



UNIVERSIDAD VERACRUZANA

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**ESTUDIO DE LOS FACTORES DE INICIO DE LA
TRADUCCIÓN eIF4E y eIF4G DURANTE LA INFECCIÓN POR
VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO**

TESIS

Doctorado en Ciencias Biomédicas

PRESENTA:

Q.F.B. Gustavo Antonio Pérez Gil Cervantes

**Director de tesis:
Dra. Hilda Montero L. de Guevara**

**Asesores:
Dra. Carolina Barrientos Salcedo
Dr. Stefan Marian Waliszewski Kubiak**

Xalapa, Ver.

Diciembre, 2017

Becario CONACYT No. 2811310

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Hilda Montero L. de Guevara, en el laboratorio de Ecología y Salud del Instituto de Salud Pública de la Universidad Veracruzana, con los apoyos financieros del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) número 222194 y 346287, siendo este último un recurso del programa de becas para estudios de posgrado otorgado por el CONACYT al becario No 2811310.

AGRADECIMIENTOS

A mi padre el señor José Gustavo Pérez Gil, a la señora Águeda Cervantes Pablo y a mi hermano Raymundo Pérez Gil Cervantes; por el apoyo, los consejos y el cariño que como familia me han brindado.

A mi directora de tesis, la Dra. Hilda Montero L. de Guevara; que, con sus conocimientos, capacidad y experiencia, dirigió y llevó a buen término este trabajo recepcional.

A la Dra. Silvia Ivonne Mora Herrera, quien estuvo a cargo de mí durante mi estancia académica en el Instituto de Biotecnología de la UNAM; una gran maestra y consejera.

A la Dra. Carolina Barrientos Salcedo y al Dr. Stefan Marian Waliszewski Kubiak, quienes fungieron como mi comité tutorial y contribuyeron en gran medida con este trabajo recepcional con sus conocimientos y sus respectivos campos de experiencia.

A mi jurado integrado por: Dr. Juan Diego Santiago García, Dr. Mario Salvador Caba Vinagre, Dr. Omar Elind Arroyo Helguera, Dra. Rossana Citlali Zepeda Hernández y Dra. Rosa Virginia García Rodríguez. Por los aportes a este trabajo desde sus respectivos campos de experiencia.

A la Lic. Psic. Edith Abigail Velazco Díaz, por el cariño y afecto que como pareja me ha brindado.

A la Q.F.B. Adriana Landa Cardeña, por el apoyo técnico aportado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico brindado para la realización de mi Doctorado y mi estancia académica.

Al Laboratorio de Ecología y Salud del Instituto de Salud Pública de la Universidad Veracruzana, por la apertura y todas las facilidades brindadas.

Al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Veracruzana, por todo el apoyo académico y económico durante todo el programa de Doctorado.

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM, por todas las facilidades técnicas y de espacio de trabajo para la realización de algunas de las metodologías empleadas en esta tesis.

**Estudio de los factores de inicio de la
traducción eIF4E y eIF4G durante la infección
por virus sincitial respiratorio**

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMEN	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. ANTECEDENTES	16
2.1 Características de los mRNAs eucariontes	16
2.2 Fases de la traducción	17
2.3 Traducción cap-dependiente.....	17
2.4 Traducción independiente de cap	20
2.5 Factores eIF4E y eIF4G como blancos de control traduccional.....	21
2.6 Los virus regulan el inicio de la traducción a través de eIF4E y eIF4G	25
2.7 Virus sincitial respiratorio	27
2.7.1 Proteínas virales	27
2.7.2 Ciclo replicativo	28
2.8 Síntesis de proteínas durante la infección por VSR.....	30
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. HIPÓTESIS	32
5. OBJETIVOS	33
5.1 Objetivo general	33
5.1.2 Objetivos particulares.....	33
6. MATERIALES Y MÉTODOS	34
6.1 Propagación de VSR en cultivos celulares.....	34
6.2 Ensayo en placa para la cuantificación de partículas infecciosas	35
6.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y western blot	36
6.4 Marcaje metabólico.....	37
6.5 Tratamiento con rapamicina.....	37
6.6 Inmunofluorescencia.....	38
7. RESULTADOS.....	39
7.1 4EBP1 es defosforilado durante la infección por VSR.....	39
7.2 La cantidad de eIF4G1 disminuye durante la infección por VSR.....	40

7.3 La tasa de síntesis de proteína celular disminuye un 40% durante la infección por VSR.....	41
7.4 La redistribución de la proteína eIF4GI en el citoplasma cambia a lo largo de la infección por VSR	42
7.5 La redistribución de la proteína eIF4E en el citoplasma cambia a lo largo de la infección por VSR	43
7.6 La proteína PABPC es translocada al núcleo durante la infección por VSR	44
7.7 La replicación de VSR se ve favorecida en condiciones de arresto de la síntesis de proteína celular.....	46
8. DISCUSIÓN	47
9. CONCLUSIONES.....	53
10. REFERENCIAS	55
11. ANEXOS.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de RNA mensajero eucariótico.....	17
Figura 2. Complejo de inicio de la traducción eIF4F	18
Figura 3. Inicio de la traducción.....	19
Figura 4. Vía de señalización PI3K/AKT	23
Figura 5. Sitios de unión de los factores de iniciación en eIF4G	25
Figura 6. Esquema del genoma de VSR	27
Figura 7. Ciclo replicativo de VSR.....	29
Figura 8. Defosforilación de 4EBP1 durante la infección por VSR.....	39
Figura 9. Disminución de la cantidad de eIF4GI durante la infección por VSR.	40
Figura 10. Reducción de la síntesis de proteínas durante la infección por VSR	41
Figura 11. eIF4GI forma agregados citoplasmáticos en células infectadas con VSR	42
Figura 12. eIF4E forma agregados citoplasmáticos en células infectadas con VSR.....	43
Figura 13. PABPC es translocada al núcleo durante la infección con VSR	45
Figura 14. El tratamiento con rapamicina incrementa la progenie viral	46
Figura 15. VSR genera condiciones intracelulares que favorecen su replicación	54

LISTA DE ABREVIATURAS

μ Ci/ml. Microcurios/ml

2Apro. Proteasa 2A

³⁵S. Isótopo de sulfuro

4EBP. Proteína de unión al factor de inicio eucariótico 4E

AKT. Ver PKB

ASFV. Virus de la peste porcina africana

BSA. Albumina sérica bovina

CARV. Virus respiratorios adquiridos en comunidad

CD8. Cúmulo de diferenciación 8

CO₂. Dióxido de carbono

DAPI. 4',6-diamino-2-fenilindol

DEP. Despeinado, EGL-10 y pleckstrina

DEPTOR. Proteína de interacción con mTOR que contiene dominios DEP

DMEM. Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco

DV. Dengue virus

Ebp-1. Proteína de unión a ErbB3 1

EDTA. ácido etilendiaminotetraacético

eIF1. Factor de inicio eucariótico 1

eIF1A. Factor de inicio eucariótico 1A

eIF2. Factor de inicio eucariótico 2

eIF2B. Factor de inicio eucariótico 2B

eIF2 α . Subunidad α del factor de inicio eucariótico 2

eIF3. Factor de inicio eucariótico 3

eIF4A. Factor de inicio eucariótico 4A

eIF4E. Factor de inicio eucariótico 4E

eIF4F. Factor de inicio eucariótico 4F

eIF4G. Factor de inicio eucariótico 4G

eIF4G1. Factor de inicio eucariótico G1

eIF4GII. Factor de inicio eucariótico G2

eIF5. Factor de inicio eucariótico 5

EMCV. Virus de la encefalomiocarditis

ErbB3. Ver HER3

FCV. Calicivirus felino

FKBP. Proteína de unión a tacrolimus

FMDV. Virus de la enfermedad manos, pies y boca

FMRP. Proteína del retardo mental X frágil

FRAP/mTOR. Proteína asociada a FKBP-rapamicina / blanco de la rapamicina en los mamíferos

G3BP1. Proteína de unión a proteína activada por GTPasa (Dominio SH3)

GCN2. Control general no depresible 2

GDP. Guanosina difosfato

GTP. Guanosina trifosfato

HCV. Virus de la hepatitis C

HDAC6. Histona desacetilasa 6

HeLa. Células Henrietta Lacks

HEp-2. Carcinoma epidermoide humano cepa 2

HER3. Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 3

HIV-PR. Proteasa de VIH-1

hpi. Horas postinfección

hpt. Horas postratamiento

HRI. Inhibidor regulado por hemina

HSV-1. Virus del herpes simple tipo 1

HTLV-1. Virus linfotrópico de células T humanas

HuR. Antígeno humano R

ICP0. Proteína viral inmediata-temprana

IRES. Sitio interno de entrada al ribosoma

ITAF. Factores transactivadores de IRES

KCl. Cloruro de potasio

kDa. Kilodalton

KSHV. Virus de herpes asociado a sarcoma de Kaposi

LST8. Letal con SEC13 8

Mcl-1. Proteína de Inducción de la leucemia mieloide y diferenciación de células

Met-tRNAi. Metionil-tRNA iniciador

MFI. Mediciones de intensidad de la fluorescencia

MgSO₄. Sulfato de magnesio

mLST8. Proteína asociada a mTOR homologa a LST8

MMTV. Virus de tumor mamario de ratón

MNKI. Serina/treonina quinasa 1 de interacción con MAP quinasa

MNKII. La serina/treonina quinasa 2 de interacción con MAP quinasa

MOI. Multiplicidad de infección

MoMLV. Virus de la leucemia murina de Moloney

mRNA. Ácido ribonucleico mensajero

mTOR. Proteína blanco de la rapamicina en mamíferos

mTORC1. Complejo 1 de la proteína blanco de la rapamicina en mamíferos

mTORC2. Complejo 2 de la proteína blanco de la rapamicina en mamíferos

Myc. Mielocitomatosis

Na₃VO₄. Ortovanadato de sodio

NaCl. Cloruro de sodio

NAF. Fluoruro de sodio

NaHCO₃. Bicarbonato de sodio

NH₄Cl. Cloruro de amonio

NSP3. Proteína no estructural 3

ORF. Marco abierto de lectura

P220. Proteína de 220 kDa (ver eIF4G)

PABP. Proteína de unión a tracto poliadenilado

PABP1. Proteína de unión a tracto poliadenilado 1

PABPC. Proteína de unión a tracto poliadenilado

PBS. Solución fosfato salino

PERK. Cinasa de retículo endoplásmico similar a PKR

PHAS. Proteína fosforilada termo y ácido estable regulada por insulina 1

PHBE. Cultivo primario bronquial humano

PI3K/AKT. Fosfoinositol 3-quinasa/ Proteína cinasa B

PKA. Proteína cinasa A

PKB. Proteína cinasa B

PKC. Proteína cinasa C

PKR. Proteína cinasa activada por RNA

PL/MIPL. Nivel de proteína sobre niveles de proteína del control no infectado

PP2A. Proteína fosfatasa 2A

PRAS40. Sustrato rico en prolina de. Akt/PKB de 40 kDa

PTB. Proteína de unión a tracto polipirimidinico

PVM. Virus de la neumonía de ratón

RNA. Ácido ribonucleico

SDS-PAGE. Electroforesis en gel de poliacrilamida-Dodecilsulfato de sodio

SFB. Suero fetal bovino

SIV. Virus de la inmunodeficiencia de simios

SOT. Pacientes con trasplante de órganos sólidos

SOX. Proteína apagado y exonucleasa

TA. Temperatura ambiente

TDRD3. Proteína 3 que contiene dominio Tudor

TGF- β . Factor de crecimiento tumoral β

TIA1. Antígeno intracelular de células T 1

TIAR. Proteína TIA-1 relacionada

Tris. Tris(hidroximetil)aminometano

tRNA. Ácido ribonucleico de transferencia

TTP. Tristetraprolin

UFP/ml. Unidad Formadora de Placas por ml

uORF. Marco de lectura abierto rio arriba

UTR. Región flanqueante no traducida

VERO. Verda reno (En idioma esperanto)

VIH-1. Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1

VIH-2. Virus de inmunodeficiencia humana tipo 2

VSR. Virus sincitial respiratorio

VSV. Virus de la estomatitis vesicular

YB1. Proteína de unión a la caja Y 1

RESUMEN

El virus sincitial respiratorio (VSR) es un patógeno de importancia en salud pública causante de infecciones respiratorias severas como la bronquiolitis, afecta principalmente a niños y no existe una vacuna, por lo que es necesario conocer sus mecanismos de replicación y establecer estrategias terapéuticas para controlar la infección. El inicio de la traducción es una fase altamente regulada y de alta importancia en la replicación viral, por lo que nuestro objetivo fue analizar los factores claves del inicio de la traducción eIF4E y eIF4G durante la infección por VSR. 4EBP1 es un represor de la traducción celular que se activa para unirse con eIF4E cuando está hipofosforilado, por lo que, mediante western blot y usando anticuerpos contra 4EBP1 fosfoespecíficos observamos que éste es defosforilado durante la infección por VSR desde las 12 hpi. Ya que eIF4G es blanco de proteólisis en algunas infecciones virales, mediante western blot y anticuerpos dirigidos a este factor traduccional, observamos que disminuye a las 36 hpi, mientras aumenta una banda de menor peso molecular. Un marcaje metabólico de células HEp-2 infectadas con VSR mostró una disminución de la síntesis de proteínas celulares a partir de las 28 hpi (horas post-infección) y que es reducida en un 40% a partir de las 32 hpi. Para evaluar la localización intracelular de eIF4E y eIF4G, se utilizó microscopía de fluorescencia, utilizando a la proteína PABP (proteína de unión al tracto poliadenilado) como control. Los resultados obtenidos muestran que tanto eIF4E como eIF4G forman agregados en el citoplasma a las 20 hpi, mientras que PABPC se transloca al núcleo al mismo tiempo. Debido a que los resultados muestran que durante la infección 4EBP1 es defosforilada a partir de las 28 horas, decidimos utilizar rapamicina, un inductor de la defosforilación de 4EBP, en las células Hep-2 infectadas con VSR durante 36 horas. Los resultados muestran un aumento de progenie viral de hasta 8 veces. En conjunto, los resultados de nuestro estudio sugieren que el VSR regula factores de inicio de la traducción, uno de los cuales puede ser eIF4E a través de la defosforilación de 4EBP favoreciendo su ciclo de replicación. Nuestro estudio aporta evidencia para futuras investigaciones ya que en la clínica se utiliza a la rapamicina y sus derivados como inmunodepresores, sobre todo en pacientes con trasplantes que podrían ser infectados por VSR haciendo más severa la infección; por lo que, es necesario realizar más estudios al respecto.

