígenoma (ARN de polaridad positiva) y así llevar a cabo la replicación del genoma viral. Tanto en el genoma viral como en el antígenoma se encuentran dos regiones importantes para que se lleve a cabo la replicación y transcripción del ARN viral: denominadas como la secuencia líder (Le) que consta de 44nt y las secuencia tráiler (Tr) que consta de 155 nt (Fearn et al., 2002; Gao et al., 2020).

Recientemente se ha reportado que, durante la replicación viral del VSRH se pueden generar genomas virales defectuosos (DVG), dichos genomas no son más que genomas largos que se pueden empaquetar en la partícula viral madura que son incapaces de completar un ciclo de replicación una vez que son liberados en el citoplasma de la célula huésped, debido a que no se pueden transcribir los genes para producir las proteínas virales necesarias para la replicación (Felt et al., 2021; Sun et al., 2019). La formación de los DVG ocurre cuando la polimerasa viral se separa del ARN viral por un momento y vuelve a reincorporarse para seguir con la elongación (Sun et al., 2019). Felt y colaboradores (2021) demostraron que la presencia de DVG de VSRH en tiempos tempranos de la infección se asociaba con una carga viral alta y una sintomatología mas grave, mientras que la detección de DVG en tiempos tardíos de la infección se asoció con una carga viral baja y una sintomatología baja.



**Fig.2 Representación esquemática de una partícula filamentososa del VSRH y su genoma.** En la sección A) se muestra una representación de una partícula viral de VSRH madura. En la capa mas exterior se encuentra una bicapa lipídica donde se localizan 3 proteínas embebidas: la proteína de unión (G), la proteína de fusión (F) y la proteína pequeña hidrofóbica (SH). Debajo de la bicapa lipídica encontramos a la proteína de matriz (M), que se asocia con la proteína M2-1. La proteína M2-1 a su vez interacciona directamente con la nucleoproteína (N), proteína encargada de recubrir al ARN viral. Finalmente, la polimerasa (L) y la fosfoproteína (P) se encuentran asociadas a la nucleoproteína (N). En la sección B) se esquematiza el genoma de VSRH. El genoma esta conformado por 10 genes que codifican 11 proteínas. El orden de transcripción es de 3'--NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2-1, M2-2 y L--5'. Modificado de (Battles & McLellan, 2019)

### 1.3 Características funcionales y estructurales de las proteínas

#### 1.3.1 Glicoproteína

La proteína de anclaje del VSRH (VSRH G) es una proteína de membrana altamente glicosilada conformada por 298 aminoácidos. Existen dos formas de la proteína G: la proteína completa que presenta un dominio intracelular, un dominio transmembrana y un dominio extracelular. Mientras que la otra forma se conoce como G trunca, ya que el dominio transmembrana al ser escindido proteolíticamente, genera una proteína con el dominio extracelular, la cual es secretada por las células infectadas (Anderson et al., 2021). En términos generales la proteína G tiene un peso de 32 kDa, sin embargo, al

ser glicosilada adquiere un mayor peso molecular. En ese sentido existen evidencia de que el tamaño de la proteína G madura y el número de glicosilaciones depende del linaje celular, por ejemplo: en la línea celular HEP-2 el tamaño suele ser de 95kDa, en la línea celular Vero suele ser de 55 kDa mientras que las células bronquiales humanas primarias suelen ser de 170kDa (King et al., 2021).

La función principal de la proteína G es la de interactuar con los receptores celulares presentes en la célula huésped, así como con los glucosaminoglicanos de la superficie celular, para así permitir la entrada viral. Sin embargo, se ha reportado que la proteína G secretada cumple la función de poder servir como mecanismos de evasión del sistema inmune (Efstathiou et al., 2020). Esto último debido a que tiene la capacidad de inhibir la producción de interferón, al interactuar con el receptor TICAM-1, el cual esta relacionado con la activación de los receptores TLR3/4 (Toll- Like Receptor). Estos últimos son los encargados de modular la producción de interferón al detectar virus de ARN, como el VSRH(Shingai et al., 2008).

### **1.3.2 Proteína de Fusión**

La proteína de fusión del VSRH (VSRH F) está constituida por 541 aminoácidos y posee un peso de 63 kDa. Su principal función es, facilitar la fusión de la membrana de la partícula viral con la membrana de la célula huésped, para que el genoma viral (ARN) sea liberado en el citoplasma celular y comience la replicación y transcripción de dicho genoma (Gilman, Furmanova-Hollenstein, et al., 2019). Inicialmente la proteína de fusión se genera a partir de una proteína precursora (F0), la cual es escindida proteolíticamente por la proteasa furina, generando dos subunidades (F1 y F2). Una vez formadas dichas subunidades pueden formar dímeros o trímeros, los cuales finalmente se organizan en la superficie de la membrana celular(Sibert et al., 2021).

La proteína de fusión además de participar en la entrada de la partícula viral, es la proteína responsable de que se lleve a cabo la fusión de células infectadas cercanas,

dando como resultado la formación de células multinucleadas (sincitios), que es algo característico de la infección de VSRH(Tian et al., 2013).

### 1.3.3 Fosfoproteína

La fosfoproteína del VSRH (VSRH-P) es una proteína que esta conformada por 241 aminoácidos y tiene un peso molecular de 27kDa. La principal función de la proteína VSRH-P es la de asociarse con la polimerasa viral y con el factor controlador de la transcripción M2-1 para poder llevar a cabo la transcripción y replicación del ARN viral(Blondot et al., 2012; Gilman, Liu, et al., 2019). Pero para que este proceso ocurra la proteína VSRH-P debe de ser fosforilada en los residuos 116,117,119, 232 y 237 para que puedan interaccionar con la nucleoproteína y formar los cuerpos de inclusión (IBs), que son los sitios en donde ocurren la génesis del nuevo ARN viral y la síntesis de los ARNm virales(Beavis et al., 2021; Galloux et al., 2020; Lu et al., 2002). Otra de las funciones de la proteína VSRH-P es la de fungir como una chaperona que se une a la nucleoproteína viral para evitar la asociación de la nucleoproteína con ARN celular y también permitir que la polimerasa viral reconozca al ARN viral(Galloux et al., 2015). Si bien su principal función es la servir como un modulador de la replicación y transcripción viral, Bajorek y colaboradores (AÑO) reportaron que la tetramerización de la proteína VSRH-P es necesaria para que se puede llevar a cabo la gemación de la partícula viral(Bajorek et al., 2021).

### 1.3.4 Nucleoproteína

La nucleoproteína N del VSRH (VSRH N) tiene un peso de 43.4 kDa y está constituida por 391 aminoácidos. Esta proteína conforma la cápside viral debido a que tiene dominios de interacción con el ARN viral. Además la nucleoproteína puede oligomerizar, generando una estructura helicoidal que le da mayor estabilidad y protección al ARN viral contra nucleasas de la célula huésped y contra el sistema de reconocimiento inmunológico innato (Gilman, Liu, et al., 2019). Se ha descrito que tanto el antigenoma como el genoma viral recién sintetizados son recubiertos por la nucleoproteína, formando estructuras conocidas como complejos ribonucleicos, los

cuales posteriormente servirán como cadenas molde para la transcripción y replicación viral.

### **1.3.5 Polimerasa viral**

La polimerasa del VSRH (VSRH L) es una polimerasa dependiente de ARN responsable de llevar a cabo la replicación y transcripción del ARN viral, está constituida por 2165 aminoácidos y tiene un peso de 280 kDa. Otra de las funciones de la polimerasa L de VSRH es la de adicionar y metilar el Cap del ARNm viral recién sintetizado (Balakrishnan et al., 2020). La polimerasa L de VSRH puede llevar a cabo las funciones mencionadas debido a que posee 3 dominios enzimáticos conservados: un dominio de ARN polimerasa dependiente de ARN, un dominio de polirribonucleotidil transferasa y un dominio de metiltransferasa.

### **13.6 Proteína M (M2-1/M2-2)**

El gen M2 del VSRH posee dos marcos de lectura abiertos, por lo que se codifican dos proteínas: M2-1 y M2-2. Ambas proteínas están constituidas por 90 aminoácidos y poseen un peso similar (10kDa). La proteína M2-1 de VSRH tiene la capacidad de formar un complejo con la polimerasa viral y con la proteína P de VSRH para regular y promover el inicio de la transcripción de los genes de VSRH. Mientras que la proteína M2-2 participa en la regulación de la replicación y transcripción viral.(Bouillier et al., 2019).

### **1.3.7 Proteína SH**

La proteína pequeña hidrofóbica del VSRH (VSRH SH) es una proteína transmembrana compuesta por 64 aminoácidos y tiene un peso de 7 kDa que se encuentra en la superficie de las partículas virales. La proteína SH de VSRH forma un poro en la membrana de la célula huésped para permitir una mayor liberación de partículas virales, por lo que se le considera una viroporina (Triantafyllou et al., 2013). Además, se sabe que VSRH SH participa en la inhibición de la apoptosis celular al regular la vía de señalización de TNF- $\alpha$  (Ivancic-Jelecki et al., 2018).

### 1.3.8 Proteína de Matriz

La proteína de matriz del VSRH (VSRH M) es una proteína periférica de membrana conformada por 256 aminoácidos y con un peso de 28 kDa. Su función es la de recubrir el interior de la partícula viral, sirviendo como una unión entre la envoltura lipídica y la nucleocápside. Además participa en los eventos de ensamblaje y gemación de la partícula viral, al final del ciclo de infección, debido a que tiene la capacidad de interactuar con las demás proteínas virales y formar pre-partículas virales, las cuales se trasladan a la membrana plasmática de la célula huésped para su ensamblaje final y gemación (Ward et al., 2017). Existe evidencia de que la proteína de matriz puede regular la replicación y transcripción viral al asociarse con el complejo ribonucleoprotéico viral (Ghildyal et al., 2002). Además, se ha visto que durante la infección tardía del VSRH, la proteína de matriz puede interactuar con elementos celulares como por ejemplo, la proteína de unión a actina cofilina 1 (Cof1). Cuando se da la interacción entre la proteína Cof1 y matriz se promueve al aumento de los filamentos de actina. Este incremento se genera con la finalidad de que haya un tráfico de proteínas sintetizadas del VSRH, hacia las balsas lipídicas. El aumento de actina, también es necesario para que se lleve a cabo de manera óptima el transporte del genoma viral sintetizado a los sitios de ensamblaje viral (Feng et al., 2022). Por otro lado, también se cree que durante la infección por VSRH se puede inhibir la transcripción de la célula huésped, esto debido a que durante las primeras horas de infección con VSRH, se ha observado que la proteína VSRH-M se puede localizar en el núcleo (Sibert et al., 2021).

### 1.3.9 Proteínas no estructurales 1 y 2

Las proteínas NS1 y NS2 del VSRH están compuestas por 121 aminoácidos y 124 respectivamente, mientras que su peso molecular es de 15.5 kDa y 14.5 kDa respectivamente. NS1 y NS2 se expresan de manera temprana para inhibir la respuesta inmunológica. NS1 en la célula huésped se transloca al núcleo, mientras que NS2 se transloca a la mitocondria en su forma homodimérica o heterodimérica

(NS1-NS2) (Thornhill & Verhoeven, 2020). La expresión de NS1 dentro del núcleo se asocia a la cromatina celular para regular la transcripción de genes del huésped, como pueden ser los encargados de modular una respuesta antiviral (Pei et al., 2021). En el caso de NS2, su translocación a la mitocondria tiene como finalidad que pueda interactuar con la proteína antiviral mitocondrial MAVS e inhibir un mecanismo de la respuesta antiviral celular (Boyapalle et al., 2012).

## **1.4 Ciclo de replicación del VSRH**

### **1.4.1 Interacción virus-célula e internalización de partícula viral**

El primer paso para que se dé inicio el ciclo de infección del VSRH es la interacción de la partícula viral madura con los elementos de la superficie celular (Fig.1). Este primer paso, conocido como unión con el receptor celular, está mediado por las proteínas F y G, (Hallak et al., 2007; Meng et al., 2015). Para una internalización eficiente de las partículas virales del VSRH la proteína G interactúa con elementos de la superficie celular como los glicosaminoglicanos (GAG). Algunos ejemplos de GAGs que usan el VSRH son el sulfato de heparán, el sulfato de condroitina y el ácido hialurónico. Sin embargo, su ausencia no limita la entrada viral ya que la proteína G puede interactuar con otros elementos de la superficie celular, como el receptor de fractalkina (Hallak et al., 2007; Johnson et al., 2015). Después de que la partícula del VSRH interactúa con los GAG, la proteína F interactúa con los receptores celulares presentes en la membrana celular, como pueden ser: nucleolina, el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF1R) (Currier et al., 2016; Griffiths et al., 2020, 2020; Johnson et al., 2015; Tayyari et al., 2011). Sin embargo, nucleolina ha sido identificado como uno de los receptores primarios para VSRH (Ginisty et al., 1999).

La interacción de la proteína F con nucleolina es través del dominio RBD presentes en la secuencia de nucleolina, se ha demostrado que la inhibición de la interacción de los dominios RBD de nucleolina con la proteína F de VSRH bloquea el proceso de fusión (Griffiths et al., 2020). Sin embargo, para un correcto reconocimiento y fusión de las

membranas, la interacción de la proteína F y G debe coexistir. La fusión de las membranas permite que el genoma viral sea liberado en el citoplasma. Una vez que se encuentra el genoma viral en el citoplasma, ocurre una primera ronda de transcripción, esto con la finalidad de sintetizar a las proteínas N, P y M y formar los cuerpos de inclusión. Ya formados los cuerpos de inclusión, se inicia con la replicación y transcripción viral. Por su parte la transcripción da origen a proteínas de novo y la replicación al nuevo genoma viral, el cual es empaquetado en una estructura conocida como complejo ribonucleico (RNP). La proteína principal que se han descrito como reguladoras de la transcripción es la proteína M2-1, la cual se asocia al genoma viral para servir como un factor de antiterminación transcripcional y así generar ARNm eficientes y completos. (Russell et al., 2001; Tawar et al., 2009; Zimmer et al., 2001).