ABSTRACT

Respiratory syncytial virus (RSV) is an important pathogen in public health, that mainly affect children and doesn't exist a vaccine, so it is necessary to know its replication mechanism and to establish therapeutic strategies to control the infection. Translation initiation is a highly regulated phase and it has high importance for viral replication, therefore our main aim was to analyze the key initiation factors eIF4E and eIF4G during RSV infection. 4EBP is a cellular translation repressor that is activated by binding to eIF4E when is hypophosphorylated. So that, using western blot and antibodies against phosphorylated 4EBP1, we observed that is dephosphorylated since 12 pih during RSV infection. Since eIF4G is a proteolytic target in some viral infections, using western blot and antibodies against eIF4G, we observed a decrease at 36 pih. Meanwhile, a low molecular weight band was increased. HEp-2 cells infected with RSV metabolic labeling showed a protein synthesis decrease since 28 pih and that was reduced by 40% at 32 and 36 pih. We used immunofluorescent microscopy to evaluate the intracellular location of eIF4E and eIF4G, using PABP (Poly(A)-binding protein) as a control. The results obtained show that both eIF4E and eIF4G form cytoplasmic aggregates at 20 pih, meanwhile PABPC was translocated to the nucleus at the same pih. Since our results show that, during infection, 4EBP is dephosphorylated at 28 hours, we decided to use rapamycin, a dephosphorylation inductor of 4EBP in HEp-2 cells 36 hours before infection. The results showed that viral progeny was increased by 8 folds. Altogether, our results show that RSV regulates translational initiation factors, one can be eIF4E through 4EBP dephosphorilation favoring its replication. Our study provides evidence for futures investigations, because in clinic, rapamycin and derivates are used like immunosuppressant agents, especially in patients with organ transplantation who can be infected by RSV, making more severe the infection. Therefore, more studies are necessary.

1. INTRODUCCIÓN

El virus sincitial respiratorio (VSR) humano, bovino, ovino, caprino y el virus de la neumonía de ratón (PVM) pertenecen al género *Pneumovirus*, subfamilia Pneumoviridae y familia Paramyxoviridae (Cane, 2006). El VSR es un virus envuelto con genoma de RNA de cadena sencilla, no segmentado y polaridad negativa (Cowton et al., 2006). El genoma y el antígenoma no poseen cap ni tracto poliadenilado. Del genoma se transcriben 10 mRNAs que poseen cap, poli A y están flanqueados por secuencias conservadas y poseen una región intergénica que puede variar en longitud y secuencias (Bermingham y Collins, 1999; Harmon y Wertz, 2002; Moudy et al., 2004). En el ser humano, VSR tiene importancia clínica, ya que es el principal patógeno en infecciones respiratorias en niños (Manjarrez et al., 2003). VSR es altamente infeccioso y es contraído por niños menores de dos años que pueden desarrollar infecciones de mayor severidad como la bronquiolitis (Leung et al., 2005). La infección por este virus puede ocurrir a cualquier edad, por lo que, no está restringido a niños. En adultos mayores y personas inmunocomprometidas puede ocasionar infecciones severas o incluso la muerte (Welliver, 2003; Falsey et al., 2005). Las infecciones por VSR pueden ser recurrentes y se ha propuesto que puede ocasionar infecciones persistentes y asma (Sarmiento et al., 2002; Mohapatra y Boyapalle, 2008; Sarmiento et al., 2008).

VSR tiene un tropismo parcialmente caracterizado y se sabe que su genoma puede ser detectado en ojos, sangre, hígado, fluido cerebro-espinal y miocardio (Eisenhut, 2006; Bitko et al., 2007a). Además, VSR puede encontrarse en secreciones nasales, saliva, sudor y heces fecales (von Linstow et al., 2006). Esto sugiere un extenso modo de transmisión que podría llevar a grandes epidemias, elevada tasa de morbilidad y mortalidad. Actualmente no se ha patentado una vacuna y, dado el gran problema de salud asociado a su infección, es necesario conocer los mecanismos que emplea para replicarse y establecer estrategias terapéuticas antivirales para controlar la infección (Neuzil, 2016).

Los virus necesitan a la célula para poderse replicar. El proceso de la traducción, así como las proteínas celulares que participan, son altamente regulados durante las infecciones virales debido a que es un evento necesario para la síntesis de proteína viral.

Los estudios realizados sobre la traducción del RNA mensajero (mRNA) viral ha aportado valiosa información de cómo es llevada a cabo la traducción celular y su relación (Shors, 2009).

Se ha sugerido que la traducción y sus componentes responden a una gran variedad de condiciones, tal y como se ha observado en algunas enfermedades como cáncer (Mamane et al., 2006), diabetes (Shi et al., 2003), en infecciones virales (Schneider y Mohr, 2003) y en algunos procesos fisiológicos como el proceso de memoria (Costa-Mattioli y Sonenberg, 2008). Por esta razón, se ha despertado un gran interés por entender las bases moleculares de este proceso celular ya que parece representar un posible blanco para el tratamiento y control de este tipo de patologías, entre las que se incluye las infecciones virales.

2. ANTECEDENTES

2.1 Características de los mRNAs eucariontes

En los mRNAs de células eucariontes existen elementos estructuralmente compartidos. Una región codificante denominada ORF (marco de lectura abierta), flanqueada por dos secuencias no codificantes o UTR (Región flanqueante no traducida), tanto en el extremo 5' como en el 3' (5' UTR y 3' UTR). En el extremo 5' se encuentra el cap, que es una estructura m⁷Gpppx (x es cualquier nucleótido). El extremo 3' se caracteriza por presentar un tracto poliadenilado (poli A), en mamíferos la poli A tiene una longitud de 250 nucleótidos y en levaduras tiene hasta 80 nucleótidos, de forma interesante, en mRNAs de histonas puede estar ausente. Las estructuras cap y poli A juegan un papel importante en la eficiencia de la traducción (Gray y Wickens, 1998; Gingras et al., 1999b; Wilkie et al., 2003; Pickering y Willis, 2005; Voet y Voet, 2006). Otras características de los mRNAs es que pueden contener elementos en *cis* (cis-acting elements), los cuales son estructuras que tienen como función modular la traducción y en estos se incluye a las secuencias flanqueantes del codón de inicio, estructuras secundarias en la región 5' UTR, marcos abiertos de lectura río arriba (uORF), sitios de

unión específicos a proteínas reguladoras, trectos oligopirimidínicos en el extremo 5' y sitios de entrada directa al ribosoma (IRES) (Gingras et al., 1999b). Las estructuras básicas de un mRNA eucariótico se representan en la figura 1.



Figura 1. Esquema de RNA mensajero eucariótico. La imagen muestra las estructuras cap, UTR, Codón de inicio AUG, marco de lectura ORF, UTR 3' y el tallo poli A (Gray y Wickens, 1998; Gingras et al., 1999b; Wilkie et al., 2003; Pickering y Willis, 2005).

2.2 Fases de la traducción

La síntesis de proteínas se lleva a cabo en el citoplasma y se divide en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. Las proteínas que participan en los tres procesos de la traducción se les llaman factores traduccionales. La fase de inicio comprende todo proceso previo al ensamble del ribosoma en el codón de inicio, esta fase se caracteriza por su alto grado de regulación (Gray y Wickens, 1998; Kapp y Lorsch, 2004). La traducción puede ser de dos tipos dependiendo de los elementos involucrados: cap-dependiente y cap-independiente, esta última es mediada por IRES (Sitio interno de entrada al ribosoma) (Gray y Wickens, 1998).

2.3 Traducción cap-dependiente

La síntesis de proteínas mediada por cap es la más empleada por los mRNAs celulares. En este proceso el mRNA es reclutado a un factor de inicio de la traducción eucariota (eIF) llamado 4F (eIF4F), formado por tres factores traduccionales conocidos como eIF4A, eIF4E y eIF4G. eIF4E tiene como principal función unirse a la estructura cap del mRNA (Sonenberg et al., 1979; Schneider y Mohr, 2003). eIF4A presenta motivos estructurales que le proveen de funciones de helicasa y ATPasa dependiente de RNA (Gingras et al., 1999b). El factor eIF4G es una proteína de andamiaje que se une a eIF4E a través de su región N-terminal y a eIF4A a través de su región media (Schneider y Mohr,

2003). Por otro lado, la proteína de unión al tracto poliadenilado (PABP) se une al segmento poliadenilado del mRNA, y también se une a eIF4G. Al establecerse las interacciones 5'-cap-eIF4E-eIF4G-PABP-3'-poliA se genera una pseudo-circularización del mRNA, conformación a la que se le denomina “closed loop” (Fig. 2) (Mohr, 2006).

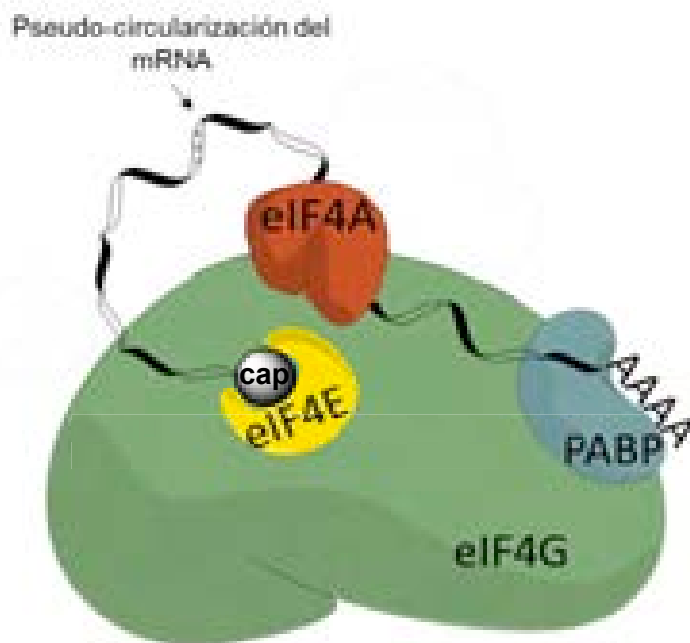


Figura 2. Complejo de inicio de la traducción eIF4F. eIF4F está formado por las proteínas eIF4E, eIF4G y eIF4A cuya función es la pseudo-circularización del mRNA (Sonenberg et al., 1979; Schneider y Mohr, 2003).

El complejo 43S que se encuentra formado por la subunidad ribosomal 40S, eIF3 y el complejo ternario (formado por eIF2, GTP y tRNA-metionina iniciadora [Met-tRNA_i]), se une a eIF4F a través de eIF4G (Fig. 3) (Gingras et al., 1999b; Pestova y Hellen, 2000; Preiss y Hentze, 2003). El factor eIF3 tiene como función ayudar a la unión con el mRNA. Una vez que el complejo 43S se encuentra en el mRNA, se inicia un escaneo, en el que la subunidad ribosomal 40S busca el codón de inicio AUG (codón que codifica para metionina). Este codón de inicio, generalmente, es el que se encuentra más próximo al cap. Los factores eIF1 o eIF1A apoyan en el escaneo, mientras que, eIF5 colabora en la unión de las subunidades ribosomales 40S y 60S con la consecuente hidrólisis de GTP y la liberación de eIF2 en forma de complejo binario con GDP: eIF2-GDP. El GDP del complejo binario es posteriormente intercambiado a GTP por el factor eIF2B para dar

inicio nuevamente al proceso de inicio traduccional (Fig. 3) (Gingras et al., 1999b; Schneider y Mohr, 2003; Mohr, 2006).

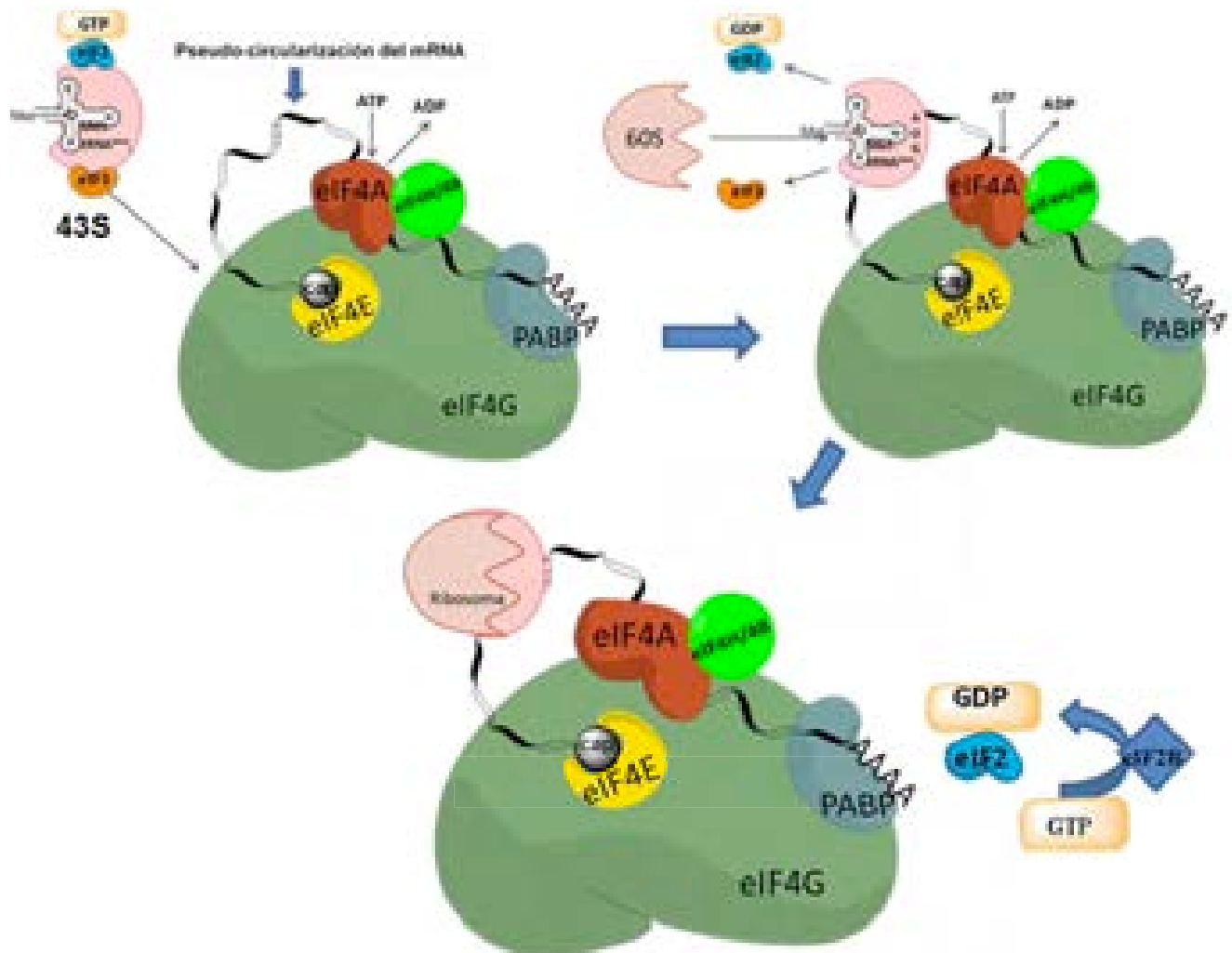


Figura 3. Inicio de la traducción. La proteína PABP se une al tracto poliadenilado mientras que eIF4E se une al cap del mRNA (Pseudo-circularización del mRNA). Por otro lado, el complejo 43S se une a eIF4G para poder llevar a cabo el escaneo del codón de inicio. Una vez encontrado el codón de inicio, se produce el ensamblaje del ribosoma 80S y la liberación de GDP-eIF2, donde GDP es intercambiado por GTP en una reacción dependiente de eIF2 para dar paso al reinicio (Sonenberg et al., 1979; Gingras et al., 1999b; Pestova y Hellen, 2000; Preiss y Hentze, 2003; Schneider y Mohr, 2003; Mohr, 2006).

2.4 Traducción independiente de cap

El mecanismo de traducción cap-independiente o de entrada interna del ribosoma fue observado por estudios realizados en los virus de la encefalomiocarditis (ECMV) y poliovirus, ambos de la familia picornavirus (Jang et al., 1988; Pelletier y Sonenberg, 1988; Pacheco y Martinez-Salas, 2010). En este mecanismo se sugiere que el IRES recluta a la subunidad ribosomal 40S prescindiendo parcial o totalmente de factores canónicos de inicio de la traducción.

En el inicio de la traducción vía cap-independiente pueden suceder tres cosas: 1. un mRNA con IRES puede traducirse sin la participación de factores de inicio de la traducción, como ocurre con los mRNAs del virus de la parálisis del grillo (Jan y Sarnow, 2002), 2. Pueden requerirse algunos de los factores de inicio canónicos o 3. Pueden utilizar proteínas celulares que actúan como cofactores o estimulantes de la traducción denominados factores transactivadores de IRES (ITAFs) (Belsham y Sonenberg, 1996; Andino et al., 1999; Lewis y Holcik, 2008).

Los IRES de picornavirus se han clasificado de acuerdo a su grado de similitud, algunos de estos pueden requerir de uno u otro factor de inicio de la traducción, por ejemplo, aquellos IRES del tipo I (enterovirus) y los de tipo II (cardiovirus) requieren los factores eIF4G, eIF4A, eIF2 y eIF3; pero no a eIF4E, eIF1 o eIF1A. Otro tipo de estructuras que tienen funciones reguladoras en los mRNAs de picornavirus son los trectos polipiridínicos, en el caso del virus de la enfermedad pies y boca (FMDV), en los que la proteína de unión a tracto polipiridínicos (PTB) y la proteína Ebp-1 ejercen un efecto regulador en los mensajeros de este virus (Pacheco y Martinez-Salas, 2010).

Los mRNAs que codifican para proteínas de recuperación de estrés celular también presentan estructuras IRES (Fernandez et al., 2002; Kim y Jang, 2002), y existen algunos mRNAs que tienden a traducirse en condiciones en que la vía cap-dependiente está inhibida, un ejemplo de lo anterior es el mRNA que codifica para la ornitina descarboxilasa (Pyronnet et al., 2000).

2.5 Factores eIF4E y eIF4G como blancos de control traduccional

eIF4E y eIF4G son un importante blanco de control traduccional [Revisado en (Richter y Sonenberg, 2005)]. eIF4E es el factor menos abundante en relación a los otros factores de inicio de la traducción que conforman a eIF4F, por lo que es un elemento limitante para la formación del complejo de inicio de la traducción. Se han propuesto tres mecanismos de regulación para que eIF4E esté disponible o no para formar a eIF4F (Gingras et al., 1999b; Raught y Gingras, 1999). Uno de los mecanismos de regulación de eIF4E es a través de la proteína de unión a eIF4E (4EBP), también conocida como PHAS. Se han caracterizado tres isoformas de 4EBPs denominadas 1, 2 y 3. Las cuales son consideradas represores traduccionales al unirse con eIF4E para evitar su unión con eIF4G. 4EBP1 es la más estudiada y es una fosfoproteína que al hipofosforilarse secuestra a eIF4E (Poulin et al., 1998; Gingras et al., 2001).

La proteína blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR) engloba a dos complejos proteínicos funcionales distintos que son: “mTOR complejo 1” (mTORC1) y “mTOR complejo 2” (mTORC2), el primero está formado por mTOR, raptor, mLST8, PRAS40 y DEPTOR y el segundo por mTOR, Rictor, mLST8, mSIN1, Protor, Hsp70 y DEPTOR. mTORC1 y mTORC2 señalizan dentro de la vía de PI3K/AKT (Fig. 4); mTORC1 es el encargado de fosforilar a 4EBP. La señalización de mTOR es regulada por la acción de factores de crecimiento, nutrientes y hormonas como la insulina (Burnett et al., 1998; Gingras et al., 1999b; Richter y Sonenberg, 2005; Mohr, 2006; Populo et al., 2012). El fármaco rapamicina es un conocido inhibidor de mTORC1 (la cinasa de 4EBP) y ha resultado de interés para su uso como agente terapéutico contra el cáncer (Richter y Sonenberg, 2005)

Se han identificado seis sitios de fosforilación en 4EBP1 humana *in vivo* que son: Thr-37, Thr-46, Ser-65, Thr-70, Ser-83 y Ser-112 (Fadden et al., 1997; Heesom y Denton, 1999). El orden de fosforilación de 4EBP1 es el siguiente: Thr-37 y 46; Thr-70 y finalmente Ser-65 (Gingras et al., 2001). Existen algunas discrepancias sobre cuáles son los eventos de fosforilación necesarios para evitar la unión de 4EBP1 con eIF4E. Burnett y colaboradores determinaron que los sitios Thr-36 y Thr-45 son los que bloquean la unión de ambas proteínas (Burnett et al., 1998). Sin embargo, Gingras y colaboradores

determinaron que la fosforilación Thr-37 y Thr-46 no es suficiente para evitar la unión con eIF4E, pero que si es requisito para la fosforilación de los sitios de fosforilación carboxi-terminal sensibles a niveles de suero (Gingras et al., 1999a). Heesom y colaboradores por su lado, reportaron que el sitio Ser-64 es el que produce la disociación de 4EBP1 de eIF4E (Heesom y Denton, 1999). Todos los datos anteriores sugieren que la disociación de 4EBP1 de eIF4E se da como resultado de la cadena de fosforilaciones que termina en Ser-65 y, por tanto, todos los sitios son responsables de dicha disociación.

El segundo mecanismo de regulación traduccional sobre eIF4E está determinado por su abundancia, pues la cantidad presente regula la formación de eIF4F, a mayor cantidad de eIF4E, mayor cantidad de eIF4F ensamblado (Gingras et al., 1999b). La sobreexpresión de eIF4E, de acuerdo a algunos estudios, puede causar transformación maligna de fibroblastos y células epiteliales humanas. Además, promueve la formación y aumento de tumores en ratones transgénicos, con base en estas observaciones se ha considerado a eIF4E como un sitio de regulación con potencial uso terapéutico (Holland et al., 2004; Mamane et al., 2004).

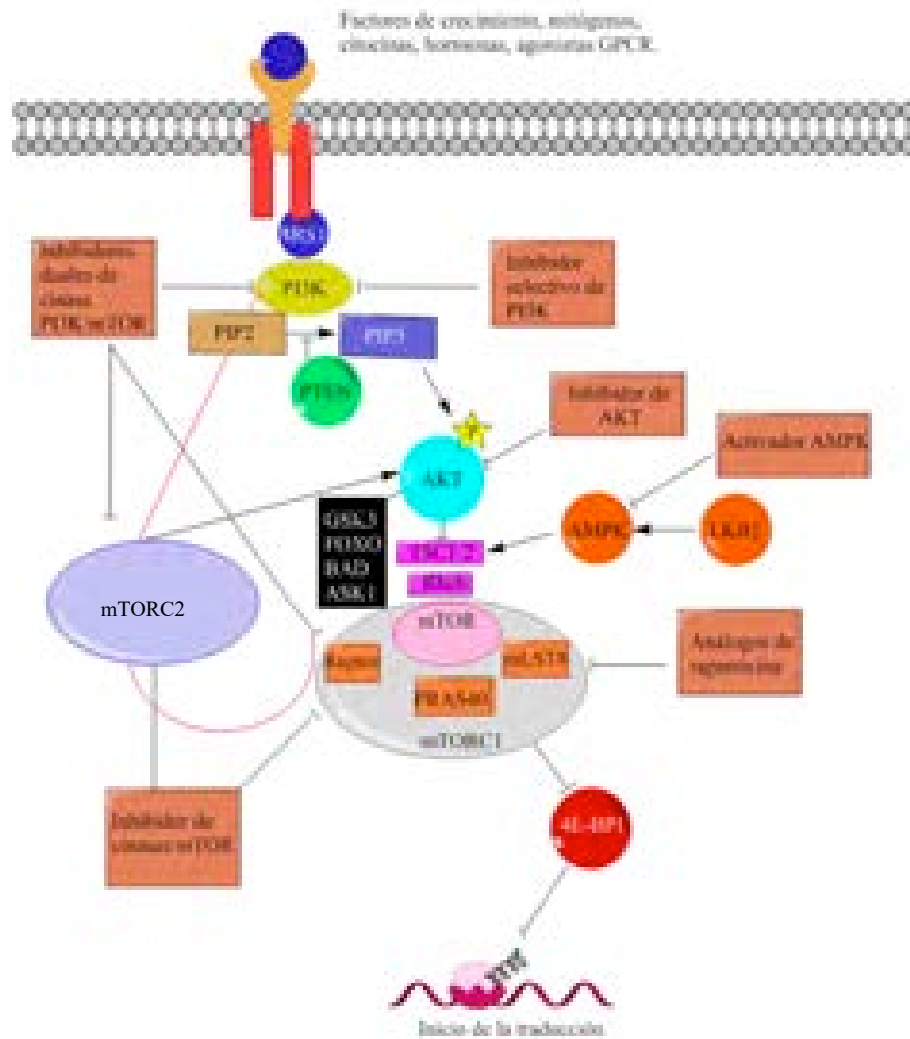


Figura 4. Vía de señalización PI3K/AKT. 4EBP es una proteína blanco de mTORC, 4EBP hipofosforilada es capaz de unirse a la proteína eIF4E inactivándola y evitando la formación del complejo eIF4F.mTORC1 fosforila a 4EBP en múltiples sitios promoviendo la disociación de eIF4E de 4EBP [Figura modificada de (Inoki et al., 2005; Hernandez-Aya y Gonzalez-Angulo, 2011; Populo et al., 2012)]

eIF4E también puede ser fosforilado y su fosforilación *in vivo* depende de la interacción de eIF4E con eIF4G debido a que eIF4G es quien posee un sitio de anclaje para MNKI, la cinasa de eIF4E. Estímulos como hormonas, factores de crecimiento y mitógenos provocan la fosforilación de eIF4E. En general, la fosforilación de eIF4E se correlaciona con el incremento de la traducción, de manera contraria a lo que ocurre con

situaciones de estrés celular como el generado por agentes químicos como el arsenito y la anisomicina (Gingras et al., 1999b; Pyronnet et al., 1999). PP2A es una fosfatasa de serina/treonina que posee un efecto regulador sobre eIF4E. PP2A defosforila a eIF4E y MNKI, regulando de manera negativa la formación de eIF4F. Si PP2A se inhibe, se incrementa eIF4E en su estado fosforilado y, como consecuencia, incrementan los niveles de eIF4F. Datos experimentales han demostrado que la regulación negativa que ejerce PP2A sobre eIF4E, produce reducción de proteínas oncogénicas como Mcl-1 y Myc. Por lo que, se plantea como un punto terapéutico crucial en la supresión de tumores (Li et al., 2010).