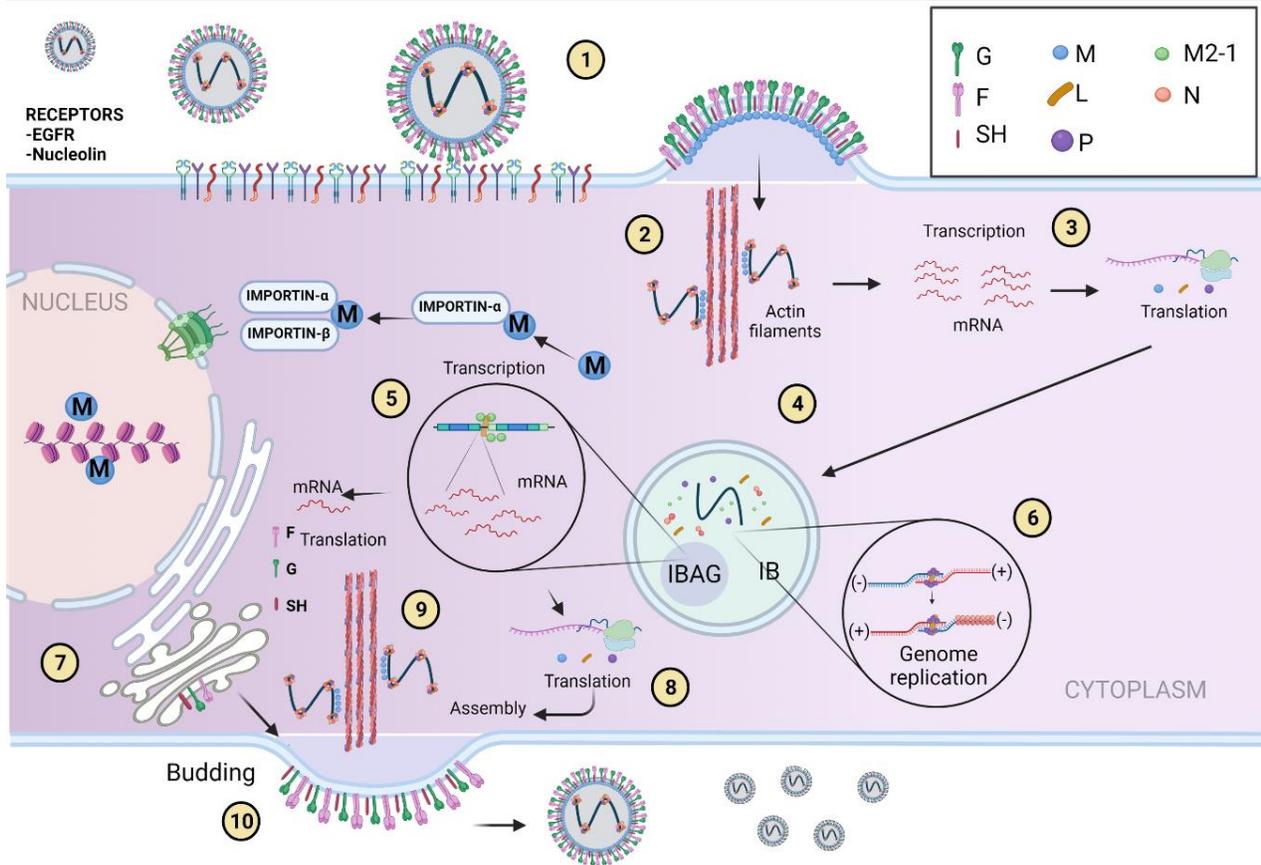
#### **1.4.2 Transcripción y replicación viral**

Los procesos de replicación y transcripción del VSRH se producen en los IBs. Cuando el ARN viral se libera en el citoplasma, comienza el proceso de transcripción viral. Este proceso está controlado por la polimerasa viral L, la fosfoproteína y la proteína M2-1[96]. Este proceso se inicia porque L reconoce una secuencia única en el extremo 3' del ARN genómico (región líder); esta región contiene la secuencia promotora para el inicio de la transcripción y replicación viral (Fearn's et al., 2002; Marriott et al., 2001). El inicio y el final de la transcripción de cada uno de los genes VSRH están regulados por secuencias conocidas como inicio de genes (GS) y fin de gen (GE). Se ha identificado que los proceso de transcripción del genoma viral pueden ocurrir durante las primeras 8 horas de la infección.(Barik, 1992; Kuo et al., 1996). Algunos estudios han identificado que se requieren ciertas concentraciones de ATP y CTP requieren de para iniciar la síntesis del antígenoma VSRH que luego se utiliza como plantilla para la síntesis del genoma viral (Cressey et al., 2018; Grosfeld et al., 1995; Noton & Fearn's, 2011). Las glicoproteínas del VSRH, después de ser sintetizadas, se dirigen al complejo de Golgi para ser glicosiladas y finalmente transportadas por la vía secretora a la superficie apical de las células. Por otro lado, proteínas como N, P y L se asocian con el ARN naciente para formar el complejo conocido como ribonucleoproteína

(RNP), que interactúa con la proteína de la matriz para ser transferida a la superficie apical donde interactúa con las glicoproteínas. y proteínas no estructurales (Shahriari et al., 2018).

### **1.4.3 Ensamblaje y liberación de partícula viral**

Después de la replicación viral y la transcripción, los RNPs y las proteínas virales restantes deben reunirse en algunas áreas de la membrana celular para que pueda ocurrir el ensamblaje (Husby & Stahelin, 2021). Particularmente, el sitio en donde se lleva a cabo el ensamblaje del virión, así como el sitio para la liberación de partículas virales son dominios ricos en colesterol conocidos como balsas lipídicas (Chang et al., 2012). Para un correcto ensamblaje y liberación de la partícula viral es necesario la participación del citoesqueleto celular. Esto debido a que el citoesqueleto sirve como estructura para que sean transportados los complejos RNPs a los sitios de ensamblaje final en la membrana plasmática. Además, diversos estudios han determinado que una correcta localización subcelular de los RNPs depende de la proteína de matriz. La dimerización de la proteína de matriz es necesaria para la interacción con el RNP y así se facilite el transporte del complejo a las membranas plasmáticas de la célula huésped (Förster et al., 2015; Shahriari et al., 2018). Finalmente, cuando se ensamblan las glicoproteínas y el complejo RNP, el virión se libera al entorno extracelular. Esta liberación se produce porque las concentraciones de glicoproteínas y complejos RNPs generan una curvatura en la membrana celular que hace que se cierre parte de la membrana y la libere en el medio extracelular. Es importante señalar que la gemación del VSRH no se ve afectada por la inhibición del complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte de proteínas (ESCRT), por lo tanto, este proceso podría utilizar un proceso novedoso para la escisión de membrana (Husby & Stahelin, 2021).



**Fig.3 Representación esquemática del ciclo de replicación del VSRH.** El ciclo de infección del VSRH inicia cuando la partícula viral entra en contacto con células epiteliales del sistema respiratorio. El primer paso (1) es el reconocimiento de los elementos de la superficie y receptores celulares por parte del virus. Una vez que se da dicho reconocimiento hay una fusión de membranas y liberación del genoma viral en el citoplasma (2). Ya liberado el genoma comienza una primera ronda de transcripción (3) para poder formar los IBs (4). En los IBs se llevan a cabo los procesos de replicación y transcripción viral (5 y 6). A continuación, las proteínas SH, G y F son procesadas en el complejo de Golgi (7). Una vez concluidos los eventos de replicación y transcripción (8 y 9) tanto el genoma viral como las proteínas virales son translocadas a la superficie celular (10) para que se ensamblen y den origen a una partícula viral madura, la cual finalmente será liberada al espacio extracelular.

### 1.5 Papel de núcleo durante las infecciones virales

Los virus son considerados parásitos intracelulares, que a lo largo de los años han generado mecanismos y estrategias para regular procesos como el ciclo celular, apoptosis, autofagia, procesos inmunológicos y metabolismo, así como generar un cambio de la distribución de ciertos organelos celulares como son mitocondrias, retículo endoplásmico y complejo de Golgi para que puedan replicarse de manera adecuada en las células que infectan (Kvansakul, 2017; Stern-Ginossar et al., 2019). Evidencias han demostrado que algunos virus tienen mecanismos para interactuar con elementos proteicos del nucléolo, ya que dicha interacción tiene un impacto en la transcripción de la célula huésped, así como en el reclutamiento de la maquinaria ribosomal para la traducción de las proteínas virales (Rawlinson et al, 2015; Rawlinson et al., 2018)

En general se ha descrito que la mayoría de los virus de ADN replican su genoma en el núcleo de la célula huésped. por lo que deben transportar su genoma y maquinaria desde el citoplasma hacia el núcleo a través de los complejos de poros nucleares (NCP). Sin embargo, se ha visto que ciertos virus de ARN pueden secuestrar y ocupar al núcleo para completar su ciclo de infección como es el caso del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), en donde proteínas citoplasmáticas del huésped son reclutadas al interior del nucléolo, esto con la finalidad de que ocurra la formación y ensamblaje de los complejos ribonucleoprotéicos virales. Además, se ha demostrado que el VIH utiliza al nucleólo como sitio de protección para sus ARNm, ya que al mantenerlos en dicho organelo no son detectados por la maquinaria antiviral celular. Mientras que en el caso del virus de la influenza A y el virus de la hepatitis D se ha documentado que la transcripción y replicación del ARN viral se da en el nucleolo (Tate et al., 2008).

El nucléolo es un organelo que se encuentra dentro del núcleo celular, en donde se llevan a cabo la transcripción, procesamiento y modificación de los ARN ribosomales.

La función general del nucleólo es la de regular la biogénesis de los ribosomas. Sin embargo, existen reportes de que el nucleólo participa en la regulación del ciclo celular, la detección de estrés genotóxico, térmico, oxidativo e infecciones virales. Estructuralmente el nucleólo se divide en tres secciones: centro fibrilar (CF), el componente fibrilar denso (CFD) y el componente granular (CG)(Lafontaine et al., 2021).

El proteoma del nucleólo está compuesto por aproximadamente 541 proteínas, de las cuales 157 se han descrito tiene una distribución que rodea al nucleólo y las restantes suelen ser proteínas que se encuentran en el núcleo o citoplasma dependiendo el estado celular(Fearns et al., 2002) Sin embargo, la proteína fibrilarina (FBL) ha recibido una mayor importancia.

La proteína FBL es una metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina conservada tanto en Archaea y Eukarya. FBL es responsable de catalizar la metilación de los ARN ribosomales. La estructura básica de FBL consta de cuatro dominios principales: una región espaciadora, un dominio de unión al ARN, un dominio de metiltransferasa y una región alfa. En células eucariotas FBL generalmente se encuentra asociada a proteínas como Nop56 y Nop58, así como con algunos ARN nucleolares pequeños (snoRNA). En conjunto, estas proteínas y pequeños ARN forman lo que se conoce como complejos de ribonucleoproteína(Pereira-Santana et al., 2020). FBL al ser una proteína que se encuentra específicamente en los nucleolos y cuerpos de cajal de las células, ha permitido que se ocupe como marcador de nucleolos. FBL además de participar en la biogénesis de los ARN ribosomales participa como, regulador transcripcional, sensor de estrés celular y ribonucleasa(Pereira-Santana et al., 2020).

## 2. ANTECEDENTES

Un componente clave que comparten la gran mayoría de virus de ARN de polaridad negativa como lo son los *paramixovirus* y *pneumovirus*, es la proteína de matriz. Se han caracterizado algunas funciones de esta proteína como la de estar involucrada en

los eventos de ensamble y salida del virus, sin embargo, se ha descrito que tiene un papel importante en la transcripción viral. Diversos estudios han evidenciado que en la mayoría de los virus de ARN de polaridad negativa, la estructura de la proteína de matriz es diferente; sin embargo, a nivel funcional se ha descrito que juega un papel similar durante la infección que se conserva en este grupo de virus (Lijeroos & butcher, 2013).

El sitio de replicación de los virus de ARN negativo suele ser el citoplasma, pero en años recientes se ha visto que algunos virus de ARN dirigen sus proteínas virales al núcleo para poder modular la transcripción de la célula huésped. Así es el caso de los *paramixovirus* y *pneumovirus* en donde se ha reportado que la localización nuclear de algunas proteínas virales es necesaria para que se lleve a cabo el ciclo de infección de los virus (Duan et al., 2019).

Ghildyal y colaboradores en 2003 demostraron que durante la infección por VSRH la proteína de matriz se transloca al núcleo de la célula huésped e inhibe la transcripción celular durante las primeras horas de infección (Ghildyal et al., 2003). Posteriormente, Ghildyal et al. en 2005 demostraron que la translocación de la proteína de matriz al núcleo de la célula huésped ocurría debido a la asociación y participación de las importinas alfa y beta con la proteína de matriz (Ghildyal et al., 2003, 2005). Y si bien, ya se había reportado que la proteína de matriz de VSRH tiene la capacidad de translocarse al núcleo e inhibir la transcripción de la célula huésped, aun no se ha demostrado el papel que pueda tener en el nucleolo.

El nucléolo es un compartimiento subnuclear que regula la biogénesis de los ribosomas, pero también se ha visto implicado en el procesamiento de ARNt, ARNm, ensamblaje de complejos de ribonucleoproteínas y regulación del ciclo celular. Por lo que no es raro pensar que durante las infecciones virales dichas estructuras son modificadas para favorecer la infección viral. Un ejemplo es el Virus Newcastle (VNC) en donde Duan y colaboradores en 2014 encontraron que, durante la infección por este patógeno, la proteína nucleolar nucleofosmina o B23 interacciona con la proteína

de matriz. Adicionalmente se reportó que la eliminación de la proteína B23 mediante siRNAs generaba una inhibición de la replicación viral. Sin embargo aún sigue en estudio el mecanismo que pueden mediar B23 junto con la proteína de matriz del VNC(Duan et al., 2014, 2019).

Otro ejemplo es durante la infección por el Virus Hendra (HV), Rawlinson y colaboradores en 2018 encontraron que durante la infección por este virus, hay una acumulación de la proteína de matriz en el compartimiento nucleolar. Y una vez que la proteína de matriz está en el nucleolo puede interactuar con la proteína treacle. Adicionalmente encontraron que la proteína de matriz tiene la capacidad de interactuar con la proteína fibrilarina, la cual también es exclusiva de nucleolo. Aunque no se sabe el papel que juega durante la infección esta interacción, se cree que posiblemente también puede tener un papel en la regulación de replicación viral y la inhibición de ciertos transcritos de la célula huésped (Rawlinson et al., 2018).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos años se ha identificado que las infecciones virales reclutan a proteínas nucleares para ciertos eventos en el ciclo de infección. Específicamente se ha demostrado que el nucleolo de la célula al ser una región nuclear involucrada en la maduración de mensajeros celulares y regulación transcripcional del huésped puede ser blanco para que proteínas virales puedan ser relocalizadas y modular estas funciones en la célula. A este respecto, en virus de ARN de polaridad negativa como VN y HN se ha encontrado que la proteína de matriz de estos patógenos tiene una interacción con proteínas residentes del nucleolo como fibrilarina, nucleolina y nucleofosimian. Esto con la finalidad de regular la transcripción de genes celulares que les permitan concluir sus ciclos de infección. El VSRH es uno de los principales causantes de infecciones respiratorias tanto en menores de edad como en adultos mayores y personas inmunosuprimidas. Hasta la fecha no hay una vacuna que evite la infección. Por lo que con el entendimiento del mecanismo de interacción virus-huésped podría generar blancos terapéuticos para contrarrestar la infección.

#### **4. HIPÓTESIS**

La proteína de matriz del VSRH al tener una localización nuclear durante la infección interacciona con proteínas nucleolares como la fibrilarina.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo general**

Evaluar si la proteína de matriz del VSRH tiene una distribución nucleolar y si existe una interacción con la proteína fibrilina en células A549.

##### **5.2 Objetivos específicos**

1. Identificación de la presencia de la proteína fibrilina en la línea celular A549
2. Analizar la posible interacción entre la proteína de matriz de VSRH y la proteína fibrilina mediante ensayos in silico.
3. Generar un suero policlonal contra la proteína de matriz del VSR empleando un antígeno recombinante
4. Determinar la localización nucleolar de la proteína de matriz del VSRH en células A549.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### Cultivo de células

Se hará uso de la línea celular de epitelio pulmonar humano (A549) (ATCC CCL-185) las cuales se cultivarán en medio Ham's F-12K (Gibco/ Thermo Fisher Scientific # 21127022) suplementado con suero fetal bovino (Biowest # S140B-500) y antibiótico-antimicótico (Gibco/ Thermo Fisher Scientific # 15240062). Las células A549 se mantendrán en una atmosfera de 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Para la obtención del stock viral se hará uso de la línea celular de epitelio humano (HEp-2) (ATCC CCL-23). Las cuales se cultivarán en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco/ Thermo Fisher Scientific # 11880036) suplementado con suero fetal bovino (Biowest #S140B-500) y antibiótico-antimicótico (Gibco/ Thermo Fisher Scientific # 15240062) y se mantendrán en las mismas condiciones atmosféricas que las A549.