eIF4G se ha descrito como una proteína clave en el inicio de la traducción cap-dependiente. Como se mencionó anteriormente, eIF4G sirve de andamio para las proteínas PABP, eIF4E, eIF4A, eIF1 y eIF5. Estructuralmente, en el primer tercio de la secuencia total de aminoácidos de eIF4G se encuentran los sitios de unión de PABP (132-160) y eIF4E (570-582), en el tercio medio se encuentra el primer sitio de unión de eIF4A (672-970) y eIF3 y, en el primer tercio de la región C-terminal se encuentra la segunda región de unión de eIF4A (1201-1411) y MNKI (1411-1600) (Fig. 5) (Fujita et al., 2009).

eIF4G posee dos isoformas: eIF4GI y eIF4GII, ambas poseen cierto grado de identidad (46%) y en condiciones *in vitro* pueden intercambiar funciones. En células HeLa, la isoforma eIF4GII se encuentra en menor proporción que eIF4GI y es sólo el 15% del total de ambas isoformas (Gradi et al., 1998a). eIF4GI y eIF4GII también reclutan a MNKI y MNKII que son dos cinasas que en asociación con eIF4G (Gingras et al., 1999b; Mohr, 2006) fosforilan a eIF4E en la serina 209, este proceso de fosforilación es un proceso regulatorio que aún no está del todo descrito (Schneider y Mohr, 2003). Se ha determinado que eIF4GII puede ser hiperfosforilado durante la mitosis en donde la vía cap-dependiente está inhibida. Sin embargo, el mecanismo no ha sido del todo esclarecido (Pyronnet et al., 2001), e *in vitro* puede ser fosforilada por PKA, PKC, cinasa II activada por proteasas (Gingras et al., 1999b) y por MNKI (Pyronnet et al., 1999). Las investigaciones de Sonenberg y colaboradores encontraron que durante la diferenciación celular, eIF4GII es reclutado preferentemente al complejo eIF4F, lo que sugiere que su

participación podría ser para la traducción de mRNAs indispensables en dicho proceso (Caron et al., 2004).

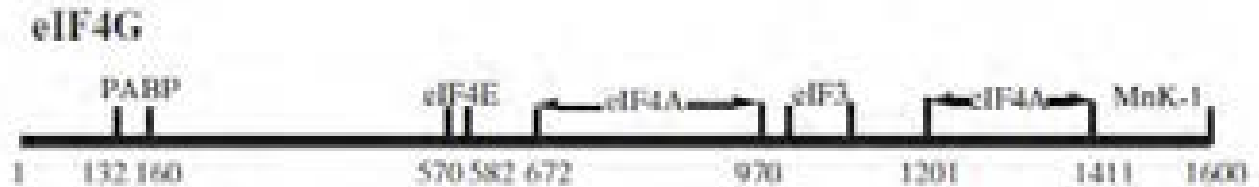


Figura 5. Sitios de unión de los factores de iniciación en eIF4G. [Modificado de (Fujita et al., 2009)]

2.6 Los virus regulan el inicio de la traducción a través de eIF4E y eIF4G

Los virus son parásitos intracelulares obligados que no poseen todos los componentes indispensables para su replicación. Por esta razón hacen uso de la maquinaria celular de síntesis de proteínas para sintetizar sus propias proteínas, es por lo anterior que han desarrollado mecanismos para asegurar la traducción de sus mRNAs, la regulación traduccional celular se lleva a cabo, principalmente, durante la iniciación [Revisado en (Schneider y Mohr, 2003; Jackson et al., 2010)]. Por lo tanto, las estrategias utilizadas por los virus están enfocadas en controlar esta fase [Revisado en (Walsh y Mohr, 2011)]. A continuación, mencionaremos de manera breve algunos de los mecanismos empleados por los virus.

eIF4E es regulado de forma negativa durante la infección por EMCV, en el que la proteína 4EBP1 es defosforilada, permitiendo el secuestro de eIF4E e inhibiendo la síntesis de proteína celular vía cap-dependiente. Sin embargo, los mRNAs de este virus poseen IRES que les ayuda a traducirse de manera eficiente sin la necesidad del complejo eIF4F (Vagner et al., 2001; Jang, 2006). La infección de células HeLa por virus de la estomatitis vesicular es otro ejemplo, de acuerdo a Connor y colaboradores, eIF4F se altera a través de la defosforilación de 4EBP, que promueve la disolución de la unión

eIF4E-eIF4G y, al mismo tiempo, deshace la unión de eIF4G con MNKI, lo cual disminuye la síntesis de proteína celular pero no la viral (Connor y Lyles, 2002).

Algunos virus pueden promover la formación del complejo eIF4F, regulando positivamente a eIF4E. La proteína ICP0 del virus del herpes simple (HSV-1) favorece la degradación de 4EBP1 vía proteosoma, evitando el secuestro de eIF4E y a pesar de que la formación del complejo eIF4F se ve favorecida, se observa un aumento en la traducción de los mRNAs virales *versus* los mRNAs celulares. El mecanismo por el que esto ocurre no es totalmente conocido. Sin embargo, el pool de mRNAs celulares disminuye durante la infección, dando la posibilidad de que la eficiente síntesis de proteína viral sea por la abundancia de mRNAs virales por encima de los mRNAs celulares (Walsh y Mohr, 2004). También se ha reportado que en condiciones en las que mTORC se encuentra inhibido por agentes químicos, por depleción de raptor mediante un RNA de horquilla pequeña o mutaciones que impedían la fosforilación de 4EBP, HSV-1 es capaz de activarse durante su ciclo de latencia/lisis y de emplear a mTORC como un sensor para detectar cambios en el ambiente y regular su propio ciclo de latencia/lisis (Kobayashi et al., 2012).

Kudchodkar y colaboradores observaron que citomegalovirus bajo condiciones de hipoxia, rapamicina o ambas condiciones, es capaz de fosforilar a efectores río abajo de mTORC. Además, observaron que 4EBP no impedía la unión de eIF4E con eIF4G, sino que las tres proteínas permanecían unidas (Kudchodkar et al., 2004), lo anterior parece indicar que citomegalovirus es un ejemplo de regulación positiva de eIF4E con el propósito de promover la formación del complejo eIF4F.

En cuanto a eIF4G, algunos virus como poliovirus, rinovirus y coxsackievirus tienen codificada una proteasa conocida como 2Apro que corta de forma específica a los factores eIF4GI, eIF4GII y PABP, esto inhibe la traducción cap-dependiente mientras que, la traducción de los mRNA virales se lleva a cabo de manera dependiente de IRES (Ventoso et al., 1998; Schneider y Mohr, 2003). El estudio de la regulación traduccional durante las infecciones con estos virus, aportaron conocimientos importantes como el hecho de que la inhibición de la síntesis de proteínas celulares durante la infección, correlaciona con el corte proteolítico de eIF4GII y no de eIF4GI (Gradi et al., 1998b).

2.7 Virus sincitial respiratorio

El VSR es un virus envuelto con genoma de RNA de cadena sencilla, este genoma no está segmentado y es de polaridad negativa (Fig. 6) (Cowton et al., 2006). Tanto el genoma como el antigenoma no contienen cap ni tracto poliadenilado. Del genoma se transcriben 10 mRNAs que poseen cap, poli A y están flanqueados por secuencias conservadas y poseen una región intergénica que puede variar en longitud y secuencias (Bermingham y Collins, 1999; Harmon y Wertz, 2002; Moudy et al., 2004). El transcripto que codifica para la proteína M2 es bicistrónico (M2-1 y M2-2) y los demás son monocistrónicos, todo esto da un total de 11 proteínas virales. Bermingham y Collin sugieren que la proteína estructural M2-2 pudiera tener efectos regulatorios positivo en la replicación y regulatorios negativos en la transcripción de este virus (Bermingham y Collins, 1999).



Figura 6. Esquema del genoma de VSR. Los 10 genes virales están indicados en el orden que les corresponde [Figura modificada de (Kim y Chang, 2016)]

2.7.1 Proteínas virales

La enzima encargada de la transcripción de los mRNAs virales es una RNA polimerasa dependiente de RNA, que se encuentra constituida por 5 proteínas que son: proteína L (250 kDa), proteína N (42 kDa), glicoproteína F (68-70 kDa), proteína M2-1 (22 kDa) y proteína P (27-35 kDa) (Tran et al., 2007); estas también poseen actividad de poliadenilación y de capping (Barik, 1993; Hardy y Wertz, 1998; Ghildyal et al., 1999; Liuzzi et al., 2005; Radhakrishnan et al., 2010; Collins y Melero, 2011; Noton et al., 2012).

La proteína G tiene un peso molecular de 90 kDa en su forma madura y en su forma de polipéptido precursor tiene un peso de 32 kDa, esta forma precursora sufre una serie de modificaciones postraduccionales como la glicosilación. Finalmente, la proteína G debe su peso más que nada a los residuos de azúcar que tiene ligados (Ghildyal et al., 1999; Zlateva et al., 2005).

El VSR codifica en su genoma sólo para dos proteínas no estructurales: NS1 (13.8 kDa) y NS2 (14.7 kDa), las cuales se les ha atribuido la función de regular la respuesta celular de interferón (Weber et al., 1995; Evans et al., 1996; Bitko et al., 2007b). La proteína de matriz o proteína M (28-29 kDa) juega un papel importante en el ensamblado del virus a través de interacciones con la nucleocápside y la envoltura de glicoproteínas en el citoplasma (Ghildyal et al., 2005; Radhakrishnan et al., 2010). SH es una proteína que en las cepas A2 se encuentra como SH0, SHg, SHp y SHt. SH0 es la forma no glicosilada, con un tamaño de 7.5 kDa, SHg tiene un tamaño de 13 a 15 kDa y está N-glicosilada; esta última es el precursor de SHp que va de 21 a 40 kDa y, SHt con un tamaño de 4.8 kDa es una forma trunca de SH0 cuando se inicia la traducción en el segundo codón de inicio de la secuencia SH (Fuentes et al., 2007).

2.7.2 Ciclo replicativo

El ciclo replicativo de VSR comienza con la unión de la proteína G a un receptor celular aún no identificado. Posteriormente, la proteína F incorpora al virus en la membrana celular para que la nucleocápside pueda ser liberada dentro de la célula huésped. Los mRNAs virales se acumulan a partir de las 15 hpi y luego permanecen constantes, permitiendo la replicación viral y el subsecuente ensamblaje viral. El gen M2-2 permite la transición entre la transcripción y la producción de RNA genómico. La proteína M y la proteína G, situadas en la membrana del aparato de Golgi, interactúan en un dominio de seis aminoácidos de sus dominios citoplasmáticos terminales y, por otro lado, las proteínas F y G interactúan entre sí a través de sus dominios citoplasmáticos y la proteína M2-1 interactúa con la proteína M. A través de estas interacciones, la proteína M puede coordinar el ensamblaje de la proteína F y la proteína

G con la nucleocápside (N, P y M2-1). Finalmente, la liberación de virus ocurre en la superficie apical de la célula (Fig. 7) (Hacking y Hull, 2002).

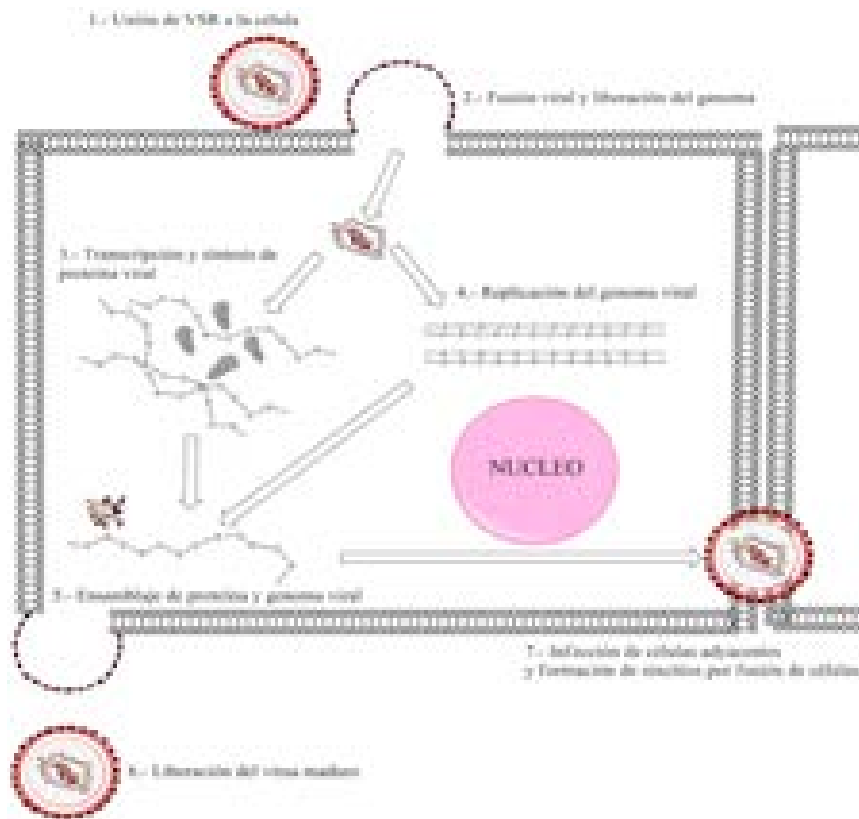


Figura 7. Ciclo replicativo de VSR. 1.-El virión se une a un receptor de la célula mediante su proteína G. 2.- La proteína F permite la incorporación del virión en la membrana y posteriormente la nucleocápside es liberada en la célula. 3.- Transcripción y síntesis de proteínas virales. 4.- Replicación del genoma viral, el gen M2-2 permite la transición entre la transcripción y la producción de RNA genómico. 5.- Ensamblaje de proteína y genoma viral, la proteína M coordina el ensamblaje de la proteína F y G con la nucleocápside (N, P Y M2-1). 6.- Liberación del virión maduro en la superficie apical de la célula (Hacking y Hull, 2002).

Un dato interesante, es que VSR puede afectar el ciclo celular de las células que infecta. Gibbs y colaboradores lograron confirmar su hipótesis de que en células del epitelio pulmonar infectadas con VSR, se induce la síntesis del mRNA de TGF- β con secreción de esta citosina al medio extracelular, produciéndose un arresto del ciclo celular en las células del epitelio pulmonar a través de un efecto autócrino de TGF- β . El mismo grupo de investigación experimentó con líneas A549 (cáncer de pulmón) y PHBE (cultivo primario bronquial), las cuales fueron infectadas con VSR, las primeras siguieron un arresto G0/G1 y las segundas un arresto G2/M. Esta diferencia puede estar marcada por

la naturaleza inmortal de las primeras (Gibbs et al., 2009). El efecto de arresto del ciclo celular pudiera beneficiar a VSR evitando la reorganización del aparato de Golgi y el retículo endoplasmático que ocurre durante la división celular y la citocinesis, ya que esto produce interferencia con la replicación viral y el reclutamiento de ciertos complejos necesarios para VSR (Wu et al., 2011).

2.8 Síntesis de proteínas durante la infección por VSR

Ha sido reportado que este virus no provoca la inhibición de síntesis de proteína celular durante la infección. Sin embargo, este estudio fue realizado a las 24 horas post-infección (Levine et al., 1977). Dubovi y colaboradores, observaron mediante marcaje metabólico que en células infectadas con VSR y tratadas con actinomicina D, un inhibidor de la transcripción celular, no había efecto de disminución en la síntesis de proteína viral. En otro estudio realizado en diversas líneas celulares infectadas con VSR o no y tratadas con altas concentraciones de NaCl, condiciones que inhiben la reiniciación, la traducción de los mRNAs de VSR es eficiente, al contrario de los mRNAs celulares (Bernstein y Hruska, 1981). VSR puede inducir la activación de caspasas a tiempos tardíos de la infección, dependiendo de la línea celular (Kotelkin et al., 2003). Las caspasas se han asociado a la modificación de factores traduccionales de iniciación con la consecuente inhibición de la síntesis de proteínas (Bushell et al., 2000; Groskreutz et al., 2010). Groskreutz y colaboradores, sugieren que VSR puede impedir la fosforilación de la subunidad eIF2 α , debido a la unión de la proteína N con PKR (proteína cinasa activada por RNA). Esta cinasa es activada durante la infección por VSR y al mismo tiempo ocurre un incremento de la asociación de la fosfatasa PP2A, que tiene como sustrato a eIF2 α , lo anterior permite que la célula infectada prosiga con la síntesis de proteínas celulares y virales (Groskreutz et al., 2010). La fosforilación de la subunidad eIF2 α debido a diferentes cinasas (HRI, PERK, PKR y GCN2) bajo condiciones de estrés, genera la aparición de cuerpos citoplasmáticos llamados gránulos de estrés que están formado por factores de inicio de la traducción y mRNAs estancados, siendo la aparición de estas estructuras condiciones arremetidas de la síntesis de proteína celular (Buchan y Parker, 2009; Lindquist et al., 2011). En conjunto, estos datos sugieren que puede existir una regulación a nivel traduccional que puede estar variando a lo largo del ciclo replicativo.

3. JUSTIFICACIÓN

Los virus son patógenos intracelulares obligatorios que necesitan de la maquinaria de síntesis de proteína de la célula, ya que ellos no cuentan con los elementos necesarios para replicarse. La célula ha desarrollado mecanismos para evitar que la replicación viral prosiga, como la inducción de apoptosis, el arresto de su propia síntesis de proteína, entre otros sucesos. A la par, los virus también han desarrollado estrategias para contrarrestar la respuesta celular antiviral.

Hasta el momento no se conoce cómo VSR es capaz de modificar los componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas. En esta investigación, se propone analizar algunos de los factores claves del inicio de la traducción durante la infección por este virus, lo que ayudaría a conocer más aspectos de su biología molecular, su patogénesis, así como posibles blancos para su control y tratamiento. Debido a que VSR es un virus que afecta a población infantil y adulta, y además tiene una alta mortalidad en adultos mayores e inmunocomprometidos, es importante realizar este tipo de investigaciones en beneficio de la salud de la población.

4. HIPÓTESIS

El VSR altera algunos factores de inicio de la traducción en las células que infecta con el propósito de favorecer la síntesis de sus propias proteínas. A lo largo de la infección, VSR genera condiciones intracelulares que modifican a eIF4E y eIF4G, factores que han sido señalados como puntos clave en el proceso del inicio de la traducción, lo anterior significaría el arresto de la traducción cap-dependiente. Sin embargo, VSR cuenta con estrategias que le permiten la síntesis eficiente de sus propias proteínas a pesar de estas condiciones adversas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar cómo se lleva a cabo la regulación traduccional en células infectadas por VSR, a través de eIF4E y eIF4G.

5.1.2 Objetivos particulares

- 1) Evaluar a la proteína eIF4E a través del estado de fosforilación de su proteína reguladora 4EBP en células infectadas con VSR.
- 2) Evaluar la integridad de la proteína eIF4G en células infectadas por VSR.
- 3) Determinar si existe un cambio en el patrón de síntesis de proteínas a lo largo del ciclo replicativo de VSR.
- 4) Analizar la localización intracelular de las proteínas eIF4E y eIF4G.
- 5) Evaluar la eficiencia de la replicación de VSR en condiciones en las que eIF4E y eIF4G no son funcionales.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Propagación de VSR en cultivos celulares

Se realizó la infección en las células HEp-2 (Sublínea de células HeLa y derivadas de un cáncer cervical (Masters, 2002)), A549 (carcinoma humano alveolar basal epitelial) y VERO (riñón de mono verde) cultivadas cada una en frascos de 75 cm² a una confluencia de entre el 70% y el 80%. El virus utilizado fue VSR cepa long, amablemente proporcionado por la Dra. Beatriz Gómez García de la Facultad de Medicina de la UNAM. El procedimiento consistió en tomar 1.5 ml del stock de VSR que se aforó a 15 ml con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco™; No de catálogo 12800017), de esta última dilución se tomaron 5 ml para adicionar a cada uno de los cultivos de las líneas celulares ya mencionadas. Posteriormente, se dejó absorber el virus en los cultivos celulares durante 2 horas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y con una ligera agitación de los frascos en lapsos de 30 minutos. Finalmente, se retiró de los cultivos los 5 ml de la alícuota, se adicionaron 12ml de DMEM con 2% de SFB (ATCC®, No de catálogo 30-2020) como medio de mantenimiento y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Los cultivos infectados se observaron diariamente hasta la aparición de efecto citopático y evitando la acidificación del medio durante el periodo de incubación con una solución de NaHCO₃ al 20% p/v. Posteriormente, se rasparon los restos adheridos de la monocapa y se colectaron los volúmenes de los frascos para ser sonicados durante 15 minutos, esto con el propósito de liberar a los viriones que aún permanecieran en los restos celulares, inmediatamente se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos y a una temperatura de 4 °C, el sobrenadante se colectó y se le adicionó MgSO₄ a una concentración final de 0.1 M como conservador. Los stocks fueron alicuotados y rotulados como VSR/HEp-2 y VSR/VERO y almacenados a -70 °C hasta su uso. Posteriormente, las propagaciones sólo se hicieron en células HEp-2 y se realizó una modificación en la técnica, sustituyendo la sonicación por la criofractura de la monocapa a -20 °C y con la previa adición de la solución MgSO₄ con posterior centrifugación. Además, se usó NaHCO₃ al 20% p/v para controlar el pH del medio de cultivo.

6.2 Ensayo en placa para la cuantificación de partículas infecciosas

Se cultivaron células Hep-2 en cajas de 6 pozos con DMEM 10% SFB y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂, estas células se trabajaron al 100% de confluencia en cada uno de los pozos. Se prepararon diluciones seriadas del stock viral de VSR, siendo éstas 10, 100, 1000, 10,000, 100,000 y un control de células sin infectar con DMEM sin SFB y a volúmenes finales de 900 µl, posteriormente se retiró el medio de todos los pozos y se agregaron los 900 µl de cada dilución a su respectivo pozo, el sexto pozo se llenó con 900 µl de DMEM sin SFB. Se incubó la caja durante 2 horas a 37 °C en atmósfera de CO₂, para permitir la absorción del virus en los pozos con células. Después, se retiraron las diluciones del virus. Con anterioridad se prepararon 21 ml de una solución de agarosa al 0.6% diluida en DMEM sin SFB, sin antibióticos y sin NaHCO₃ esterilizada en autoclave y, en el momento, se preparó 21 ml de una solución con 400 µl de glutamina 50X, 210 µl de penicilina 10000 µL/ml y 21 µl de gentamicina-anfotericina B (ATCC No. de catálogo PCS-999-025), posteriormente, se fundió la agarosa en condiciones estériles y se dejó enfriar hasta 42 °C, momento en el cual se retiró el inóculo de los pozos y el control, se mezcló la agarosa con la segunda solución junto con unas gotas de NaHCO₃ al 20% hasta el cambio del color de la mezcla a rojo e inmediatamente se dispensaron 3 ml a cada pozo, finalmente se incubó la caja a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ hasta los 3 o 4 días o hasta los 6 o 7 días que son los periodos en que se ha reportado que las placas de lisis son visibles (McKimm-Breschkin, 2004). Pasado este tiempo, se retiró la agarosa de los pozos, se fijaron las células con 1 ml de metanol absoluto por pozo durante 1 minuto, se retiró el metanol y se tiñeron las células con una solución al 0.1% p/v de cristal violeta en etanol al 20% v/v durante 5 minutos, finalmente se cuantificaron las placas de lisis en la dilución que queda a criterio del analista. La unidad utilizada fue UFP/ml (Unidad Formadora de Placas por ml) y para calcularlo se utilizó la fórmula: $UFP = [\# \text{ de placas/volumen inoculado}] \times \text{factor de dilución}$.

6.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y western blot

Los cultivos infectados o no, fueron lisados durante 15 minutos con un buffer de lisis en frío (NAF 2.5 mM, Na₃VO₄ 0.1 Mm, Tris pH (7.4) 5 mM, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, ditioneitol 0.1 mM, glicerol 1% y Triton™ x-100 0.1%) y suplementado con mezcla de inhibidores de proteasas libre de EDTA con 75 µl por pozo de una caja de 48 pozos, para ser lisados con un volumen adecuado de buffer Laemmli 3X (5 ml de SDS 10%, 3 ml de glicerol, 1.5 ml Tris (pH 8.8) 2 M, 0.025% de Azul de bromofenol y complementado con 5% de β mercaptoetanol) para obtener una concentración final de 1X. La desnaturalización de proteínas se obtuvo por ebullición a 100 °C durante 5 minutos y se conservaron a -20 °C. Las muestras fueron corridas en una electroforesis de gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 15 ó 10%. A continuación, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a 200 mA por 40 minutos a 1 hora. La membrana se bloqueó con una solución de leche al 5% en PBS-Tween 20 durante toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: conejo anti-4EBP1 fosforilado (Thr37/46) (Cell Signaling Technology, No de catálogo 2855) a una dilución de 1:1000 y conejo anti-4EBP1 (Cell Signaling Technology, No de catálogo 53H11) a una dilución de 1:1000, seguido por la incubación con anticuerpo cabra anti-conejo IgG peroxidasa (Cell Signaling Technology, No de catálogo 7074) a una dilución de 1:3000. Para el estudio de eIF4G, las membranas de nitrocelulosa se incubaron con los anticuerpos conejo anti-eIF4G1 (Abcam, No de catálogo AB47625) a una dilución de 1:1000 seguido por la incubación con anticuerpo cabra anti-conejo IgG peroxidasa (Cell Signaling Technology, No de catálogo 7074) a una dilución de 1:3000.

Todos los anticuerpos fueron preparados en una solución de leche al 1% en PBS-Tween 20, los anticuerpos primarios se incubaron durante una hora, después de 3 lavados con PBS-Tween 20 se incubaron los anticuerpos secundarios y se quitaron los excesos con 3 lavados con PBS-Tween 20. Como control de carga para cada análisis, se realizaron SDS-PAGE al 15% o al 10% de los lisados celulares a analizar y se ajustaron las cargas de las muestras por tinción de Coomasie, los SDS-PAGE se repitieron hasta obtener una carga homogénea de nuestras muestras en cada carril.

6.4 Marcaje metabólico

Las células fueron cultivadas y crecidas en placas de 48 pozos, e infectadas a una MOI de 5 con VSR como se describió anteriormente. A diferentes tiempos post-infección, el medio de cultivo fue remplazado por MEM carente de metionina y suplementado con 40 $\mu\text{Ci/ml}$ de mezcla de marcaje Easy-tag Express- ^{35}S] (Dupont, NEN) y mantenido a diferentes periodos de tiempo. La carga de proteína se resolvió en SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomasie. El gel de poliacrilamida se sometió a autoradiografía.