### Producción de células competentes de *Escherichia coli* con un método de química.

Se dejó un cultivo de *Escherichia coli* cepa BL21 durante toda la noche a 37°C en agitación y posteriormente se hizo un subcultivo para que la población bacteriana estuviera en fase logarítmica de crecimiento. Al subcultivo cada 45 minutos se le midió la densidad óptica a 660 nm y cuando alcanzó la densidad de 0.4 se centrifugo durante 30 minutos a 3500 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1mL de TSS (cloruro de magnesio, polietilenglicol, dimetilsulfóxido, medio LB (Lennox) SIGMA # L2897 y agua desionizada) y 1mL de medio LB al botón y se hicieron alícuotas de 250 µL que se almacenaron a -70°C.

### **Inducción de la expresión de la proteína de matriz de VSRH y obtención de cuerpos de inclusión**

Las células *E. coli* BL21 competentes fueron transformadas con el plásmido donado por la Dra. Monika Bajorek del Instituto Nacional Frances de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (INRAE) Explica en que consiste este plasmido. La alícuota de *E. coli* BL21 con el plásmido se incubó durante 40 min a 4°C y luego se sometió a un choque térmico, a 42°C por 45 segundos y posteriormente 4°C por 1 min. Finalmente, se agregó 250 µL de medio LB a la alícuota y se incubó durante 1 hora en agitación a 37°C. Finalizado el tiempo de incubación a 37°C se agregó el volumen total del tubo a placas de agar LB con estreptomina (120 µg/mL). Estas placas se dejaron en incubación durante toda la noche a 37°C. Al siguiente día se seleccionó una colonia y se cultivó en 20 mL de medio LB con estreptomina (120 µg/mL) y se dejó incubando durante toda la noche a 37°C. Luego de esto se tomó 1 mL del cultivo y se agregó a un matraz con 300 mL de medio LB con estreptomina (120 µg/mL) y se dejó incubando a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.4, en ese momento al cultivo se le adicionaron 3 mL de IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido Thermo Fisher Scientific #R0392). Se dejó el cultivo a 25°C en agitación durante 4 h. Finalizado el tiempo de incubación, se centrifugó todo el cultivo durante 30 min a 3500 rpm a 4°C para poder obtener el botón bacteriano. A continuación, el botón celular, fue resuspendido en una solución con sacarosa y Tris a pH 8.8. Posteriormente, el botón celular resuspendido se sometió a una serie de ciclo de sonicación e incubación en hielo. Una vez realizado lo anterior, se procedió a centrifugar la muestra durante una hora a 3500 rpm a 4°C para obtener nuevamente el botón bacteriano. A continuación, el botón celular se resuspendió en una solución con Tritón, Tris SIGMA #77-86-1 a pH 8.8 y EDTA MERK #E5134. Ya resuspendido el botón celular, se procedió a pasar la muestra nuevamente por un ciclo de sonicación e incubación en hielo. Finalmente, se centrifugó el pellet celular a 3500 rpm a 4°C. Posteriormente, se recuperó el botón, se retiró el sobrenadante y el botón bacteriano se resuspendió en el buffer TE (Tris y EDTA 8.8) y en buffer Laemmli 6x.

### **Purificación de la proteína de matriz de VSRH por geles preparativos.**

La purificación de la proteína de matriz de VSRH se realizó mediante geles preparativos, al 15% de Acrilamida-Bisacrilamida. Las muestras se desnaturalizaron durante 10 minutos a 96°C y posteriormente se centrifugaron durante 10 minutos a 13,000 rpm a temperatura ambiente. Luego se cargaron las muestras en ambos geles y se dejaron correr a 150 mV durante 24 horas a 4°C. Pasado el tiempo de electroforesis, ambos geles se separaron y tomando en cuenta el marcador de peso molecular y el peso de la proteína de matriz, se realizaron cortes en los geles, en las regiones que correspondían a 25kDa. Se obtuvieron diversas fracciones y cada una de estas fracciones se maceraron y se agregaron en tubos falcon de 15mL en donde se eluyeron en amortiguador PBS 1x y se dejaron durante 24h a 4°C. Pasadas las 24h se centrifugaron los tubos durante 30 minutos a 3500 rpm y se recuperó solamente el sobrenadante., el cual se almaceno en tubos eppendorf de 1.5 mL a -20°C. Finalmente, cada fracción se evaluó mediante Azul de Coomasie y Western Blot

### **Evaluación de la expresión de la proteína de matriz de VSRH por tinción con Azul de Coomasie**

Se tomaron 25uL de los sobrenadantes de cada fracción de los geles preparativos y se desnaturalizaron durante 10 minutos a 96°C. Estas muestras se corrieron durante 90 minutos en geles de poliacrilamida al 15% a 95 mV. Al finalizar el corrimiento electroforético colocaron los geles en recipientes que contenía la solución de Azul de Coomasie (Azul de Coomasie, metanol, ácido acético y agua desionizada) y se dejaron en agitación durante 20 minutos. Pasados los 20 minutos se realizaron una serie de lavados con solución desteñidora (ácido acético, metanol y agua desionizada), con la finalidad de eliminar el exceso de colorante. El gel se dejó en solución desteñidora toda la noche a 4°C para eliminar el exceso del colorante completamente y así evaluar la presencia de proteínas.

### **Identificación de la proteína de matriz de VSRH por Western Blot**

Se tomaron 25 uL de los sobrenadantes de cada fracción de los geles preparativos y se desnaturalizaron durante 10 min a 96°C. Estas muestras se corrieron durante 90 min en geles de poliacrilamida al 15% a 95 mV. Al finalizar el corrimiento electroforético se transfirieron los geles a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia duró 120 min a 100 mV. Terminada la transferencia con un Buffer TRIS- Glicina, la membrana fue incubada en una solución 5% leche baja en grasa- TBS Tween al 0.1%. y se dejaron en agitación durante una hora a temperatura ambiente. Luego, se incubó la membrana con el anticuerpo primario  $\alpha$ -His Genetex #GT350 a una dilución 1:500 durante una hora en agitación a temperatura ambiente. Esto debido a que la proteína recombinante de matriz de VSRH tiene presente una cola de poli-histidina. Terminada la incubación, se realizaron tres lavados con duración de 10 minutos cada uno con TBS-1x Tween 0.1%. Posterior a los lavados, se colocó el anticuerpo secundario hecho en ratón que reconoce inmunoglobulinas totales de conejo coplado a peroxidasa de rabano (mouse  $\alpha$ -Rabbit Thermo Fisher #31460) a una dilución 1:3000 con las mismas condiciones de incubación que el anticuerpo primario. Terminada la incubación, se realizaron los mismos lavados. Finalmente, para hacer el revelado, se hizo uso de un Kit de quimioluminiscencia ThermoFisher #34577 y, las bandas fueron evidenciadas mediante una placa radiográfica.

### **Protocolo de inmunización de Ratas Wistar con la proteína recombinante de matriz de VSRH**

Se seleccionaron y se cuantificaron las fracciones en las que se identificó a la proteína recombinante de matriz del VSRH tanto con Azul de Comassie como por Western Blot. Para realizar la cuantificación de proteínas se ocupó el Kit de proteínas DC de Bio-Rad con número de catálogo #500-0116, el cual es un método colorimétrico que sigue los mismos principios que el ensayo de Lowry.<sup>50</sup> Posteriormente, se solicitaron 3 ratas Wistar al Bioterio del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinoza Reyes y se dividieron de la siguiente manera:

**Tabla 1. Condiciones de ratas inmunizadas con la proteína de matriz de VSRH**

Grupo	Tratamiento	Cantidad
Control	PBS 1X más adyuvante Complete de Freund's con número de catálogo	150 $\mu$ L PBS más 150 $\mu$ L de adyuvante Complete de Freund's
Inmunizadas con la proteína recombinante de matriz de VSRH	Antígeno purificado más adyuvante Complete de Freund's con numero de catálogo F5881 SIGMA	150 $\mu$ L adyuvante complete de Freund's más 100 $\mu$ g/mL de proteína recombinante de matriz de VSRH + PBS 1X

La inmunización de las ratas fue cada 15 días durante el periodo de 2 meses. En la primera inmunización se ocupó el adyuvante Complete de Freund's, mientras que en las inmunizaciones posteriores se hizo uso del adyuvante incompleto de Freund's con numero de catálogo F5506 SIGMA.

#### **Detección de anticuerpos policlonales contra la proteína de matriz del VSRH**

Para evaluar si las ratas inmunizadas con la proteína recombinante de matriz estaban generando anticuerpos específicos, se procedió a tomar cada 15 días muestras de sangre de las tres ratas. Posteriormente, las muestras de sangre se incubaron durante 30 min a 37°C y después 30 minutos a 4°C para finalmente centrifugar las muestras a 8000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. Solo se recuperó el sobrenadante (Suero) y se almacenó a -20°C para su posterior análisis. Cuando se hizo la última colecta de sangre (a los 2 meses), se sacrificó a las ratas Wistar siguiendo las normativas de bioética establecidas por el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinoza Reyes. Esto con la finalidad de obtener la mayor cantidad de suero.

Para el ensayo de ELISA, fueron sensibilizadas placas de 96 pozos con 10 microgramos de la proteína de matriz. En cada pozo se colocaron 50  $\mu$ L de dicha

solución y se dejó incubando toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0.1%. Se realizó el bloqueo con 100 µL de leche baja en grasa disuelta en PBS-Tween 0.1% por 1h a temperatura ambiente. Después se realizaron cuatro lavados con PBS-Tween 0.1% y se añadieron diferentes diluciones (1:50, 1:100, 1:200, 1:400) del suero obtenido de las ratas wistar y se dejaron incubando durante 2h. Pasadas las 2h se realizaron cuatro lavados con PBS-Tween 0.1% y se añadió el anticuerpo secundario (1:3000) Anti-rat IgG conjugado con HRP Sigma-Aldrich con número de catálogo A9037 y se incubó durante 1h. Posteriormente se realizaron cuatro lavados con PBS-Tween 0.1% y se añadieron 50 µL de solución de revelado (8mg diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) + amortiguador de citratos 10X + 50 µL de peróxido de hidrógeno + 5.4 mL de agua miliQ) y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad. Finalmente se detuvo la reacción adicionando 50 µL de ácido sulfúrico 2N y se hizo la lectura de la placa de 96 pozos en un Lector de ELISAS de la marca BioTek a 450 nm.

### **Obtención del Stock Viral de VSRH**

Se cultivaron siete millones de células Hep-2 en cajas de cultivo T75, las cuales se dejarán incubando a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h. Posteriormente se infectaron durante 2h con el VSRH A2 (ATCC VR-26) dando pequeñas agitaciones a las cajas cada 15 minutos. Una vez cumplidas las 2h se retiró el inóculo de infección y, se dejarán incubando las células a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> con medio DMEM, SFB 2% y antibiótico antimicótico (AA). Una vez observado el efecto citopático (formación de sincitios) se procedió a cosechar (raspar) cada caja con la ayuda de cell scrapers (Thermo Fisher # 179707PK). La cosecha de cada caja se tiene que colocar en un tubo falcón de 15mL, las células deben tener un ciclo de sonicación e incubación en hielo, los cuales duraron 5 segundos cada uno de ellos. Finalizado el ciclo de sonicación-hielo las células tienen que colocarse en centricones de 15mL (Merck #UFC910024) y se centrifugaron a 3500 rpm a 4°C durante 30 min. Finalmente, se recuperó la parte del sobrenadante y se harán alícuotas para su almacenamiento a -70°C.

### Titulación viral.

Para determinar el titulo viral se realizó un ensayo de placas líticas virales en un medio semisólido de metil celulosa-SFB-DMEM. Para esto 24h antes se cultivaron 120 mil células Hep-2 en placas de 24 pozos para tener un monocapa celular. Completadas las 24h se procedió a eliminar el medio a las células y se realizaron diluciones seriadas de 1:10 de las alícuotas del virus obtenidas de las cajas T75. Para que finalmente se agregaran 50uL de cada dilución en diferentes pozos. Dicha placa se dejó incubando 2h a 37°C. Una vez pasada las 2hrs se quitaron las diluciones virales y se les agrego a cada pozo una mezcla de metilcelulosa-DMEM-SFB 2%. Posteriormente se dejó la placa incubando aproximadamente 6 días a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Pasados los 4-6 días se retiró la mezcla de metilcelulosa-DMEM-SFB 2% y fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4%. Finalmente, se retiraron el PFA y se tiñeron las células con cristal violeta al 0.4%. Para obtener el número de PFUs se hará uso de la siguiente ecuación:

$$PFU/mL = \frac{(\# \text{ de placas})(\text{factor de dilucion})}{(\text{Volumen de inculo})}$$

### Evaluación de la especificidad del suero policlonal contra la proteína M por ensayo de Inmunofluorescencia en células infectadas por VSRH

Se cultivaron 120 mil células A549 en placas de 24 pozos con cubreobjetos y se incubaron durante 24h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se infectaron a una multiplicidad de 5 MOI durante 2h con VSRH, dando pequeñas agitaciones a las cajas cada 15 minutos. Una vez cumplidas las 2h se retiraron los inóculos de infección y, se dejaron incubando las células a 37°C con 5% con medio F12K, SFB 2% y A.A.

Una vez cumplidas las 24 horas post-infección, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4%. Posteriormente se permeabilizaron las células con una

solución de PBS-tritón 0.2%-sacarosa. Después se bloquearon con una solución PBS-tritón 0.2%-SFB 3%. Posteriormente se incubaron las células con el anticuerpo primario nucleoproteína (1:100) y con el suero obtenido de las ratas Wistar (1:100). En el caso del anticuerpo de nucleoproteína se dejó incubando durante 1h, mientras que el suero de ratas Wistar se dejó durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos secundarios apropiados se ocuparon a una dilución 1:200 y, se dejaron incubando durante una hora. Para teñir los núcleos de las células se hizo uso de DAPI. Finalmente se observaron las células por microscopía confocal Leica, TCS SP5.

### **Evaluación de distribución celular de fibrilarina en la línea celular A549 por Inmunofluorescencia**

Se cultivaron 120 mil células A549 en placas de 24 pozos con cubreobjetos y se incubaron durante 24h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Y se siguió el protocolo descrito en la sección anterior. El único cambio fue permeabilizar las células con una solución de PBS-tritón 0.1%-sacarosa. Después se bloquearon con una solución PBS-tritón 0.1%-SFB 3% y se utilizó el anticuerpo específico de nucléolo Anti-Fibrillarín (Abcam #4566. Pasada la hora de incubación a temperatura ambiente del anticuerpo primario se hicieron lavados con una solución PBS-tritón 0.1% y se ocupó un anticuerpo secundario hecho en ratón que reconoce inmunoglobulinas totales de conejo acoplado al fluoróforo Cy3 a una dilución 1:3000. El cual se dejó incubando durante 1h. Posteriormente se hicieron lavados con PBS-tritón 0.1% y se tiñeron los núcleos de las células con DAPI. Finalmente se observaron las células por microscopía confocal Leica, TCS SP5.

### **Modelado y análisis de la interacción de la proteína matriz de VSRH y la proteína fibrilarina mediante docking molecular**

Para este análisis, primeramente, se hizo la búsqueda de las secuencias de la proteína de Matriz del VSRH (ID: 1494472) y del Virus Hendra (ID: 1446472) en la base de datos NCBI. Posteriormente se realizaron alineamientos entre secuencias utilizando al servidor Aling de UniProt ([www.uniprot.org/aling](http://www.uniprot.org/aling)) para analizar el porcentaje de

homología que presentaban las secuencias. Una vez obtenido el porcentaje de homología, el siguiente paso fue buscar en el servidor Protein Data Bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) los números de acceso de la proteína fibrilarina (2IPX), matriz del VSRH (4V23) y matriz del virus hendra (6BK6). Esto con la finalidad de saber si existía ya un reporte de su forma cristalizada o no. Posteriormente se hizo un análisis de cada uno de los PDB para eliminar elementos que se añadieron para su análisis por difracción de rayos X.

A continuación, dichos PDB se cargaron al servidor en línea GalaxyWEB (<https://galaxy.seoklab.org/>) para el refinamiento estructural de cada una de las proteínas. Esto con el fin de obtener un modelo tridimensional lo más real. Finalmente, al obtener los modelos refinados, se utilizó el servidor en línea Clus Pro (<https://cluspro.bu.edu/>) para realizar el docking molecular. Finalizado el trabajo en el servidor ClusPro, se eligió el modelo que necesitaba de menor energía para su formación-interacción. Con la finalidad de tener una idea general de cuáles son los posibles sitios de interacción de las proteínas de interés, se utilizó al servidor CABS-FLEX (<http://biocomp.chem.uw.edu.pl/CABSflex2>) para el análisis de las regiones más flexibles que presentaban las proteínas de matriz del VSRH y el virus Hendra.

### **Evaluación de la presencia de la co-localización de la proteína de matriz de VSRH y la proteína fibrilarina en la línea celular A549 por Inmunofluorescencia**

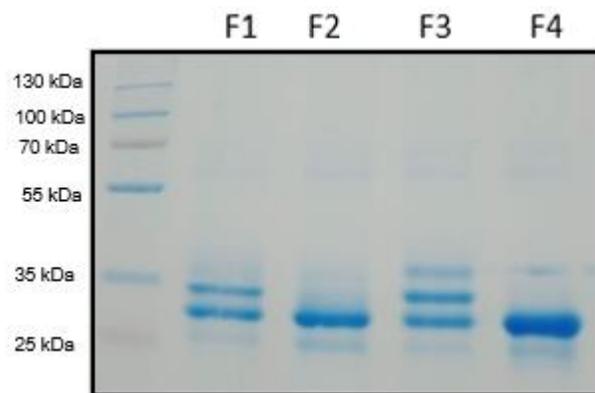
Para este ensayo se sembraron 120 mil células A549 en placas de 24 pozos. Y se siguió el mismo protocolo descrito en secciones anteriores. Sin embargo, realizaron ciertos cambios al protocolo, los cuales se describen a continuación. Para permeabilizar a las células se utilizó una solución de PBS-tritón 1%-sacarosa. Después se bloquearon con una solución PBS-tritón 0.1%-SFB 3% y se utilizó el anticuerpo específico de nucléolo Anti-Fibrillarín (Abcam #4566). Pasada la hora de incubación a temperatura ambiente del anticuerpo primario se hicieron lavados con una solución PBS-tritón 0.1%. Una vez que se puso el anticuerpo contra Fibrillarina se utilizó el suero policlonal contra la proteína matriz del VSRH a una dilución 1:100., el cual se dejó

durante toda la noche a 4°C. Finalmente los anticuerpos secundarios apropiados se dejaron incubando durante una hora. Finalizada la hora de incubación de anticuerpos secundarios se hicieron lavados con PBS-tritón 0.1%. Para teñir los núcleos de las células se usó de DAPI y finalmente se observaron las células por microscopía confocal.

## 7. RESULTADOS

### Inducción y evaluación de la expresión de la proteína de matriz del VSRH

Para la expresión de la proteína de matriz del VSRH, se siguió el protocolo que estandarizo la Dra. Monika Bajorek (Bajorek et al., 2014). La proteína recombinante M del VSRH se purifico a partir de geles preparativos. En los geles preparativos se hicieron cortes en la región del peso esperado de la proteína para poder eliminar proteínas contaminantes por arriba y abajo del peso molecular de la proteína de interés. Posteriormente, se les realizo un SDS-PAGE a las muestras obtenidas de los geles preparativos para analizar la presencia de la proteína recombinante. En la figura 3, nosotros observamos que en las 4 fracciones analizadas pudimos identificar una banda que correspondía al peso reportado de la proteína de matriz (28kDa). Interesantemente, en las fracciones 1 y 3 se observa la presencia de otras proteínas contaminantes. Sin embargo, se decidió utilizar las fracciones 2 y 4 para los siguientes ensayos ya que estas son las que presentaron una mejor purificación por nuestro sistema.



**Figura 4. Evaluación de la purificación de la proteína de matriz del VSRH por azul de coomassie.**

SDS-PAGE de las diferentes fracciones obtenidas de los geles preparativos. Se observa la expresión de la proteína de matriz. Al analizar el gel de poliacrilamida al 15% tiñendo con azul de Coomassie observamos una banda intensa en las fracciones 2 y 4, las cuales se encuentran en un peso aproximado de 28-30 kDa, lo cual correspondería a la proteína de matriz.

El plásmido donado por la Dra. Monika Bajorek para expresar la proteína de matriz del VSRH en bacterias, posee una etiqueta de 6X-His para poder identificar a la proteína recombinante. Para confirmar la presencia de la proteína recombinante de interés en las fracciones 1,2,3 y 4, se realizó un Western Blot. Se observa que solo las fracciones 3 y 4 son las únicas que contienen la proteína recombinante de interés. Además, la proteína que se detectó en ambas fracciones corresponde al peso esperado de la proteína de interés. Por lo que esas fracciones se separaron para su cuantificación y utilización en los ensayos de inmunización de ratas Wistar y ensayos ELISA.

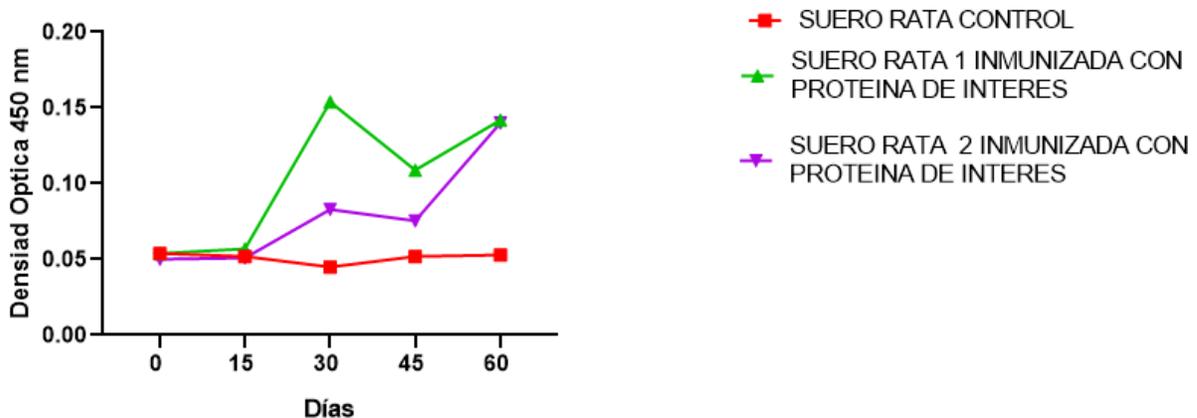


**Figura 5. Evaluación de la purificación de la proteína de matriz del VSRH por Western Blot.** Western Blot de las fracciones 1,2,3 y 4 obtenida de los geles preparativa para evaluar la presencia de la proteína de matriz. Se uso un anticuerpo que detectara la etiqueta 6X-His. Observando que las fracciones 3 y 4 son las únicas que presentan a la proteína de matriz.

### **Evaluación de la presencia de anticuerpos contra la proteína de matriz en sueros de ratas inmunizadas**

Para determinar si los sueros de las ratas inmunizadas con la proteína recombinante desarrollaron anticuerpos específicos contra la proteína de, se realizaron ensayos de ELISA. Como se muestra en la figura 4, los sueros de la rata inmunizada con PBS (rata control) no desarrollaron anticuerpos que reconocieran al antígeno de interés en ninguno de los días analizados. Al comparar los sueros de las ratas número 1 y 2, obtenidos a los 15 días. Observamos que ambos sueros aun no presentan anticuerpos. No es hasta el día 30, en donde se nota que los anticuerpos presentes en suero de la rata número uno detecta una mayor cantidad de proteína de matriz. Lo cual nos sugiere que hay una buena respuesta humoral contra el antígeno de interés. Interesantemente, una fluctuación de la respuesta de anticuerpos contra la

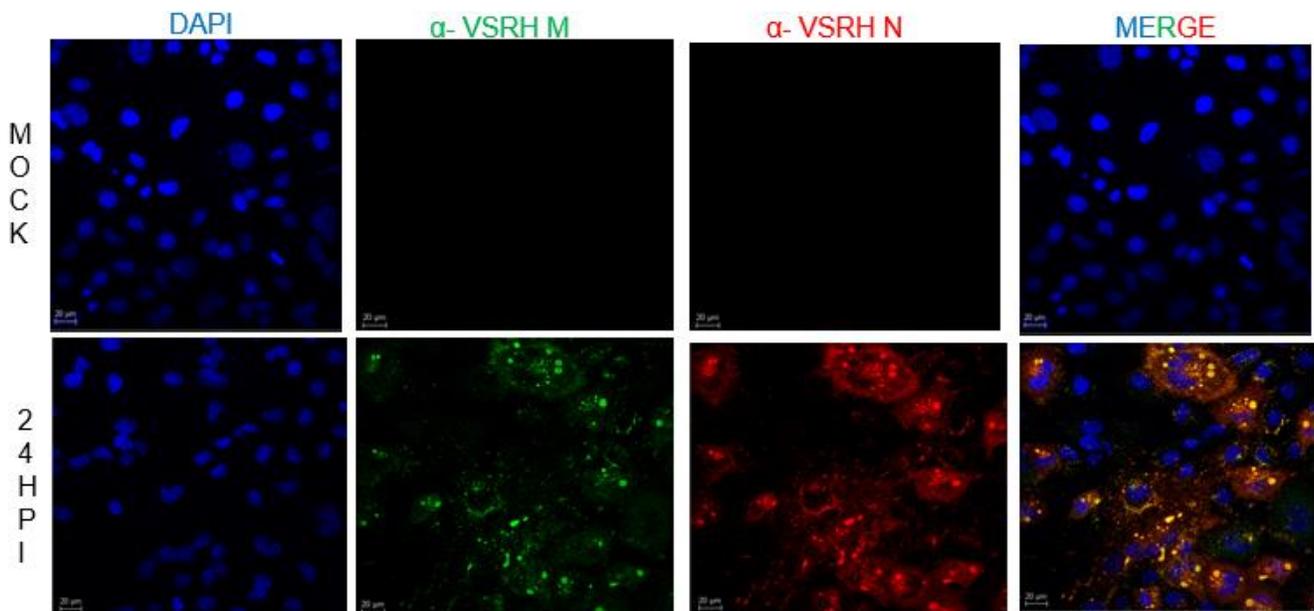
proteína de matriz fue observada en los días posteriores del esquema de inmunización, hasta que finalmente se identificó en el día 60 que ambos animales inmunizados con el antígeno tuvieron una respuesta similar, por lo cual se decidió sacrificar en este punto a los animales y recuperar la mayor cantidad de anticuerpos contra nuestro antígeno. En tanto, al suero de la rata número 1. Si bien, detecto una mayor cantidad de antígeno, no se compara con la cantidad que detecto en el día número 30. Por lo tanto, al día siguiente se decidió realizar la toma de suero total, con la finalidad de recuperar la mayor cantidad de anticuerpos contra la proteína de matriz.



**Figura 6. Evaluación de la presencia de anticuerpos IgGs contra la proteína recombinante de matriz del VSRH en sueros de ratas Wistar.** Anticuerpos IgGs presentes en los sueros de las ratas wistar inmunizadas y evaluados por un ensayo de ELISA. En el eje de las X encontramos el número de días que se tardó en obtener el suero y en el eje de las Y la densidad óptica de dicho suero. La densidad óptica es directamente proporcional a la presencia de anticuerpos IgGs contra el antígeno de interés. Los puntos rojos representan al grupo inmunizado con PBS, mientras que los gráficos verdes y morados muestran a las ratas inmunizadas con la proteína de matriz del VSRH. Se observa que la rata 1 (gráfica verde) desarrollo anticuerpos contra la proteína matriz desde el día 30. Mientras que la rata 2 (gráfica morada) desarrollo una buena cantidad de anticuerpos contra la proteína de matriz hasta los 60 días.

### **Detección de la proteína de matriz en células infectadas con el VSRH haciendo uso de un suero policlonal.**

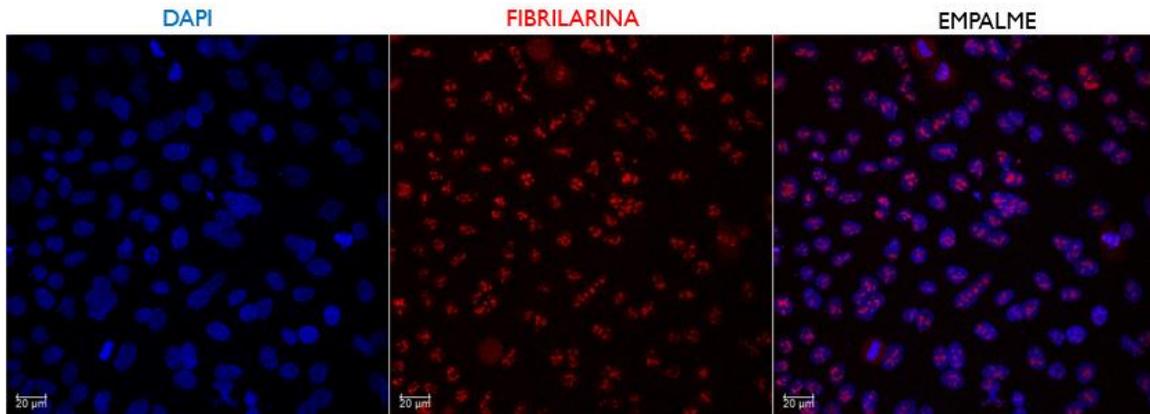
Se ha demostrado que a tiempos tempranos de infección con VSRH, la proteína de matriz tiene una distribución celular en el núcleo y citoplasma de las células. Mientras que, a tiempos tardíos, la proteína de matriz se localiza principalmente en la membrana plasmática. Para saber si los sueros de las ratas inmunizadas con la proteína recombinante de matriz del VSRH reconocían la proteína nativa se hicieron ensayos de inmunofluorescencia. En la figura 5 se observan células falsamente infectadas (MOCK) que al incubarse con el anticuerpo policlonal no muestran señal, sugiriendo que el anticuerpo fue específico para el antígeno viral. En las células infectas con VSRH e incubadas con el suero policlonal, se observa una distribución mayormente citoplasmática. Adicionalmente como control positivo de infección se utilizó el anticuerpo comercial contra la nucleoproteína del VSRH, en donde se observa que también la nucleoproteína tiene una distribución citoplasmática. Al realizar el empalme (MERGE) se observa que tanto la proteína de matriz como nucleoproteína tiene una distribución similar, que concuerda con lo ya reportado en la literatura. Ya que en tiempos tardíos de infección es necesaria la interacción entre estas dos proteínas. Para así poder transportar todo el complejo RNP a la membrana plasmática y completar el ultimo paso del ciclo de infección. Esto último nos indicaría que nuestro suero policlonal puede ser utilizado como herramienta para determinar su distribución subcelular en tiempos tempranos de la infección.