6.5 Tratamiento con rapamicina

Se cultivaron células HEp-2 en cajas de 24 pozos y se trabajaron a confluencia del 100%. Se realizó una infección a una MOI de 3 con VSR, el virus fue absorbido 2 horas a 37°C en una atmósfera de 5 % de CO_2 y agitados cada 30 minutos, posteriormente se retiró el inóculo del virus y se agregó DMEM suplementado con 2% de SFB y 10 nM de rapamicina (Cell Signaling Technology, No de catálogo 9904), después de las 36 hpi se adicionó MgSO_4 a concentración final de 0.1 M, se congelaron las células a -20 °C y se descongelaron. Los sobrenadantes fueron centrifugados a máxima velocidad durante 5 minutos, el pellet celular se descartó y se colectaron los sobrenadantes que fueron almacenados a -70 °C hasta su uso. Se utilizó la técnica de cuantificación en placa para medir los incrementos de placas de lisis comparando los lisados de células infectadas y sin tratamiento con rapamicina y aquellas células infectadas tratadas con rapamicina. Para la técnica de cuantificación en placa de este apartado, se usó una solución de agarosa en agua bidestilada al 3% p/v, la cual fue diluida con DMEM sin SFB y sin antibiótico para obtener una concentración final de agarosa al 0.3% p/v al momento de su uso y en el fijado de las células, se usó una solución de formaldehído al 3.65% v/v.

6.6 Inmunofluorescencia

Células HEp-2 fueron crecidas sobre cubreobjetos redondos en placas de 48 pozos y fueron infectadas a una multiplicidad de infección (MOI) de 3. Después de la incubación del virus a diferentes hpi a 37 °C en 5% de CO₂, las células se fijaron a TA con una solución de paraformaldehído al 2% en PBS durante 20 minutos y permeabilizadas a TA durante 15 minutos en una solución de PBS con 50 mM de NH₄Cl, 1% de BSA y 0.5% de Tritón-X100. Las muestras se bloquearon toda la noche en una solución de PBS con 50 mM de NH₄Cl y 1% de BSA, posteriormente se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios a una dilución de 1:50: ratón anti-PABP (Santa Cruz, No de catálogo 166027), cabra anti-VSR (Chemicon, No de catálogo AB1128), conejo anti-eIF4G1 (Abcam, No de catálogo AB47625), ratón anti-VSR amablemente donado por la Doctora Beatriz Gómez García y ratón anti-eIF4E (Santa Cruz, No de catálogo SC-9976), en solución de bloqueo a TA durante 1 hora. Los anticuerpos secundarios utilizados a una concentración de 1:500 fueron: anti-ratón Alexa 488, anti-cabra Alexa 568, anti-conejo Alexa 568, anti-ratón Alexa 568 y anti-cabra Alexa 488 (Invitrogen Corporation), los cuales se incubaron en solución de bloqueo durante 1 hora a TA. Finalmente, las células se montaron en Vectashield con DAPI (Vector Labs). Las imágenes fluorescentes se tomaron usando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i y el software NIS-Elements BR 3.2 64 bits.

7. RESULTADOS

7.1 4EBP1 es defosforilado durante la infección por VSR

En nuestros resultados pudimos observar que 4EBP1 es defosforilado en células HEp-2 infectadas con VSR a partir de las 12 horas post-infección y a 36 hpi no se observa señal de fosforilación (Fig. 8).

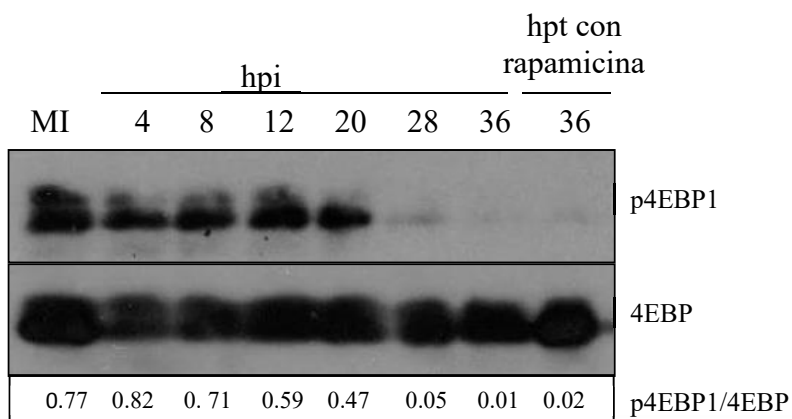


Figura 8. Defosforilación de 4EBP1 durante la infección por VSR. Células HEp-2 infectadas o no infectadas con VSR (MI) fueron lisadas y cosechadas a diferentes tiempos post-infección. El control de defosforilación de 4EBP1 consistió en células HEp-2 no infectadas tratadas con rapamicina al 10 nM durante 36 horas post-tratamiento (hpt). Se resolvió por SDS-PAGE y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Se usaron anticuerpos dirigidos contra 4EBP1 fosforilado y no fosforilado. Los niveles de proteína analizados por densitometría son mostrados en la parte final de la figura. Se muestra la imagen de un experimento representativo de 3 experimentos independientes (n=3)

7.2 La cantidad de eIF4GI disminuye durante la infección por VSR

El resultado obtenido muestra una disminución de la señal de eIF4GI a las 36 hpi y la aparición de una señal de menor peso molecular (Fig. 9).

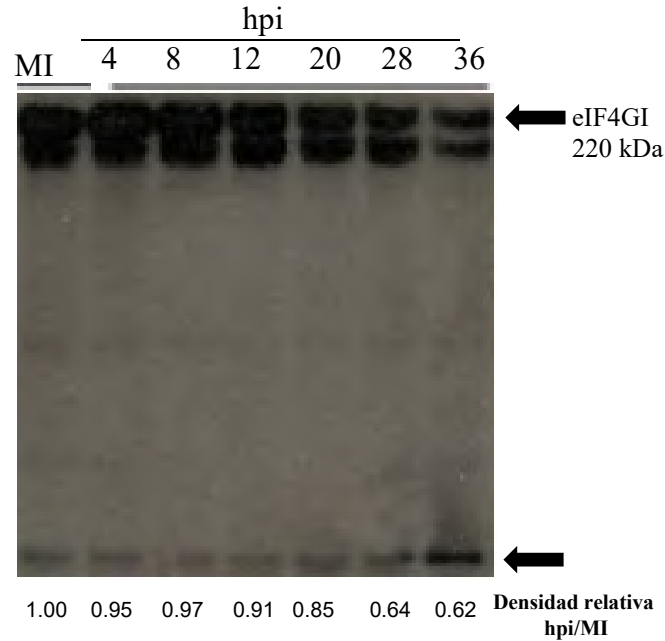


Figura 9. Disminución de la cantidad de eIF4GI durante la infección por VSR. Células HEp-2 infectadas o no infectadas con VSR (MI) fueron lisadas y cosechadas a diferentes tiempos post-infección. Las muestras se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se usaron anticuerpos dirigidos contra eIF4GI, la densitometría se reporta como nivel de eIF4GI en horas postinfección (hpi) sobre nivel de eIF4GI en células no infectadas. Se muestra la imagen de un experimento representativo de 3 experimentos independientes (n=3)

7.3 La tasa de síntesis de proteína celular disminuye un 40% durante la infección por VSR.

El resultado obtenido muestra que el patrón de síntesis de proteína es alterado durante la infección de células HEp-2, comenzando a partir de las 28 hpi y llegando a un 40% de disminución a las 32 y 36 hpi. La figura 10 muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

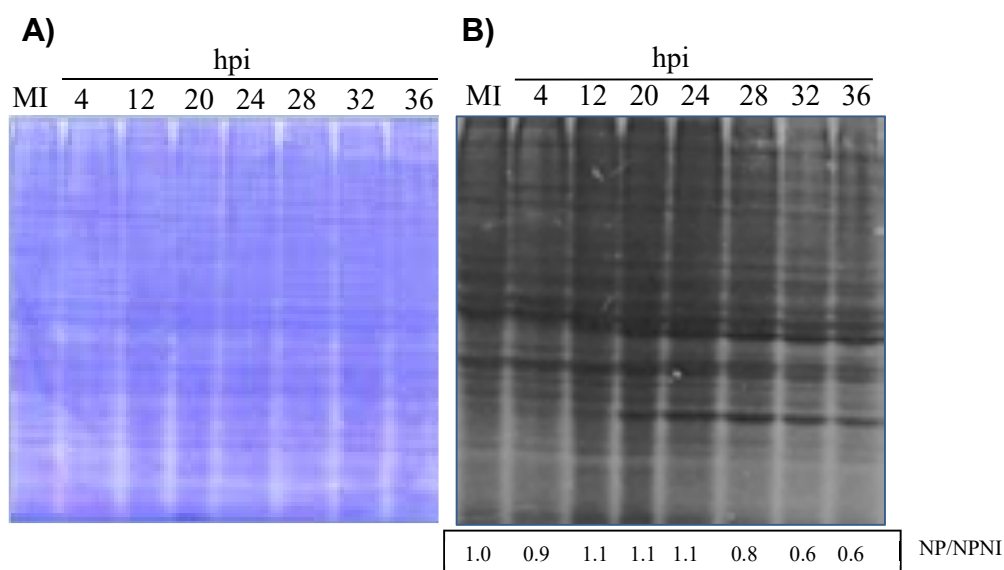


Figura 10. Reducción de la síntesis de proteínas durante la infección por VSR. Células HEp-2 no infectadas (MI) o infectadas con VSR a una MOI de 5, fueron metabólicamente radiomarcadas 2 horas antes de ser lisadas a diferentes tiempos post-infección. Las muestras fueron resueltas por SDS-10% PAGE. A) Gel teñido con coomassie, B) Autoradiografía. Los valores por densitometría muestran la proporción de proteína de cada carril *versus* el nivel de proteína de control no infectado (NP/NPI). Se muestra la imagen de un experimento representativo de 3 experimentos independientes (n=3)

7.4 La redistribución de la proteína eIF4GI en el citoplasma cambia a lo largo de la infección por VSR

Durante las primeras horas de la infección el patrón citoplasmático de eIF4GI era homogéneo en la célula, este patrón se mantuvo hasta las 20 hpi donde la señal de eIF4GI mostró la formación de agregados citoplasmáticos (Fig. 11).

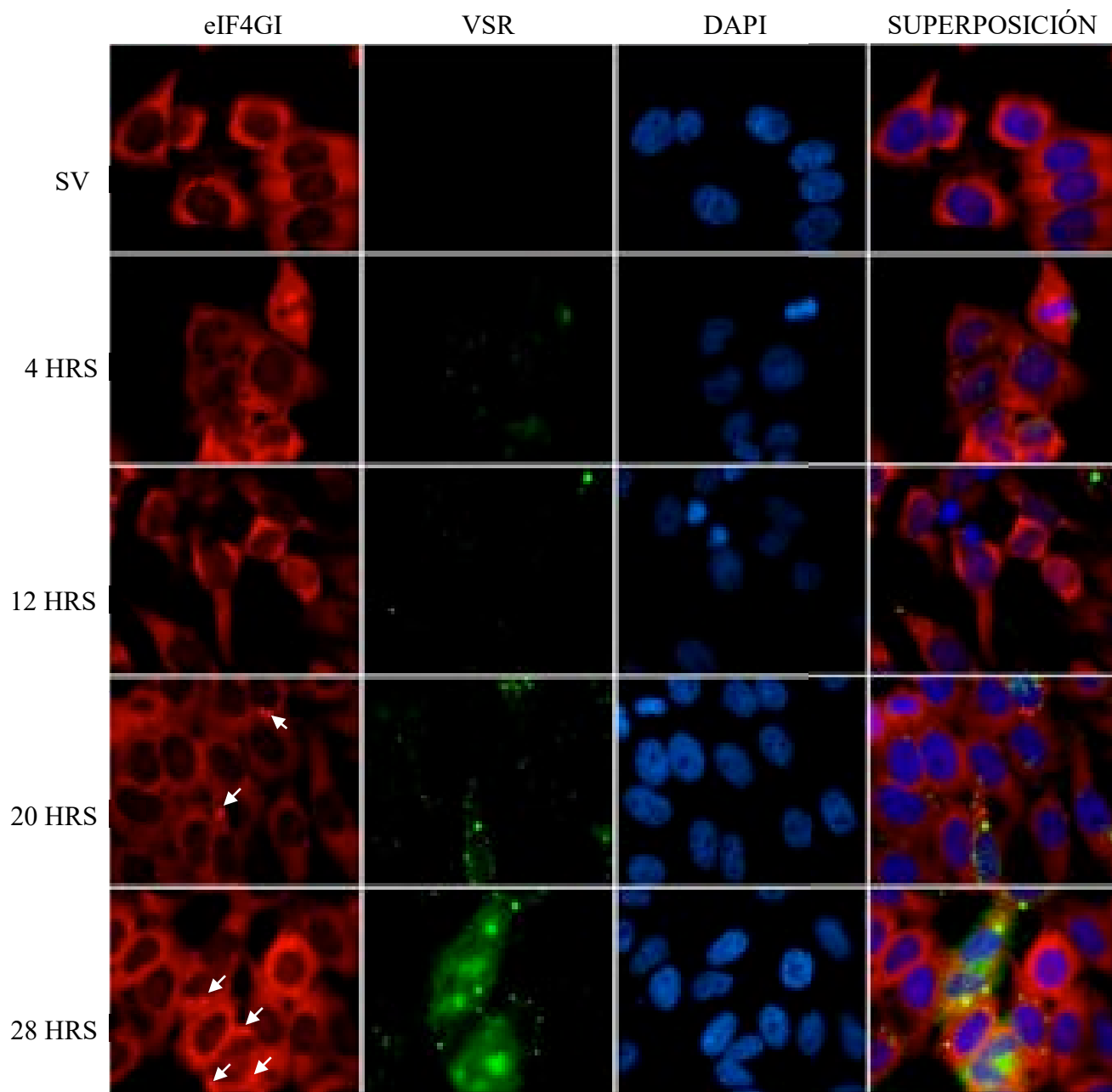


Figura 11. eIF4GI forma agregados citoplasmáticos en células infectadas con VSR. Se utilizaron anticuerpos para la detección de eIF4GI en células HEP-2 infectadas con VSR y se observó la distribución citoplasmática de esta proteína durante la infección. (Las flechas blancas señalan gránulos de estrés formados). Se muestran las imágenes de un experimento representativo de 3 experimentos independientes (n=3)

7.5 La redistribución de la proteína eIF4E en el citoplasma cambia a lo largo de la infección por VSR

Durante las primeras horas de la infección el patrón citoplasmático de eIF4E era homogéneo en la célula, este patrón se mantuvo hasta las 20 hpi, posterior a este tiempo la señal de eIF4E se observó en forma agregados citoplasmáticos (Fig. 12).