**Figura 7. Evaluación de los sueros de ratas Wistar inmunizadas con la proteína recombinante de matriz del VSRH.** Inmunofluorescencias de células A549 infectas con VSRH. Se muestra el análisis por microscopia confocal para la detección de la proteína de matriz (verde) y la nucleoproteína (rojo) 24 h.p.i a 5 MOI. Cada panel corresponde a una imagen representativa del ensayo a un aumento de 63x.

### **Evaluación de la expresión de Fibrilarina en la línea celular A549 por ensayos de Inmunofluorescencia**

Para determinar si la proteína fibrilarina se expresa en la línea celular A549 se realizó un ensayo de inmunofluorescencia para evaluar su expresión en dicha línea celular. En la figura 6 se puede apreciar que la proteína fibrilarina (rojo) se encuentra distribuida de manera heterogénea. Observando que todas las células poseen fibrilia. Sin embargo, se encuentra en regiones bien localizadas dentro del núcleo. Estas regiones corresponderían al nucléolo.

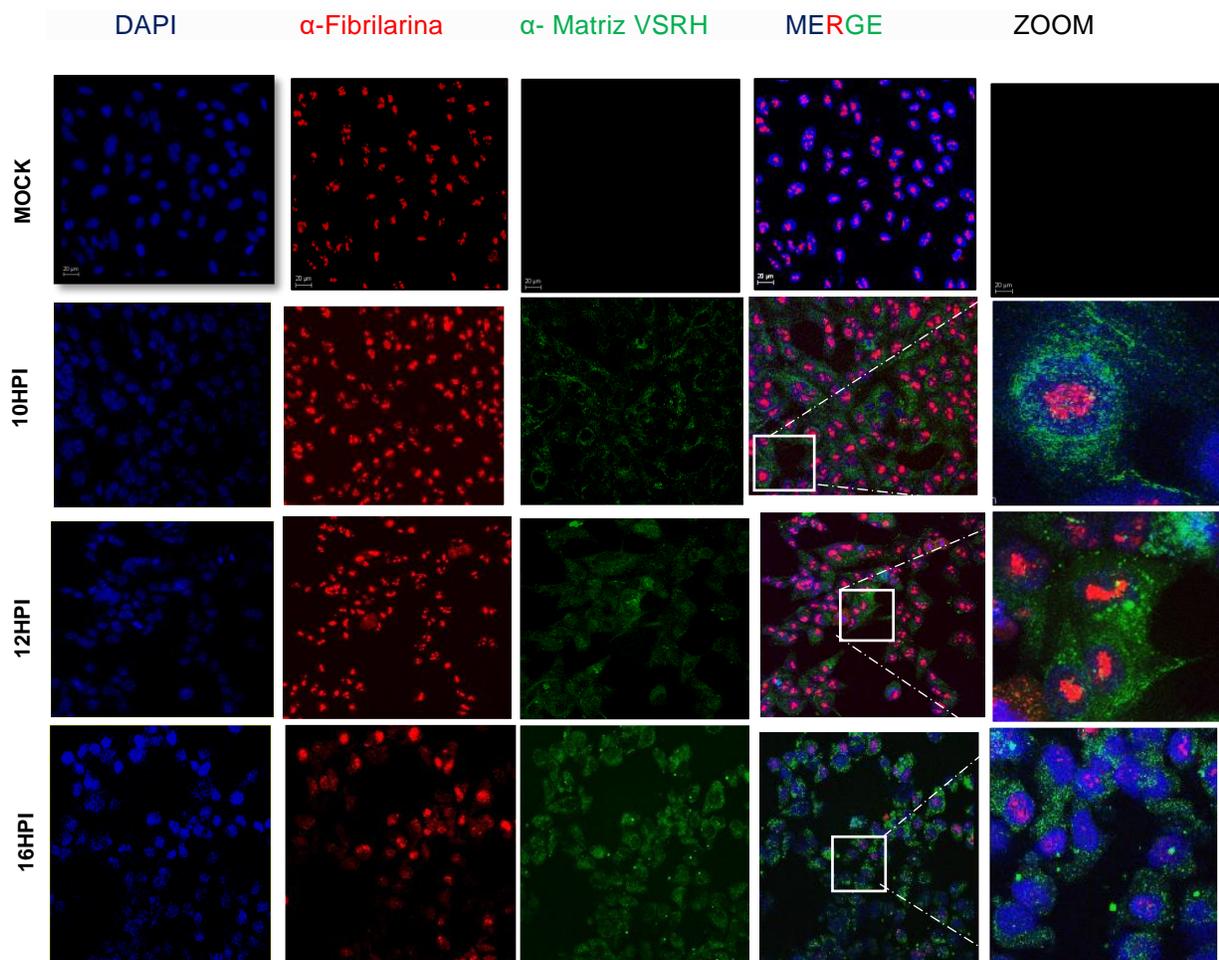


**Figura 8. Evaluación de la presencia de la proteína Fibrilarina en la línea celular A549.** Inmunofluorescencia de células A549 para la detección de la proteína fibrilarina (rojo). Se realizó un análisis por microscopia confocal, en donde cada uno de los paneles corresponde a una imagen representativa del ensayo a un aumento de 63x.

### **Cinética de infección en células A549 para evaluar la co-localización de la proteína de matriz del VSRH con la proteína celular fibrilarina**

Durante la infección por algunos virus de la familia pneumoviridae y paramaxoviridae se ha reportado que la proteína de matriz se puede encontrar en el núcleo e interactuar con algunas proteínas de este organelo. Sin embargo, aun no existen datos que demuestren que durante la infección por VSRH la proteína de matriz pueda interactuar con algún elemento residente de dicho organelo. En la figura 7 se muestran los resultados de ensayos de inmunofluorescencia para detectar la posible co-localización de la proteína de matriz del VSRH y la proteína celular fibrilarina en condiciones de infección. Se observan que las células falsamente infectadas (MOCK) únicamente expresa la proteína fibrilarina. Mientras que, en las células infectadas, además de observar la expresión de la proteína fibrilarina, se detectó la expresión de la proteína de matriz del VSRH. Si bien, no se observa la distribución ya reportado por Ghildyal y colaboradores (Ghildyal et al., 2009, p. 1). Encontramos que la proteína de matriz de VSRH se encontraba distribuida como pequeños puntos dentro del núcleo y más en la zona perinuclear como lo habían reportado por Wang y colaboradores (Y. E. Wang et al., 2010).

A pesar de existir una detección óptima de la proteína fibrilarina, al realizar un análisis de co-localización, se concluyó que el fenómeno de co-localización entre la proteína de matriz del VSRH y fibrilarina era nulo.



**Figura 9. Cinética de infección en células A549 para evaluar la co-localización de la proteína de matriz del VSRH y la proteína celular fibrilarina.** Se muestra el análisis realizado por microscopia confocal para la detección de la proteína de matriz (verde) y la nucleoproteína (rojo) a 10, 14 y 16 h.p.i. a 5 MOI. Las imágenes corresponden a imágenes representativas de un ensayo, a un aumento de 63x

### **Análisis in silico de la interacción de la proteína de matriz del VSRH y proteína de matriz del virus hendra con la proteína fibrilarina.**

El docking molecular es un método computacional ampliamente ocupado en varias investigaciones para ayudar a determinar los posibles fenómenos de interacción que pudiese haber entre dos moléculas, ya sea proteína-proteína, proteína-farmaco, proteína-peptido, etc. El docking molecular toma como base diferentes técnicas experimentales. como lo pueden ser la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear (RMN). Esto ultimo sirve para que se creen métodos algorítmicos y automatizados que puedan ayudar a predecir el comportamiento molecular, tomando como base datos verificados de manera experimental. En el presente trabajo uno de los objetivos es evaluar la posible interacción de la proteína de matriz del VSRH con la proteína nucleolar fibrilarina, por lo que un ensayo adicional fue determinar de manera in silico si dicha interacción podría suceder.

En la figura 8 observamos el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína de matriz del VSRH y el virus Hendra. Esto se hizo con la finalidad de saber que tan homologas son estas proteínas. Además, ya hay datos experimentales que reportan que la proteína de matriz de virus Hendra puede interaccionar con la proteína fibrilarina, así que al momento de realizar el docking, esta última sirvió como control positivo.

En la figura 9 se observa que una de las primeras diferencias entre estas dos proteínas es el número de residuos de aminoácidos, siendo la proteína de matriz de VSRH la que posee menos residuos de aminoácidos. Mientras que la proteína de matriz del virus Hendra posee 352 residuos de aminoácidos. Si comparamos las secuencias de aminoácidos de la proteína de matriz de estos dos virus, encontramos ciertas similitudes como lo son las regiones que dan origen a estructuras alfa hélices (marcadas en amarillo). Mientras que la sección remarcada en rosa se encuentran las regiones que dan origen a estructuras beta plegadas.



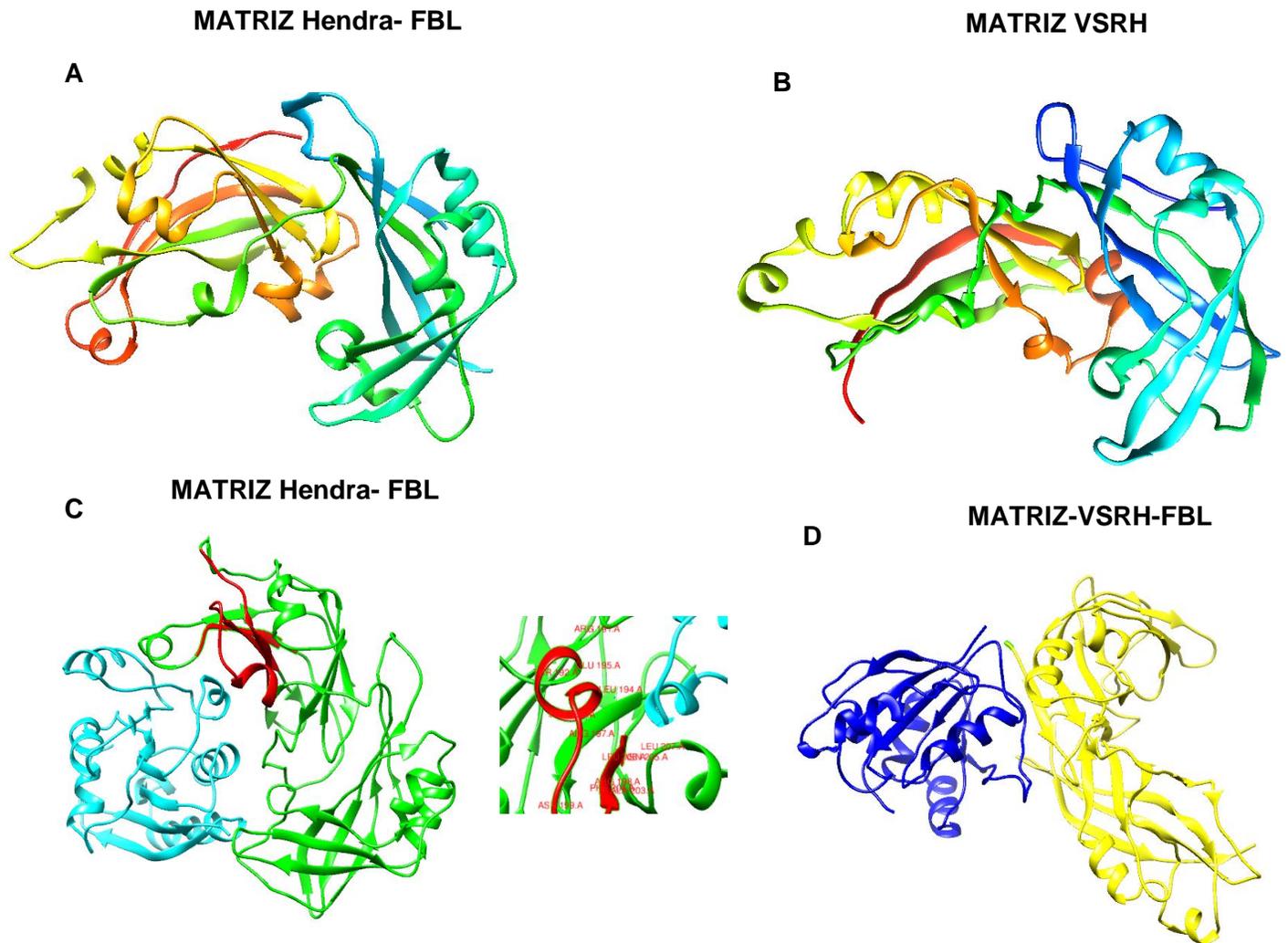
muestran las regiones necesarias para la importación/exportación del virus Hendra y Nipah, mientras que para el VSRH se encuentran en el recuadro verde.

### **Evaluación in silico de la interacción de la proteína de matriz del VSRH y el virus Hendra con la proteína celular Fibrilarina.**

Después del alineamiento se realizó una búsqueda en el servido de Protein Data Bank con la finalidad de saber si las proteínas de interés ya se encontraban cristalizadas mediante la técnica de difracción de rayos X. Ya que, en caso de no tener una estructura conocida, se haría uso del servido en línea I-TASSER, el cual se encarga de generar un modelo tridimensional de cómo se comportan los aminoácidos presentes en nuestra secuencia a partir de datos de otras proteínas. Sin embargo, al hacer la búsqueda en Protein Data Bank se encontraron todas las proteínas de interés, por lo que el siguiente paso fue seleccionar solo aquellas que tuvieran preferentemente una resolución menor a 3 ángstroms. Esto con la finalidad de tener el mejor modelado, ya que se sabe que entre menor es el número de resolución, es mayor la probabilidad de obtener un modelo real.

En la figura 10 los dos primeros paneles (A y B), muestran un modelo tridimensional de la proteína de matriz del VSRH y el virus Hendra. Y como se observa, el comportamiento de las estructuras terciarias (alfa hélices y laminas beta plegada) de cada proteína es diferentes. Por otro lado, en la figura 10 panel C se muestra el modelo de interacción de la proteína de matriz del VSRH con la proteína fibrilarina. Mientras que en el panel D se muestra el modelo de interacción de la proteína de matriz del virus hendra y la proteína fibrilarina. Observándose que el comportamiento de las alfa hélices y laminas beta plegadas de la proteína fibrilarina es diferente al interaccionar con la proteína de matriz correspondiente. Esto sugiere que la interacción entre fibrilina y la proteína de matriz del VSRH durante la infección no se llegue a dar. Además, al analizar los posibles residuos de de interacción son ARG161, LEU207, ASP199, ASP157, GLU185 y ARG192. Mientras que en el caso del VSRH con la proteína FBL no se pudieron determinar posibles sitios de contacto

debido a que no hubo un cambio de la proteína de matriz sola, si se compara con su ligando (FBL).