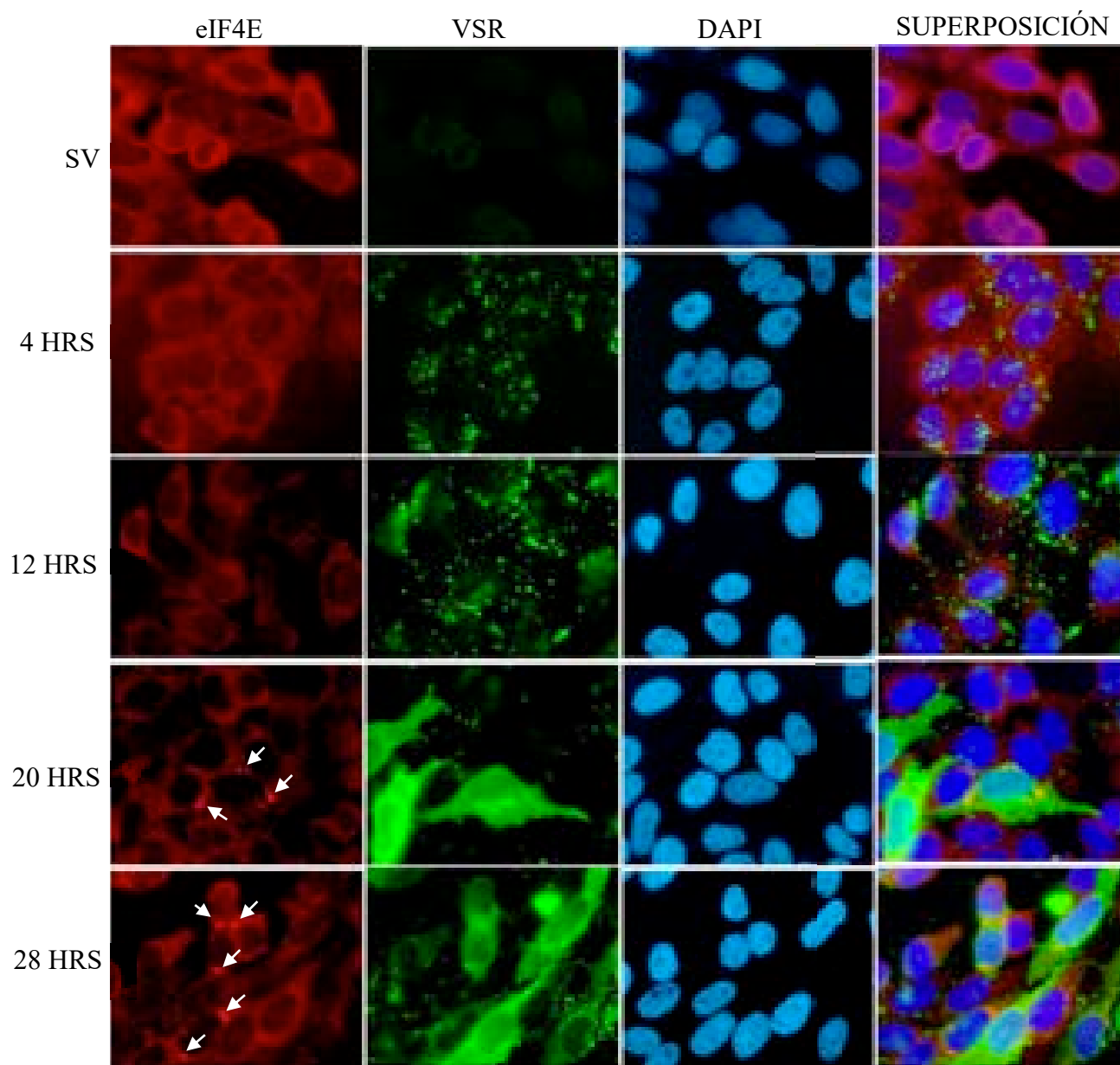


Figura 12. eIF4E forma agregados citoplasmáticos en células infectadas con VSR. Se utilizaron anticuerpos para la detección de eIF4E en células HEp-2 infectadas con VSR y observar la distribución citoplasmática de esta proteína (Las flechas blancas señalan gránulos de estrés formados). Se muestran las imágenes de un experimento representativo de 3 experimentos independientes (n=3)

7.6 La proteína PABPC es translocada al núcleo durante la infección por VSR

La distribución de la proteína PABPC mostró un patrón citoplasmático durante las primeras horas de la infección, a partir de las 20 hpi la señal mostró una localización nuclear de la proteína la cual se acentuó de manera más evidente para las 36 hpi (Fig. 13).

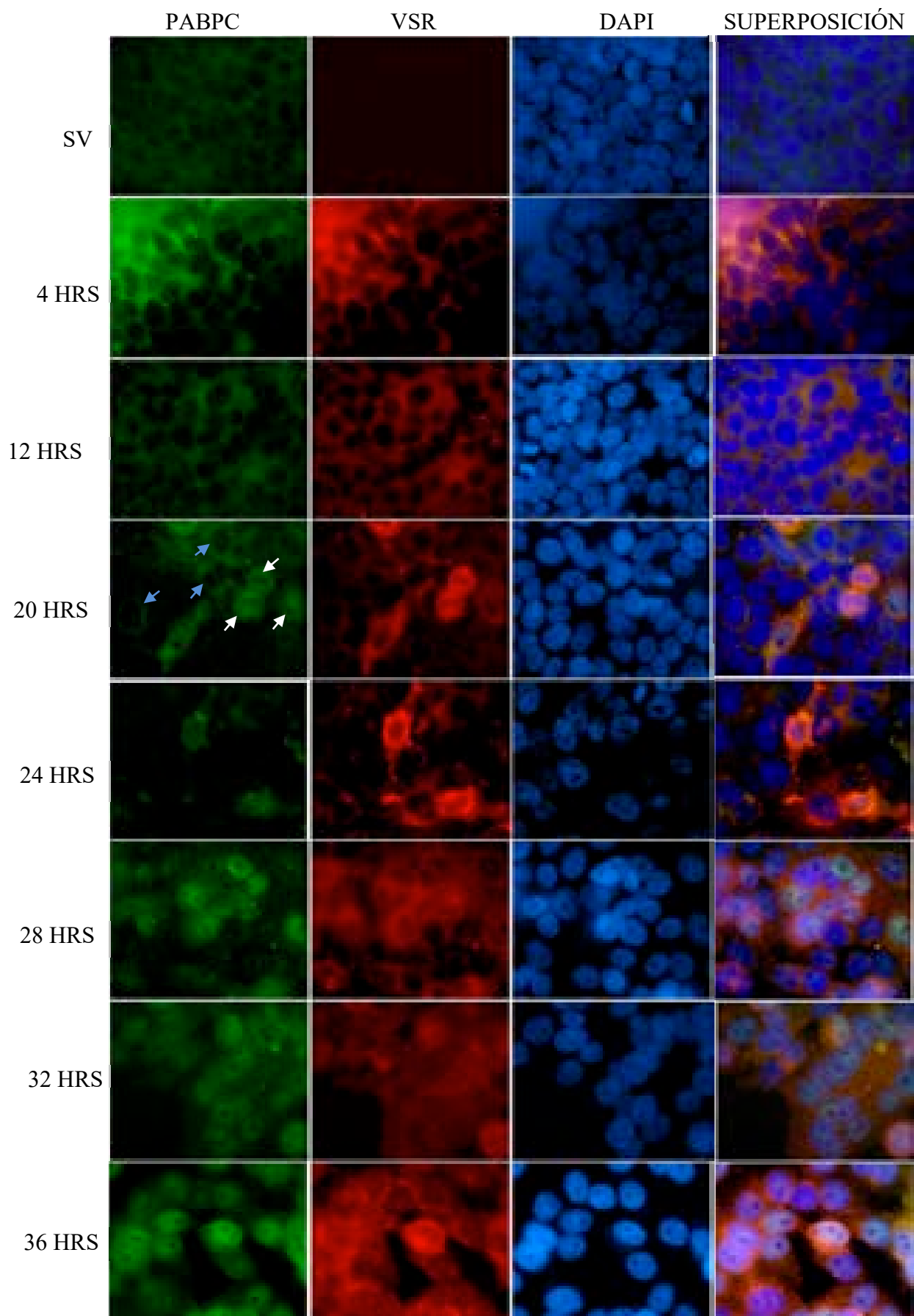


Figura 13. PABPC es translocada al núcleo durante la infección con VSR. Anticuerpos específicos contra PABPC y proteínas antigénicas de VSR se ensayaron en células infectadas a diferentes tiempos con el propósito de observar la localización intracelular de PABPC (Las flechas blancas señalan células que presentan un patrón de PABPC nuclear, las flechas azules señalan células con un patrón citoplasmático de PABPC). Se muestran las imágenes de un experimento representativo de 3 experimentos independientes (n=3)

7.7 La replicación de VSR se ve favorecida en condiciones de arresto de la síntesis de proteína celular

Dado que la rapamicina inhibe la actividad de mTORC1 y disminuye hasta el 80% de la síntesis de proteína celular (Thoreen y Sabatini, 2009), decidimos usar este fármaco en células HEp-2 infectadas con VSR. La concentración de rapamicina usada fue de 10 nM como recomienda el fabricante para trabajar con cultivos celulares. A las 36 hpi las células fueron cosechadas y almacenadas a -70°C . Los lisados obtenidos fueron utilizados para cuantificar la progenie viral por la técnica de cuantificación en placa. Las UFP/ml de las células infectadas y tratadas con rapamicina fueron comparadas contra un control de células infectadas, pero sin tratamiento con rapamicina. Las células infectadas y tratadas con rapamicina mostraron un incremento en la progenie viral en comparación con el control, los resultados mostraron un incremento de hasta 8 veces de la progenie viral (Fig. 14)

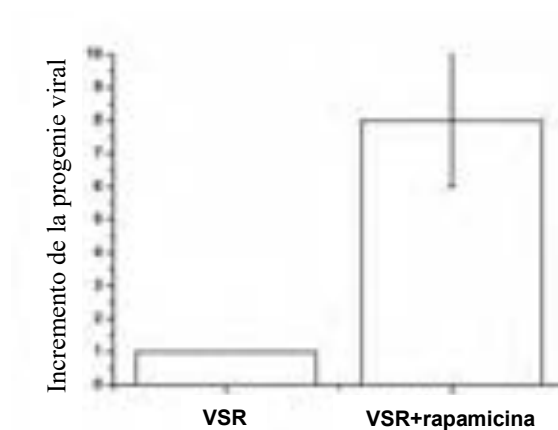


Figura 14. El tratamiento con rapamicina incrementa la progenie viral. Células HEp-2 infectadas con VSR fueron tratadas o no con rapamicina. A las 36 hpi. las células fueron cosechadas y las muestras fueron sometidas a un ensayo de cuantificación en placa para medir la progenie viral. Las medias \pm DE de 3 experimentos independientes (n=3) son mostradas.

8. DISCUSIÓN

Los virus producen condiciones intracelulares que les permite tomar el control de la maquinaria celular. Además, hacen uso de productos génicos celulares para realizar procesos como replicación de DNA y RNA, síntesis de proteínas y modificaciones postraduccionales como la fosforilación. La traducción es un proceso de la célula que puede ser usurpada por muchos virus y se divide en iniciación, elongación y terminación, de estos tres procesos, la iniciación es un proceso altamente regulado en el que intervienen más de 20 proteínas llamadas factores de inicio eucarióticos [Revisado en (Schneider y Shenk, 1987; Blackburn et al., 2011)]. El alto nivel de regulación de la iniciación sugiere que este proceso puede ser un punto clave de control para la síntesis de proteína viral en una célula infectada.

Se inició abordando esta investigación con el análisis del estado de fosforilación de la proteína 4EBP1 mediante la técnica de SDS-PAGE y western blot en la que se usó un anticuerpo específico contra la forma fosforilada y defosforilada de 4EBP1. Nuestros resultados efectivamente sugieren un estado de arresto en la síntesis de proteína de la célula hospedera tal y como lo demuestra la defosforilación de 4EBP1, evento que se ha observado en otras infecciones por ASFV y DV (Castello et al., 2009; Villas-Boas et al., 2009). Los estudios realizados con estos virus sugieren que los mRNAs virales temprano en la infección utilizan un mecanismo de traducción cap-dependiente y a tiempos tardíos lo alternan a uno cap-independiente. Es importante señalar que nuestros resultados no demuestran si estas condiciones son generadas por algún mecanismo producido por alguna proteína codificada en el genoma del virus o simplemente, la defosforilación de 4EBP1 sea producto de un estrés generado por la presencia misma del virus en la célula.