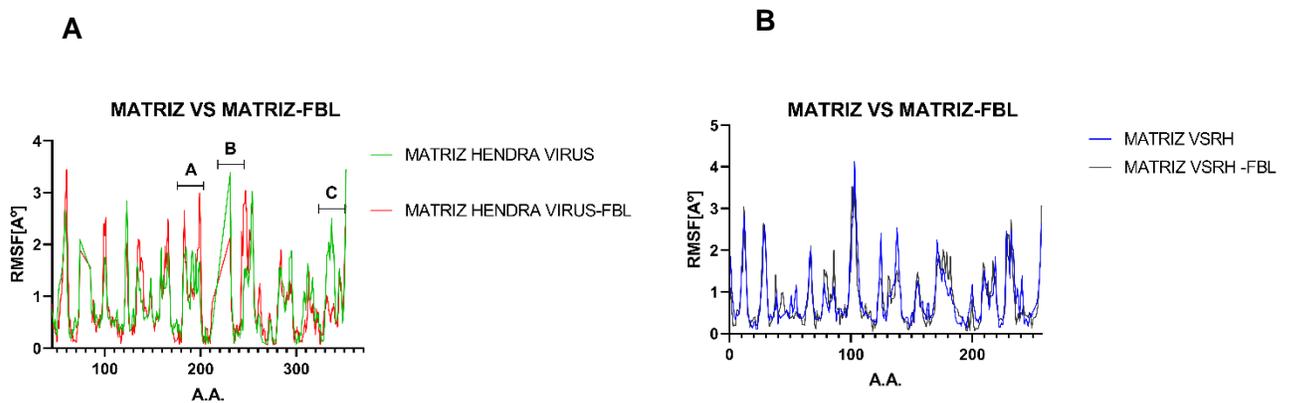


**Figura 11. Modelado in silico de las proteínas de matriz del VSRH, virus Hendra y la proteína celular fibrilarina.** En la sección A se observa en los dos paneles superiores la representación de la proteína matriz de VSRH y virus Hendra respectivamente. Mientras que en los paneles inferiores (C y D) se encuentra la representación tridimensional del alineamiento y comportamiento estructural de las proteínas Matriz de VSRH y virus Hendra con la proteína fibrilarina. La región ampliada del panel C representa los sitios candidato que son necesarios para que se lleve a cabo la interacción de la proteína de matriz del VSRH y la proteína fibrilarina,

## **Evaluación in silico de los posibles sitios de contacto de la proteína de matriz del virus Hendra con la proteína fibrilarina**

Las proteínas están compuestas por residuos de aminoácidos, los cuales interactúan entre ellos y dan origen a estructuras secundarias, las cuales a su vez al interactuar permiten que se formen estructuras terciarias, estas generalmente suelen ser las formas “activas y funcionales”. Pero además dentro de la secuencia de las proteínas, existen zonas conocidas como regiones flexibles, las cuales pueden interactuar con otras proteínas y/o moléculas, generando una dinámica molecular.

Generalmente para conocer dichas regiones flexibles se hace uso de la resonancia magnética nuclear (RMN), ya que dicha técnica ayuda a conocer cómo se comporta los átomos de cada uno de los residuos de aminoácidos en determinado tiempo, sin embargo, dicha técnica suele ser muy costosa, por lo que hay herramientas computacionales como lo pueden ser CABS-FLEX, en donde se simulan las posibles fluctuaciones que podría tener una proteína, esto tomando como base datos experimentalmente ya comprobados. Así que una vez que obtenido el docking molecular, y al saber que posiblemente la interacción de la proteína de matriz del VSRH y fibrilarina, pareciera no darse de manera favorable, analizamos si posee los mismos sitios de flexibilidad de la proteína de matriz del virus Hendra, el cual no solo de manera in silico nos arroja buenos datos, si no que también de manera experimental ya se ha demostrado. En la Figura 11 encontramos en el panel A los sitios de flexibilidad (picos) que se encuentran dentro de la secuencia de la proteína de matriz del VSRH, mientras que en el panel B encontramos los sitios de flexibilidad (picos), pero dentro de la proteína de matriz del virus Hendra. Se puede notar que si bien, pareciera que hay una similitud, entre sus sitios de flexibilidad, hay una carencia de otros, ya que la proteína de matriz del VSRH es mas pequeña y la proteína de matriz de Hendra es mayor, así que posiblemente esa deficiencia de residuos de aminoácidos es lo que podría estar causando que no se dé, de manera favorable la interacción entre ambas proteínas de interés.



**Figura 12. Análisis in silico para determinar los posibles sitios de contacto de la proteína fibrilarina con la proteína de matriz del VSRH y el virus Hendra.** A continuación, se muestra la raíz cuadrada del promedio de fluctuaciones (RMSF) que presentan los aminoácidos de la proteína de matriz del virus hendra sola (grafico verde) y con la proteína fibrilarina (grafico rojo). Mientras que la proteína de matriz del VSRH sola se representa en grafico azul y con la proteína fibrilarina en el grafico negro. Se observa que en ambas graficas existen picos, los cuales representan a las regiones que son altamente flexibles. Mientras que las regiones con una menor amplitud representan las regiones más rígidas de la proteína correspondiente.

## 8. DISCUSION

Los virus son parásitos intracelulares que a través de los años han mejorado y generado nuevas estrategias para secuestrar la maquinaria celular y con ellos poder completar su ciclo de infección. La relación entre la célula huésped y el patógeno dependerá del tipo de infección viral. Uno de los procesos que se ha observado tanto en virus de ADN como de ARN, son las interacciones de elementos virales con proteínas y/o elementos residentes del núcleo.

El núcleo es un organelo subcelular que cumple la función de almacenar, conservar, transcribir y duplicar todas las instrucciones necesarias para que la célula pueda mantenerse en homeostasis. En general, el núcleo posee un entorno heterogéneo, multifuncional y dinámico. Dentro del cual podemos encontrar estructuras más

pequeñas y especializadas como lo son los nucleolos y los cuerpos de Cajal(Zidovska, 2020).

Aunque la principal función del nucleolo es la de participar en la síntesis de ARN ribosomal y el ensamblaje de los ribosomas. Se tiene conocimiento de que el nucleolo puede ser un suborganelo nuclear multifuncional debido a que contiene mas de 4500 proteínas. Las cuales se encuentran relacionadas con el control del ciclo celular, replicación y reparación del ADN, regulación de la apoptosis, envejecimiento celular y detección del estrés celular. Adicionalmente, en años recientes se ha evidenciado que el nucleolo juega un papel importante en los ciclos de infección viral(Bahadori et al., 2022). A este respecto, existen diversos reportes en los cuales se ha demostrado que durante las infecciones virales ciertas proteínas de los virus tiene la capacidad de interactuar con componentes nucleares y/o nucleolares. Como es el caso de los virus de ARN de polaridad negativa. En donde se ha reportado que existe la translocación de proteínas virales al núcleo durante las primeras horas de infección. Aunque también se ha encontrado que durante las infecciones por virus de ARN hay una liberación de proteínas nucleolares al citoplasma. O que proteínas residentes del citoplasma son reubicadas al nucléolo de manera temporal (Iarovaia et al., 2021; Rawlinson & Moseley, 2015).

Esta direccionalidad que se les da tanto a las proteínas citoplasmáticas como nucleolares, así como a las proteínas virales durante los ciclos de infección. Se realiza con la finalidad de que exista una interacción entre proteínas celulares y virales que espacial y temporalmente se encuentran aislada. Esto con la finalidad de que su interacción, permita que se lleve a cabo de manera efectiva la replicación, transcripción, y ensamblaje viral. Como es el caso del virus de la influenza A. En donde se ha visto que la redistribución de la proteína nucleolina y fibrilarina es necesaria para que se lleve a cabo el transporte del complejo ribonucleoproteico, el cual es necesario para la replicación del genoma viral (Terrier et al., 2016). Además, durante la infección por influenza A, se ha encontrado que el cambio de localización de la proteína

nucleolar, LYAR es necesario para que se puede facilitar el ensamblaje viral (Yang et al., 2018).

Otro ejemplo es el caso de la proteína de cápside del virus Zika., la cual es responsable de la liberación de nucleofosmina del núcleo. Este proceso se cree que es necesario para que el virus pueda modular la tasa de biogénesis ribosomal, para permitir la síntesis de las proteínas virales sin generar un estrés ribosomal (Iarovaia et al., 2021).

Una de las proteínas que funcionalmente es conservada en la familia de paramixovirus y pneumovirus es la proteína de matriz. A pesar de que dicha proteína en ambas familias difiere tanto en secuencia de aminoácidos como de nucleótidos, la función que desempeña dentro del ciclo de infección en ambas familias se conserva (Slovic et al., 2017). La función principal de la proteína de matriz es la de direccionar el ensamblaje y la gemación en la membrana plasmática. No obstante, se tiene conocimiento de que la proteína de matriz posee la capacidad de transportarse al núcleo celular e interactuar con la cromatina celular, para así inhibir moderadamente la transcripción de la célula huésped (Ghildyal et al., 2002, 2005, 2009; Li et al., 2021). Por lo que este transporte al núcleo sugiere que dicha proteína pueda tener funciones no estructurales durante ciertas fases del ciclo de infección (Pentecost et al., 2015). Sin embargo, la comprensión y mecanismos específicos que podría regular la proteína de matriz aun siguen en estudio.

Si bien, ya se describió un mecanismo por el cual la proteína de matriz puede regular la transcripción celular. En este estudio se buscó evidenciar otro mecanismo por el cual dicha proteína pudiese regular dicho proceso. Para esto, en nuestro presente trabajo se propuso evaluar si la proteína de matriz del VSRH podía interactuar con la proteína fibrilarina. Ya que durante las infecciones de los virus Nipah y Hendra se ha reportado que la proteína de matriz interactúa con proteínas nucleolares como: B23, treacle y fibrilarina para modular la transcripción celular (Rawlinson et al., 2018; Y. E. Wang et al., 2010).

Para evaluar la posible interacción de la proteína de matriz del VSRH con la proteína fibrilarina. Uno de los primeros ensayos que se propuso, fue visualizar la distribución subcelular que presentaban estas proteínas en la línea celular A549 durante la infección. Sin embargo, al no poseer un anticuerpo comercial contra la proteína de matriz. Uno de los primeros ensayos fue la generación de un anticuerpo policlonal. Inicialmente para evaluar que nuestro anticuerpo mostrara un reconocimiento específico de las células infectada. Se realizó una inmunofluorescencia para detectar a la nucleoproteína y a la proteína de matriz. Encontrando que el suero policlonal solo reconocía a las células infectadas. Mientras que, al analizar la tinción doble, observamos que el patrón de distribución que presentaban la proteína de matriz y la nucleoproteína eran similares. Lo cual concuerda con la literatura. Ya que se sabe que la proteína de matriz, la nucleoproteína y la fosfoproteína son proteínas que están involucradas en la formación de los cuerpos de inclusión. Además, se tiene conocimiento de que la proteína de matriz interacciona con los complejos ribonucleoproteicos que contiene a la nucleoproteína, fosfoproteína, polimerasa y el factor viral M2-1(Oliveira et al., 2013). Por lo que se concluyó que nuestro suero policlonal era específico y funcional. A continuación, el siguiente ensayo fue realizar una cinética de infección para detectar a la proteína de matriz en el núcleo. Sin embargo, nuestros datos muestran que la proteína de matriz del VSRH a tiempos tempranos de infección (10 y 12 h.p.i) se encontraba en regiones perinucleares. Mientras que a tiempos tardíos (16 y 24 h.p.i) la distribución que presentaba matriz fue más citoplasmática. Por tanto, al no encontrar la distribución nuclear de matriz ya reportada. Se prosiguió a realizar el cambio del protocolo de permeabilización. Ya que, para detectar antígenos intracelulares, un paso fundamental es una correcta permeabilización de las membranas celulares. Ya que, si no se realiza una correcta permeabilización, el acceso que tendrá el anticuerpo para detectar al antígeno puede ser nulo(Jamur & Oliver, 2010). Normalmente para el análisis de inmunofluorescencia es normal utilizar detergentes como saponina, triton X-100 y Tween 20 para permeabilizar.

El uso de cada detergente va en función de que tanto se quieren eliminar los lípidos de las membranas celulares, siendo la saponina el detergente que remueve más lípidos de membranas. Sin embargo, a pesar de seguir los protocolos proporcionados por el grupo que ha caracterizado la distribución de matriz en el núcleo. No se logro obtener algo similar. Lo cual sugiere la omisión de algún paso metodológico no han reportado.

Por otro lado, al evaluar la posible co-localización de la proteína de matriz y fibrilarina, encontramos que dicha co-localización no se presentaba. Además, al analizar la distribución de fibrilarina. Encontramos que no había ninguna modificación en su distribución al comparar las células falsamente infectas e infectadas. Por lo que, nuestros datos nos sugieren que durante la infección por VSRH no existe una co-localización con la proteína de matriz y, tampoco hay una distribución diferente en la célula de la proteína fibrilarina.

Inicialmente se consideró que encontraríamos una co-localización de las proteínas antes mencionadas. Esto debido a que ya existían reportes en otros modelos virales de que la proteína de matriz podía interactuar con la proteína fibrilarina (Rawlinson et al., 2018). Una posible explicación al fenómeno que observamos en nuestro modelo de estudio. Es que aunque, se sabe que la proteína de matriz de los paramixovirus y pneumovirus se conserva y cumple la misma función (Slovic et al., 2017). Existen diferencias en las secuencias de aminoácidos, lo cual hace que tengan diferentes conformaciones tridimensionales. En el caso del virus Nipah y Hendra la estructura que opta la proteína de matriz preferentemente es dimerica, aunque también se ha reportado que puede encontrarse en forma monomérica (Liu et al., 2018). Mientras que en el caso del VSRH, la proteína de matriz generalmente se encuentra en forma dimerica. Pero al ser fosforilada en el residuo Thr205 adquiere una conformación oligomérica que es la forma funcional (Bajorek et al., 2014; Förster et al., 2015). Estos datos nos explicarían el porque la proteína de matriz de los virus Hendra y Nipah tiene la capacidad de interactuar con las mismas proteínas celulares.

Mientras que la proteína de matriz de VSRH al encontrarse de forma oligomérica tiene características bioquímicas y fisicoquímicas diferentes a la de la proteína de matriz del Hendra y Nipah. Por lo tanto, no se esperaría que estas tres proteínas se comporten de la misma manera al interactuar con las mismas proteínas.

El docking molecular es una herramienta bioinformática que nos permite de manera in silico saber si existe una interacción entre dos o más moléculas, proteicas. Además de que los datos obtenidos de dicha herramienta suelen ser aceptados como válidos por la comunidad científica (Pagadala et al., 2017; Pinzi & Rastelli, 2019).

Por lo tanto, otra herramienta que se utilizó en el presente trabajo fue el uso de los servidores ClusPro y CABS-FLEX para analizar e interpretar si la proteína de matriz del VSRH podía interactuar con la proteína fibrilarina. Para saber si los datos obtenidos de estos servidores y su interpretación representan una aproximación real a un sistema de infección in vitro. Se escogió a la proteína de matriz del virus Hendra como control positivo, ya que existe la evidencia de que esta proteína se puede asociar a la proteína fibrilarina (Deffrasnes et al., 2016).

En nuestro análisis in silico observamos que una de las primeras diferencias que hay entre la proteína de matriz del VSRH y Hendra es la conformación tridimensional que adquieren. Presentando la proteína de matriz del virus Hendra 11 regiones alfa hélices y 16 regiones beta plegadas. Mientras que la proteína de matriz del VSRH presenta solo 9 regiones alfa hélices y 13 regiones beta plegadas. La identificación de las regiones flexibles de una estructura proteica es importante para entender sus implicaciones biológicas. Un programa especializado en predecir las fluctuaciones (flexiones) que posee una estructura proteína es CABS-Flex.

Al hacer el análisis de los sitios flexibles y no flexibles de las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas encontramos diferencias. Presentando más sitios flexibles la proteína de matriz del virus Hendra. Los sitios flexibles son regiones de aminoácidos que se consideran molecularmente dinámicos y en donde pueden ocurrir interacciones con proteínas y/o moléculas.

Mientras que los sitios no flexibles son lo contrario. Por lo tanto, se puede considerar que la proteína de matriz del virus hendra que posee más sitios flexibles, contiene mayor cantidad de regiones de interacción con proteínas y/o moléculas. Mientras que en el caso de la proteína de matriz del VSRH, al mostrar pocos sitios flexibles, contiene pocas regiones de interacción con otras proteínas.

En el análisis anterior solo se consideraron los sitios flexibles cuando la proteína de matriz de ambos virus se encontraba sola. Por lo que el siguiente paso fue evaluar si dichos sitios flexibles cambiaban o se mantenían cuando se ponían a interactuar las secuencias de fibrilarina con la de matriz de ambos virus. Nuestro análisis encontró que en el caso de la proteína de matriz del virus hendra los sitios flexibles se modificaban y se volvían sitios rígidos. Este dato sugiere que esos son los sitios en donde se lleva a cabo la interacción entre ambas proteínas. Ya que se ha reportado que esos sitios flexibles se vuelven rígidos para poder mantener la interacción entre moléculas (Kurcinski et al., 2019; Kuriata et al., 2018). Sin embargo, al analizar los datos de la proteína de matriz del VSRH y la proteína fibrilarina. Encontramos que no existía un cambio en los pocos sitios flexibles que presentaba, lo cual nos indica que la interacción entre ambas proteínas posiblemente no es viable. Todos estos datos nos podrían ayudar a entender el por qué no podemos observar una co-localización de la proteína FBL con la proteína de matriz de VSRH y porque si se observa ese efecto durante la infección por el virus Hendra.

Así que tomando en cuenta los datos in silico y los datos in vitro, se considera que la interacción de la proteína fibrilarina y matriz del VSRH probablemente no se lleva a cabo durante un proceso de infección. Sin embargo, podríamos analizar si la proteína fibrilarina tiene alguna implicación en el ciclo de infección del VSRH. Tomando como referencia el trabajo de Deffrasnes y colaboradores. En donde demostraron que la eliminación o inhibición de manera farmacológica de la proteína fibrilarina generaba una alteración en la síntesis y traducción del ARN viral (Deffrasnes et al., 2016).

Además de la proteína de matriz del VSRH. Otra proteína del VSRH que se ha reportado puede dirigirse al núcleo, es la proteína NS1. Y mas recientemente se ha demostrado que NS1 esta involucrada en la regulación de la transcripción de genes relacionados con la respuesta antiviral (Pei et al., 2021). Por lo que resultaría interesante, analizar si la proteína NS1 podría estar interaccionando con la proteína fibrilarina y así modular de otra manera la transcripción de genes antivirales para promover la continuidad del ciclo de infección de VSRH.

Por tanto, las perspectivas del presente proyecto es elucidar la existencia de otras proteínas del VSRH que tengan la capacidad de dirigirse al núcleo para interaccionar con elementos residentes de dicho organelo. Para así facilitar el ciclo de infección. Y si bien, nuestros datos actuales nos indican que la interacción de fibrilarina y matriz no es posible. A futuro podríamos buscar otras herramientas metodológicas que corroboren o no el resultado obtenido.

## **9. CONCLUSIONES**

1. Durante las primeras horas de infección por VSRH la proteína de matriz se localiza en regiones perinucleares.
2. La proteína fibrilarina de células A549 infectadas con VSRH sufre un reordenamiento o acumulación dentro de los núcleos.
3. Los ensayos in vitro e in silico nos sugieren que la proteína de FBL y de Matriz no interaccionan durante la infección con el VSRH.

## **11. PROSPECTIVAS**

1. Analizar los niveles de expresión de la proteína fibrilarina en células A549 infectadas con VSRH

2. Identificar si la inhibición de la expresión proteína fibrilarina impacta en el ciclo de infección del VSRH.

3. Identificar si otras proteínas virales pueden tener una distribución nucleolar durante la infección con VSRH.

## 12. REFERENCIAS

Anderson, L. J., Jadhao, S. J., Paden, C. R., & Tong, S. (2021). Functional Features of the Respiratory Syncytial Virus G Protein. *Viruses*, 13(7), 1214. <https://doi.org/10.3390/v13071214>

Assane, D., Makhtar, C., Abdoulaye, D., Amary, F., Djibril, B., Amadou, D., Niokhor, D. J. B., Amadou, D., Cheikh, L., Ndongo, D., Mbayame, N., Lamine, F., & Bouh, B. C. S. (2018). Viral and Bacterial Etiologies of Acute Respiratory Infections Among Children Under 5 Years in Senegal. *Microbiology Insights*, 11, 1178636118758651. <https://doi.org/10.1177/1178636118758651>

Bahadori, M., Azizi, M. H., Dabiri, S., & Bahadori, N. (2022). Effects of Human Nucleolus Upon Guest Viral-Life, Focusing in COVID-19 Infection: A Mini- Review. *Iranian Journal of Pathology*, 17(1), 1-7. <https://doi.org/10.30699/IJP.2021.540305.2744>

Bajorek, M., Caly, L., Tran, K. C., Maertens, G. N., Tripp, R. A., Bacharach, E., Teng, M. N., Ghildyal, R., & Jans, D. A. (2014). The Thr205 Phosphorylation Site within Respiratory Syncytial Virus Matrix (M) Protein Modulates M Oligomerization and Virus Production. *Journal of Virology*, 88(11), 6380-6393. <https://doi.org/10.1128/JVI.03856-13>

Bajorek, M., Galloux, M., Richard, C.-A., Szekely, O., Rosenzweig, R., Sizun, C., & Eleouet, J.-F. (2021). Tetramerization of Phosphoprotein Is Essential for Respiratory Syncytial Virus Budding while Its N-Terminal Region Mediates Direct Interactions with

the Matrix Protein. *Journal of Virology*, 95(7), e02217-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.02217-20>

Balakrishnan, A., Price, E., Luu, C., Shaul, J., Wartchow, C., Cantwell, J., Vo, T., DiDonato, M., Spraggon, G., & Hekmat-Nejad, M. (2020). Biochemical Characterization of Respiratory Syncytial Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Complex. *ACS Infectious Diseases*, 6(10), 2800-2811. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00554>

Barik, S. (1992). Transcription of human respiratory syncytial virus genome RNA in vitro: Requirement of cellular factor(s). *Journal of Virology*, 66(11), 6813-6818.

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 of the United States of America*, 109(35), 13996-14000. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210275109>

Battles, M. B., & McLellan, J. S. (2019). Respiratory syncytial virus entry and how to block it. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 233-245. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0149-x>

Beavis, A. C., Tran, K. C., Barrozo, E. R., Phan, S. I., Teng, M. N., & He, B. (2021). Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein Residue S156 Plays a Role in Regulating Genome Transcription and Replication. *Journal of Virology*, 95(24), e0120621. <https://doi.org/10.1128/JVI.01206-21>

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), e1002734. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002734>

Bont, L., Versteegh, J., Swelsen, W. T. N., Heijnen, C. J., Kavelaars, A., Brus, F., Draaisma, J. M. T., Pekelharing-Berghuis, M., van Diemen-Steenvoorde, R. A. A. M., & Kimpen, J. L. L. (2002). Natural reinfection with respiratory syncytial virus does not

boost virus-specific T-cell immunity. *Pediatric Research*, 52(3), 363-367. <https://doi.org/10.1203/00006450-200209000-00009>

Bouillier, C., Cosentino, G., Léger, T., Rincheval, V., Richard, C.-A., Desquesnes, A., Sitterlin, D., Blouquit-Laye, S., Eléouët, J.-F., Gault, E., & Rameix-Welti, M.-A. (2019). The Interactome analysis of the Respiratory Syncytial Virus protein M2-1 suggests a new role in viral mRNA metabolism post-transcription. *Scientific Reports*, 9(1), 15258. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51746-0>

Boyapalle, S., Wong, T., Garay, J., Teng, M., San Juan-Vergara, H., Mohapatra, S., & Mohapatra, S. (2012). Respiratory syncytial virus NS1 protein colocalizes with mitochondrial antiviral signaling protein MAVS following infection. *PloS One*, 7(2), e29386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029386>

Cao, D., Gao, Y., & Liang, B. (2021). Structural Insights into the Respiratory Syncytial Virus RNA Synthesis Complexes. *Viruses*, 13(5), 834. <https://doi.org/10.3390/v13050834>

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. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.10.029>

Cressey, T. N., Noton, S. L., Nagendra, K., Braun, M. R., & Fearn, R. (2018). Mechanism for de novo initiation at two sites in the respiratory syncytial virus promoter. *Nucleic Acids Research*, 46(13), 6785-6796. <https://doi.org/10.1093/nar/gky480>

Currier, M. G., Lee, S., Stobart, C. C., Hotard, A. L., Villenave, R., Meng, J., Pretto, C. D., Shields, M. D., Nguyen, M. T., Todd, S. O., Chi, M. H., Hammonds, J., Krumm, S. A., Spearman, P., Plemper, R. K., Sakamoto, K., Jr, R. S. P., Power, U. F., & Moore, M. L. (2016). EGFR Interacts with the Fusion Protein of Respiratory Syncytial Virus Strain 2-20 and Mediates Infection and Mucin Expression. *PLOS Pathogens*, 12(5), e1005622. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005622>

Deffrasnes, C., Marsh, G. A., Foo, C. H., Rootes, C. L., Gould, C. M., Grusovin, J., Monaghan, P., Lo, M. K., Tompkins, S. M., Adams, T. E., Lowenthal, J. W., Simpson, K. J., Stewart, C. R., Bean, A. G. D., & Wang, L.-F. (2016). Genome-wide siRNA Screening at Biosafety Level 4 Reveals a Crucial Role for Fibrillar in Henipavirus Infection. *PLoS Pathogens*, 12(3), e1005478. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005478>

Duan, Z., Chen, J., Xu, H., Zhu, J., Li, Q., He, L., Liu, H., Hu, S., & Liu, X. (2014). The nucleolar phosphoprotein B23 targets Newcastle disease virus matrix protein to the nucleoli and facilitates viral replication. *Virology*, 452-453, 212-222. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.01.011>

Duan, Z., Deng, S., Ji, X., Zhao, J., Yuan, C., & Gao, H. (2019). Nuclear localization of Newcastle disease virus matrix protein promotes virus replication by affecting viral RNA synthesis and transcription and inhibiting host cell transcription. *Veterinary Research*, 50(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0640-4>

Efstathiou, C., Abidi, S. H., Harker, J., & Stevenson, N. J. (2020). Revisiting respiratory syncytial virus's interaction with host immunity, towards novel therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(24), 5045-5058. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03557-0>

Fearns, R., Peeples, M. E., & Collins, P. L. (2002). Mapping the Transcription and Replication Promoters of Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Virology*, 76(4), 1663-1672. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.4.1663-1672.2002>

Felt, S. A., Sun, Y., Jozwik, A., Paras, A., Habibi, M. S., Nickle, D., Anderson, L., Achouri, E., Feemster, K. A., Cárdenas, A. M., Turi, K. N., Chang, M., Hartert, T. V., Sengupta, S., Chiu, C., & López, C. B. (2021). Detection of respiratory syncytial virus defective genomes in nasal secretions is associated with distinct clinical outcomes. *Nature microbiology*, 6(5), 672-681. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00882-3>

Feng, Z., Xu, L., & Xie, Z. (2022). Receptors for Respiratory Syncytial Virus Infection and Host Factors Regulating the Life Cycle of Respiratory Syncytial Virus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 858629. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.858629>

Fernandes-Matano, L., Monroy-Muñoz, I. E., Angeles-Martínez, J., Sarquiz-Martinez, B., Palomec-Nava, I. D., Pardavé-Alejandre, H. D., Santos Coy-Arechavaleta, A., Santacruz-Tinoco, C. E., González-Ibarra, J., González-Bonilla, C. R., & Muñoz-Medina, J. E. (2017). Prevalence of non-influenza respiratory viruses in acute respiratory infection cases in Mexico. *PLoS One*, 12(5), e0176298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176298>

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. <https://doi.org/10.1128/JVI.03500-14>

Fuentes, S., Coyle, E. M., Beeler, J., Golding, H., & Khurana, S. (2016). Antigenic Fingerprinting following Primary RSV Infection in Young Children Identifies Novel Antigenic Sites and Reveals Unlinked Evolution of Human Antibody Repertoires to Fusion and Attachment Glycoproteins. *PLoS Pathogens*, 12(4), e1005554. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005554>

Galloux, M., Gabiane, G., Sourimant, J., Richard, C.-A., England, P., Moudjou, M., Aumont-Nicaise, M., Fix, J., Rameix-Welti, M.-A., & Eléouët, J.-F. (2015). Identification and Characterization of the Binding Site of the Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein to RNA-Free Nucleoprotein. *Journal of Virology*, 89(7), 3484-3496. <https://doi.org/10.1128/JVI.03666-14>

Galloux, M., Risso-Ballester, J., Richard, C.-A., Fix, J., Rameix-Welti, M.-A., & Eléouët, J.-F. (2020). Minimal Elements Required for the Formation of Respiratory Syncytial Virus Cytoplasmic Inclusion Bodies In Vivo and In Vitro. *mBio*, 11(5), e01202-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01202-20>

Gao, Y., Cao, D., Ahn, H. M., Swain, A., Hill, S., Ogilvie, C., Kurien, M., Rahmatullah, T., & Liang, B. (2020). In vitro trackable assembly of RNA-specific nucleocapsids of the respiratory syncytial virus. *Journal of Biological Chemistry*, 295(3), 883-895. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)49942-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)49942-X)

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. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0112-y>

Ghildyal, R., Ho, A., Dias, M., Soegiyono, L., Bardin, P. G., Tran, K. C., Teng, M. N., & Jans, D. A. (2009). The Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Possesses a Crm1-Mediated Nuclear Export Mechanism. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/JVI.02374-08>

Ghildyal, R., Ho, A., Wagstaff, K. M., Dias, M. M., Barton, C. L., Jans, P., Bardin, P., & Jans, D. A. (2005). Nuclear Import of the Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Mediated By Importin  $\beta$ 1 Independent of Importin  $\alpha$ . *Biochemistry*, 44(38), 12887-12895. <https://doi.org/10.1021/bi050701e>

Ghildyal, R., Mills, J., Murray, M., Vardaxis, N., & Meanger, J. (2002). Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. *The Journal of General Virology*, 83(Pt 4), 753-757. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-4-753>

Gilman, M. S. A., Furmanova-Hollenstein, P., Pascual, G., B. van 't Wout, A., Langedijk, J. P. M., & McLellan, J. S. (2019). Transient opening of trimeric prefusion RSV F proteins. *Nature Communications*, 10(1), 2105. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09807-5>

Gilman, M. S. A., Liu, C., Fung, A., Behera, I., Jordan, P., Rigaux, P., Ysebaert, N., Tcherniuk, S., Sourimant, J., Eléouët, J.-F., Sutto-Ortiz, P., Decroly, E., Roymans, D., Jin, Z., & McLellan, J. S. (2019). Structure of the Respiratory Syncytial Virus

Polymerase Complex. Cell, 179(1), 193-204.e14.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.014>

Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., & Bouvet, P. (1999). Structure and functions of nucleolin. *Journal of Cell Science*, 112 ( Pt 6), 761-772.

Griffiths, C. D., Bilawchuk, L. M., McDonough, J. E., Jamieson, K. C., Elawar, F., Cen, Y., Duan, W., Lin, C., Song, H., Casanova, J.-L., Ogg, S., Jensen, L. D., Thienpont, B., Kumar, A., Hobman, T. C., Proud, D., Moraes, T. J., & Marchant, D. J. (2020). IGF1R is an entry receptor for respiratory syncytial virus. *Nature*, 583(7817), 615-619.  
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2369-7>

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. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.9.5677-5686.1995>

Hallak, L. K., Kwilas, S. A., & Peebles, M. E. (2007). Interaction between respiratory syncytial virus and glycosaminoglycans, including heparan sulfate. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 379, 15-34. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-393-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-393-6_2)

Husby, M. L., & Stahelin, R. V. (2021). Negative-sense RNA viruses: An underexplored platform for examining virus–host lipid interactions. *Molecular Biology of the Cell*, 32(20), pe1. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-09-0490>

Iarovaia, O. V., Ioudinkova, E. S., Velichko, A. K., & Razin, S. V. (2021). Manipulation of Cellular Processes via Nucleolus Hijacking in the Course of Viral Infection in Mammals. *Cells*, 10(7), 1597. <https://doi.org/10.3390/cells10071597>

Ivancic-Jelecki, J., Slovic, A., Ljubin-Sternak, S., Mlinarić Galinović, G., & Forcic, D. (2018). Variability analysis and inter-genotype comparison of human respiratory

syncytial virus small hydrophobic gene. *Virology Journal*, 15(1), 109. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1020-9>

Jamur, M. C., & Oliver, C. (2010). Permeabilization of cell membranes. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 588, 63-66. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_9)

Jin, X., Ren, J., Li, R., Gao, Y., Zhang, H., Li, J., Zhang, J., Wang, X., & Wang, G. (2021). Global burden of upper respiratory infections in 204 countries and territories, from 1990 to 2019. *EClinicalMedicine*, 37. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.100986>

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

King, T., Mejias, A., Ramilo, O., & Peeples, M. E. (2021). The larger attachment glycoprotein of respiratory syncytial virus produced in primary human bronchial epithelial cultures reduces infectivity for cell lines. *PLoS Pathogens*, 17(4), e1009469. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009469>

Kuo, L., Grosfeld, H., Cristina, J., Hill, M. G., & Collins, P. L. (1996). Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. *Journal of Virology*, 70(10), 6892-6901. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.10.6892-6901.1996>

Kurcinski, M., Oleniecki, T., Ciemny, M. P., Kuriata, A., Kolinski, A., & Kmiecik, S. (2019). CABS-flex standalone: A simulation environment for fast modeling of protein flexibility. *Bioinformatics*, 35(4), 694-695. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty685>

Kuriata, A., Gierut, A. M., Oleniecki, T., Ciemny, M. P., Kolinski, A., Kurcinski, M., & Kmiecik, S. (2018). CABS-flex 2.0: A web server for fast simulations of flexibility of

protein structures. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W338-W343. <https://doi.org/10.1093/nar/gky356>

Kvansakul, M. (2017). Viral Infection and Apoptosis. *Viruses*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/v9120356>

Lafontaine, D. L. J., Riback, J. A., Bascetin, R., & Brangwynne, C. P. (2021). The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(3), 165-182. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0272-6>

Li, H.-M., Ghildyal, R., Hu, M., Tran, K. C., Starrs, L. M., Mills, J., Teng, M. N., & Jans, D. A. (2021). Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein-Chromatin Association Is Key to Transcriptional Inhibition in Infected Cells. *Cells*, 10(10), 2786. <https://doi.org/10.3390/cells10102786>

Liu, Y. C., Grusovin, J., & Adams, T. E. (2018). Electrostatic Interactions between Hendra Virus Matrix Proteins Are Required for Efficient Virus-Like-Particle Assembly. *Journal of Virology*, 92(13), e00143-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00143-18>

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. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.21.10776-10784.2002>

Marriott, A. C., Smith, J. M., & Easton, A. J. (2001). Fidelity of Leader and Trailer Sequence Usage by the Respiratory Syncytial Virus and Avian Pneumovirus Replication Complexes. *Journal of Virology*, 75(14), 6265-6272. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.14.6265-6272.2001>

Meng, J., Hotard, A. L., Currier, M. G., Lee, S., Stobart, C. C., & Moore, M. L. (2015). Respiratory Syncytial Virus Attachment Glycoprotein Contribution to Infection Depends on the Specific Fusion Protein. *Journal of Virology*, 90(1), 245-253. <https://doi.org/10.1128/JVI.02140-15>

Noton, S. L., & Fearn, R. (2011). The first two nucleotides of the respiratory syncytial virus antigenome RNA replication product can be selected independently of the promoter terminus. *RNA*, 17(10), 1895-1906. <https://doi.org/10.1261/rna.2813411>

Oliveira, A. P., Simabuco, F. M., Tamura, R. E., Guerrero, M. C., Ribeiro, P. G. G., Libermann, T. A., Zerbini, L. F., & Ventura, A. M. (2013). Human respiratory syncytial virus N, P and M protein interactions in HEK-293T cells. *Virus Research*, 177(1), 108-112. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.07.010>

Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: A review. *Biophysical Reviews*, 9(2), 91-102. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1>

Pei, J., Beri, N. R., Zou, A. J., Hubel, P., Dorando, H. K., Bergant, V., Andrews, R. D., Pan, J., Andrews, J. M., Sheehan, K. C. F., Pichlmair, A., Amarasinghe, G. K., Brody, S. L., Payton, J. E., & Leung, D. W. (2021). Nuclear-localized human respiratory syncytial virus NS1 protein modulates host gene transcription. *Cell Reports*, 37(2), 109803. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109803>

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), e1004739. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004739>

Pereira-Santana, A., Gamboa-Tuz, S. D., Zhao, T., Schranz, M. E., Vinuesa, P., Bayona, A., Rodríguez-Zapata, L. C., & Castano, E. (2020). Fibrillarin evolution through the Tree of Life: Comparative genomics and microsynteny network analyses provide new insights into the evolutionary history of Fibrillarin. *PLOS Computational Biology*, 16(10), e1008318. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008318>

Pinzi, L., & Rastelli, G. (2019). Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4331. <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>

Rawlinson, S. M., & Moseley, G. W. (2015). The nucleolar interface of RNA viruses. *Cellular Microbiology*, 17(8), 1108-1120. <https://doi.org/10.1111/cmi.12465>

Rawlinson, S. M., Zhao, T., Rozario, A. M., Rootes, C. L., McMillan, P. J., Purcell, A. W., Woon, A., Marsh, G. A., Lieu, K. G., Wang, L.-F., Netter, H. J., Bell, T. D. M., Stewart, C. R., & Moseley, G. W. (2018). Viral regulation of host cell biology by hijacking of the nucleolar DNA-damage response. *Nature Communications*, 9(1), 3057. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05354-7>

Russell, C. J., Jardetzky, T. S., & Lamb, R. A. (2001). Membrane fusion machines of paramyxoviruses: Capture of intermediates of fusion. *The EMBO Journal*, 20(15), 4024-4034. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.15.4024>

Shahriari, S., Wei, K., & Ghildyal, R. (2018). Respiratory Syncytial Virus Matrix (M) Protein Interacts with Actin In Vitro and in Cell Culture. *Viruses*, 10(10), 535. <https://doi.org/10.3390/v10100535>

Shang, Z., Tan, S., & Ma, D. (2021). Respiratory syncytial virus: From pathogenesis to potential therapeutic strategies. *International Journal of Biological Sciences*, 17(14), 4073-4091. <https://doi.org/10.7150/ijbs.64762>

Shi, T., McAllister, D. A., O'Brien, K. L., Simoes, E. A. F., Madhi, S. A., Gessner, B. D., Polack, F. P., Balsells, E., Acacio, S., Aguayo, C., Alassani, I., Ali, A., Antonio, M., Awasthi, S., Awori, J. O., Azziz-Baumgartner, E., Baggett, H. C., Baillie, V. L., Balmaseda, A., ... Nair, H. (2017). Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: A systematic review and modelling study. *The Lancet*, 390(10098), 946-958. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30938-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30938-8)

Shingai, M., Azuma, M., Ebihara, T., Sasai, M., Funami, K., Ayata, M., Ogura, H., Tsutsumi, H., Matsumoto, M., & Seya, T. (2008). Soluble G protein of respiratory syncytial virus inhibits Toll-like receptor 3/4-mediated IFN-beta induction. *International Immunology*, 20(9), 1169-1180. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxn074>

Sibert, B. S., Kim, J. Y., Yang, J. E., Ke, Z., Stobart, C. C., Moore, M. M., & Wright, E. R. (2021). Respiratory syncytial virus matrix protein assembles as a lattice with local and extended order that coordinates the position of the fusion glycoprotein (p. 2021.10.13.464285). *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.10.13.464285>

Slovic, A., Kosutic-Gulija, T., Santak, M., Ivancic-Jelecki, J., Jagusic, M., Ljubin-Sternak, S., Mlinarić-Galinović, G., Vilibić-Čavlek, T., Tabain, I., & Forcic, D. (2017). Genetic Variability and Sequence Relatedness of Matrix Protein in Viruses of the Families Paramyxoviridae and Pneumoviridae. *Intervirology*, 60(5), 181-189. <https://doi.org/10.1159/000487049>

Staadegaard, L., Caini, S., Wangchuk, S., Thapa, B., de Almeida, W. A. F., de Carvalho, F. C., Njouom, R., Fasce, R. A., Bustos, P., Kyncl, J., Novakova, L., Caicedo, A. B., de Mora Coloma, D. J., Meijer, A., Hooiveld, M., Huang, S., Wood, T., Guiomar, R., Rodrigues, A. P., ... Paget, J. (2021). The Global Epidemiology of RSV in Community and Hospitalized Care: Findings From 15 Countries. *Open Forum Infectious Diseases*, 8(7), ofab159. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab159>

Stern-Ginossar, N., Thompson, S. R., Mathews, M. B., & Mohr, I. (2019). Translational Control in Virus-Infected Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(3), a033001. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033001>

Sun, Y., Kim, E. J., Felt, S. A., Taylor, L. J., Agarwal, D., Grant, G. R., & López, C. B. (2019). A specific sequence in the genome of respiratory syncytial virus regulates the generation of copy-back defective viral genomes. *PLoS Pathogens*, 15(4), e1007707. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007707>

Sutto-Ortiz, P., Tcherniuk, S., Ysebaert, N., Abeywickrema, P., Noël, M., Decombe, A., Debart, F., Vasseur, J.-J., Canard, B., Roymans, D., Rigaux, P., Eléouët, J.-F., & Decroly, E. (2021). The methyltransferase domain of the Respiratory Syncytial Virus L protein catalyzes cap N7 and 2'-O-methylation. *PLoS Pathogens*, 17(5), e1009562. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009562>

Tabor, D. E., Fernandes, F., Langedijk, A. C., Wilkins, D., Lebbink, R. J., Tovchigrechko, A., Ruzin, A., Kragten-Tabatabaie, L., Jin, H., Esser, M. T., Bont, L. J., Abram, M. E., & the INFORM-RSV Study Group. (2020). Global Molecular Epidemiology of Respiratory Syncytial Virus from the 2017–2018 INFORM-RSV Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(1), e01828-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01828-20>

Tate, M. D., Brooks, A. G., & Reading, P. C. (2008). The role of neutrophils in the upper and lower respiratory tract during influenza virus infection of mice. *Respiratory Research*, 9, 57. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-9-57>

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 (New York, N.Y.)*, 326(5957), 1279-1283. <https://doi.org/10.1126/science.1177634>

Tayyari, F., Marchant, D., Moraes, T. J., Duan, W., Mastrangelo, P., & Hegele, R. G. (2011). Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nature Medicine*, 17(9), 1132-1135. <https://doi.org/10.1038/nm.2444>

Terrier, O., Carron, C., De Chasse, B., Dubois, J., Traversier, A., Julien, T., Cartet, G., Proust, A., Hacot, S., Ressenkoff, D., Lotteau, V., Lina, B., Diaz, J.-J., Moules, V., & Rosa-Calatrava, M. (2016). Nucleolin interacts with influenza A nucleoprotein and contributes to viral ribonucleoprotein complexes nuclear trafficking and efficient influenza viral replication. *Scientific Reports*, 6, 29006. <https://doi.org/10.1038/srep29006>

Thornhill, E. M., & Verhoeven, D. (2020). Respiratory Syncytial Virus's Non-structural Proteins: Masters of Interference. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00225>

Tian, J., Huang, K., Krishnan, S., Svabek, C., Rowe, D. C., Brewah, Y., Sanjuan, M., Patera, A. C., Kolbeck, R., Herbst, R., & Sims, G. P. (2013). RAGE inhibits human respiratory syncytial virus syncytium formation by interfering with F-protein function. *The Journal of General Virology*, 94(Pt 8), 1691-1700. <https://doi.org/10.1099/vir.0.049254-0>

Triantafilou, K., Kar, S., Vakakis, E., Kotecha, S., & Triantafilou, M. (2013). Human respiratory syncytial virus viroporin SH: A viral recognition pathway used by the host to signal inflammasome activation. *Thorax*, 68(1), 66-75. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-202182>

Wang, L., Ng, T. F. F., Castro, C. J., Marine, R. L., Magaña, L. C., Esona, M., Peret, T. C. T., & Thornburg, N. J. (2022). Next-generation sequencing of human respiratory syncytial virus subgroups A and B genomes. *Journal of Virological Methods*, 299, 114335. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114335>

Wang, Y. E., Park, A., Lake, M., Pentecost, M., Torres, B., Yun, T. E., Wolf, M. C., Holbrook, M. R., Freiberg, A. N., & Lee, B. (2010). Ubiquitin-regulated nuclear-cytoplasmic trafficking of the Nipah virus matrix protein is important for viral budding. *PLoS Pathogens*, 6(11), e1001186. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001186>

Ward, C., Maselko, M., Lupfer, C., Prescott, M., & Pastey, M. K. (2017). Interaction of the Human Respiratory Syncytial Virus matrix protein with cellular adaptor protein complex 3 plays a critical role in trafficking. *PLOS ONE*, 12(10), e0184629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184629>

Yang, C., Liu, X., Gao, Q., Cheng, T., Xiao, R., Ming, F., Zhang, S., Jin, M., Chen, H., Ma, W., & Zhou, H. (2018). The Nucleolar Protein LYAR Facilitates Ribonucleoprotein Assembly of Influenza A Virus. *Journal of Virology*, 92(23), e01042-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01042-18>

Zidovska, A. (2020). The rich inner life of the cell nucleus: Dynamic organization, active flows, and emergent rheology. *Biophysical Reviews*, 12(5), 1093-1106. <https://doi.org/10.1007/s12551-020-00761-x>

Zimmer, G., Budz, L., & Herrler, G. (2001). Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 31642-31650. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102633200>



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00248  
Matrícula: 2202800602

Evaluación de la interacción de la proteína de matriz del Virus Sincicial Respiratorio Humano (VSRH) con la proteína nucleolar fibrilarina

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 12 del mes de agosto del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. LETICIA CEDILLO BARRON  
DR. HECTOR FERNANDO SERRANO  
DR. RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE  
DR. JULIO GARCIA CORDERO



JÓSE MANUEL ULLOA AGUILAR  
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: JOSE MANUEL ULLOA AGUILAR

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. LETICIA CEDILLO BARRON

VOCAL

DR. HECTOR FERNANDO SERRANO

VOCAL

DR. RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA  
CONDE

SECRETARIO

DR. JULIO GARCIA CORDERO