Nuestros resultados demuestran que 4EBP1 se defosforila a partir de las 12 hpi, lo que contrasta con lo reportado por de Souza y colaboradores (de Souza et al., 2016), ya que ellos observaron que VSR es capaz de estimular en linfocitos T CD8 la fosforilación de mTOR en su serina 2448, dichas observaciones se realizaron por citometría de flujo e inmunocitoquímica. La fosforilación sólo pudo ser revertida utilizando dosis bajas de rapamicina en el experimento, de Souza y colaboradores también

observaron que en células mononucleares de pacientes sanos e incubadas con VSR A, había un incremento de hasta dos y media veces en la fosforilación de 4EBP1 en comparación con células control no incubadas con el virus. Puesto que las líneas celulares y los tiempos post-infección ensayados por de Souza y los nuestros difieren, nosotros sugerimos que los efectos de fosforilación de mTOR y 4EBP1 observados por de Souza pudieran ser un efecto estimulador del suero a los 15 y 30 minutos post-infección y es que, se ha sugerido que ciertos sitios de fosforilación de 4EBP1 pudieran ser más sensibles a la estimulación por suero (Gingras et al., 1999a). En nuestro experimento, se trabajaron tiempos post-infección más tardíos, siendo el más temprano 4 hpi y el más tardío de 36 hpi, lo cual nos permitió una mayor resolución del estado de fosforilación de 4EBP1. Además, nos ayudó a descartar algún efecto residual del suero fetal bovino. Sin embargo, sería interesante trabajar con tiempos más tempranos como los sugeridos por de Souza, ya que ambos resultados pudieran sugerir la posibilidad de un incremento de la fosforilación de 4EBP1 a tiempos tempranos y decremento de la fosforilación a tiempos tardíos. Se ha reportado que 4EBP1 durante la infección por DV se encuentra fosforilado a tiempos tempranos de la infección, pero a tiempos más tardíos esta proteína es defosforilada (Villas-Boas et al., 2009). Otra observación muy interesante realizada por de Souza es que, viriones inactivados por radiación ultravioleta y proteína recombinante de fusión de VSR también produjeron activación de mTOR, lo anterior pudiera indicar que en la fase de adhesión de VSR (una fase del ciclo replicativo que debiera ocurrir a tiempos tempranos) pudiera existir un incremento de la fosforilación de 4EBP1 como consecuencia de la activación de su cinasa.

eIF4G es una proteína clave en el inicio de la traducción y es que esta proteína de andamiaje presenta sitios de unión para eIF4E y eIF4A formando el complejo de inicio de la traducción eIF4F [revisado en (Marintchev y Wagner, 2004)]. La bibliografía señala a eIF4G como blanco de corte proteolítico por parte de picornavirus (Chase y Semler, 2012) y algunos retrovirus (Ventoso et al., 2001; Alvarez et al., 2003). Actualmente no se tiene información si miembros de la familia paramixoviridae presentan los mismos mecanismos. En un primer acercamiento, en nuestro laboratorio se había abordado la caracterización de eIF4G1 durante la infección por VSR en células HEp-2, en el cual no se observó alteración de dicha proteína (Eloy y Itznier, 2012). Los resultados de Eloy contrastan con los nuestros. Además, nosotros observamos una señal de menor peso

molecular en nuestro western blot que es visible en todos los carriles y que se intensifica a las 36 hpi, dicha señal, también puede observarse en nuestro control de células no infectadas, pero esta señal es mínima y pudiera deberse a un estrés generado durante el cultivo. Un dato importante es que VSR induce la activación de caspasas a tiempos tardíos de la infección, patrón que es diferente entre algunas líneas celulares (Kotelkin et al., 2003). Las caspasas se han asociado a la modificación de factores traduccionales de iniciación, como lo es el corte catalítico de eIF4G, con la consecuente inhibición de la síntesis de proteínas (Bushell et al., 2000; Groskreutz et al., 2010). En caso de que la disminución de la señal de eIF4G en nuestros experimentos se debiera a un fenómeno de proteólisis, es desconocido si este evento es por una proteasa viral o es debido a un estrés celular provocado por la infección. Es necesario realizar más experimentos, ya que pudiera tratarse de un mecanismo no reportado para VSR.

Ya que las evidencias bibliográficas indican que la defosforilación de 4EBP1 y el corte proteolítico tienen consecuencias directas sobre la síntesis de proteína celular (Poulin et al., 1998; Bushell et al., 2000; Gingras et al., 2001; Groskreutz et al., 2010), decidimos determinar si durante el tiempo de la infección por VSR pudieran existir alteraciones en la síntesis global de proteína celular y de ser así, que existiera la posibilidad de una correlación con los tiempos en que ocurren los cambios de 4EBP1 y eIF4G. Para abordar esta problemática decidimos realizar un marcaje metabólico con metionina ³⁵S en células infectadas con VSR para evaluar la síntesis de proteínas *de novo* durante 2 horas. De manera interesante pudimos observar que la síntesis de proteína celular muestra una disminución desde las 28 hpi, con una reducción de hasta el 40% a las 36 hpi comparada con células no infectadas, lo anterior era de esperarse debido a la importancia que tiene 4EBP1 en este proceso. Sin embargo, se esperaba que dicha reducción en la síntesis de proteína celular coincidiera con los tiempos que ocurre la defosforilación de 4EBP1. A pesar de la discrepancia encontrada, todo parece indicar que la presencia de VSR en la célula huésped genera alteraciones que pudieran ser favorables para la traducción de los mensajeros virales. A diferencia de nuestros resultados, en los experimentos de Levine y colaboradores no se observaron efectos en la síntesis de proteínas de células HeLa infectadas con VSR, posiblemente debido a que analizaron tiempos más tempranos de la infección (Levine et al., 1977).

PKR es la cinasa que fosforila a eIF2 α en presencia de intermediarios de doble cadena de RNA, como consecuencia, existe un estrés celular y se forman los llamados gránulos de estrés [Revisado en (Montero y Trujillo-Alonso, 2011)]. Durante la infección por VSR pueden aparecer estos intermediarios de RNA de doble cadena. Se ha reportado que eIF4G, eIF4E y PABP pueden ser componentes de los gránulos de estrés [Revisado en (Reineke y Lloyd, 2013)]. Debido a lo anteriormente mencionado, en nuestra investigación abordamos la localización citoplasmática de eIF4G, eIF4E y PABPC (que son clave en el inicio de la traducción) en células infectadas con VSR. En nuestros experimentos de inmunofluorescencia observamos que eIF4E y eIF4G forman agregados citoplasmáticos en la célula a las 20 hpi, mientras que PABP se transloca del citoplasma al núcleo sin presentarse en agregados citoplasmáticos en las células infectadas. En nuestro laboratorio hemos observado la aparición de gránulos de estrés en células infectadas por VSR a partir de las 30 hpi, lo cual no es concordante con los tiempos a los que aparecen los agregados citoplasmáticos que forman eIF4E Y eIF4G en este trabajo, otro resultado que difiere de nuestras investigaciones es el reportado por Lindquist en 2011(Lindquist, 2011), ya que él señala la aparición de gránulos de estrés en células HEp-2 infectadas con VSR con una MOI de 1 (observados por microscopía confocal marcado las proteínas G3BP, eIF3 η , o TIA-1) a las 12 hpi con un incremento hasta las 24 hpi. Nuestros resultados sobre la redistribución de eIF4E y eIF4G en células infectadas por VSR, son muy similares a los patrones observados para células infectadas con virus vaccinia (un virus de DNA) en las investigaciones de Walsh y colaboradores (Walsh et al., 2008), en las cuales, los factores de inicio eIF4E y eIF4G se concentran en cuerpos citoplasmáticos que incluso co-localizan entre ellos en las imágenes de fluorescencia entre las 6 y 12 hpi. En dichos experimentos, también se observa DNA viral que co-localiza con los agregados de eIF4G Y eIF4E y un incremento de proteína viral. PABP también muestra una re-distribución en los experimentos de Walsh, al igual que en nuestras imágenes de fluorescencia, pero en un patrón muy diferente, mientras que para VSR ocurre una translocación al núcleo, para el virus vaccinia ocurre una redistribución de PABP en la periferia de los cuerpos citoplasmáticos donde co-localizan eIF4E y eIF4G. ¿La formación de estos agregados citoplasmáticos de eIF4G y eIF4E son condiciones generadas por VSR para favorecer su replicación? El reporte de 2010 de Lindquist y colaboradores parece sugerir que sí, ya que sus datos indican que la formación de gránulos de estrés durante la infección por VSR es un mecanismo que favorece la

replicación de este virus (Lindquist et al., 2010). La translocación de PABP del citoplasma al núcleo es un fenómeno anteriormente reportado en infecciones por HSV-1 (Salaun et al., 2010), rotavirus (Harb et al., 2008) y Herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi (KSHV) (Lee y Glaunsinger, 2009), en el caso de los dos últimos es debido a condiciones generadas por proteínas virales. Sin embargo, no existen reportes de dicho proceso durante la infección por VSR. Es necesario realizar más investigaciones para determinar si es un mecanismo para promover la replicación viral o es consecuencia del estrés celular generado por la infección.

Dado que durante la infección por VSR se generan condiciones en las que la síntesis de proteína celular se ve arrestada, decidimos evaluar la capacidad replicativa de VSR en células en las que la síntesis de proteína ya se encuentra comprometida. Para evaluar lo anterior, utilizamos células HEp-2 infectadas con VSR durante 36 hpi y tratadas con el fármaco rapamicina a una dosis de 10 nM. Las condiciones celulares generadas por el fármaco rapamicina produjeron un aumento en la generación de progenie viral de VSR en casi 8 veces en comparación a las células no tratadas. Se ha reportado que en células dendríticas infectadas con VSR y tratadas con rapamicina se produce un incremento de hasta 9 veces el RNA de VSR, más específicamente la expresión de los genes de la proteína F de VSR, en dicho estudio también se observó que en células infectadas con VSR y tratadas con rapamicina se producía un decremento de la apoptosis mediada por células T (do Nascimento de Freitas et al., 2016). Lo anterior, sugiere que las condiciones intracelulares que produce rapamicina son ideales para la replicación de VSR y adicionalmente podemos sugerir que un incremento de la replicación de VSR en la célula infectada pudiera impedir la inmediata muerte por apoptosis del huésped y así aprovechar al máximo la maquinaria de síntesis de proteína celular. Sin embargo, nos encontramos limitados para realizar dicha sugerencia, ya que nosotros no realizamos mediciones de apoptosis de células infectadas por VSR. Por otro lado, un estudio realizado en la Universidad de Ottawa por Ibrahim, difiere de nuestros resultados (Ibrahim, 2014), en dicha investigación se observó que la replicación de VSR era ligeramente inhibida en células A549 tratadas con una dosis de rapamicina de 50 nM, mientras que, en células de epitelio bronquial humano tratadas con rapamicina no ocurre inhibición de la replicación de VSR. Las diferencias halladas entre nuestros resultados y los de Salma y Wright puedan deberse a que el efecto pueda variar entre líneas celulares

y las dosis de rapamicina usadas. Es necesario que nuestros resultados sean complementados con pruebas en las que se usen concentraciones de rapamicina más elevadas en diferentes líneas celulares.

La replicación de VSR en presencia de rapamicina resulta interesante desde el punto de vista de la terapéutica de pacientes transplantados. Rapamicina es un fármaco inmunosupresor ampliamente usado en personas con trasplante de órganos, sobre todo en aquellos de naturaleza hepática [Revisado en (McMurry, 2012)]. Por otro lado, VSR se encuentra dentro de los virus respiratorios que contribuyen significativamente en la morbilidad y mortalidad de individuos que han recibido un órgano [Revisado en (Manuel et al., 2014)]. Además, la incidencia de VSR en casos de trasplantes de órganos sólidos (SOT) es de 2.4% a 15% en relación a todos los patógenos virales incluidos en el grupo de virus respiratorios adquiridos en comunidad (CARV) [Revisado en (Ison, 2006)] y adicionalmente, VSR pueden encontrarse en coinfecciones en transplantados con órganos sólidos [Revisado en (Razonable, 2011)]. Por todo lo anterior, debemos tomar en cuenta los potenciales riesgos de la administración de rapamicina en este grupo de riesgo, por lo que son requeridos más estudios que aborden este aspecto.

9. CONCLUSIONES

1.- VSR genera alteración del factor de inicio de la traducción eIF4E a través del represor 4EBP1, que al ser defosforilado se une a eIF4E secuestrándolo y evitando la formación del complejo de inicio de la traducción eIF4F.

2.- VSR genera alteración del factor de inicio eIF4G a través de un mecanismo que disminuye su abundancia, podría ser a través de un corte proteolítico o por la disminución de su síntesis de *ново*.

3.- Como consecuencia de la infección por VSR se produce en la célula una redistribución intracelular de los factores de inicio eIF4E y eIF4G en forma de gránulos citoplasmáticos llamados gránulos de estrés. Dicho fenómeno pudiera deberse a una proteína viral o al estrés generado en la célula por la presencia del virus.

4.- Durante la infección por VSR, la proteína PABPC que inicialmente mostraba un patrón citoplasmático cambia a un patrón nuclear a través del tiempo de la infección. La translocación observada pudiera deberse a alguna proteína de VSR o como consecuencia del estrés generado en la célula por la presencia del virus.

5.- Las condiciones intracelulares generadas durante la infección por VSR como son: la defosforilación de 4EBP1, la disminución de la abundancia de eIF4G, la agregación de los factores de inicio eIF4E y eIF4G en gránulos de estrés y la translocación de PABPC del citoplasma al núcleo, generan una disminución de la síntesis de proteína de la célula huésped y un incremento de la síntesis de proteína viral, siendo esto favorable para la replicación de VSR.

6.- Rapamicina (También conocido como sirolimus en clínica de trasplante de órganos) que tiene como blanco de inhibición al complejo mTORC1 (cinasa del represor traduccional 4EBP1), produce condiciones arrestantes en la síntesis de proteína celular. Dichas condiciones son favorables para que VSR se replique eficientemente, lo que implica que pacientes con trasplantes de órganos y tratados con este fármaco desarrollen infecciones severas.

En conjunto, nuestros datos sugieren que VSR pudiera generar condiciones intracelulares que le permiten traducir eficientemente a sus mensajeros para producir la suficiente proteína viral, haciendo eficiente la replicación viral (Fig. 15), además de que personas tratadas con rapamicina pueden presentar riesgo de infecciones severas por VSR.

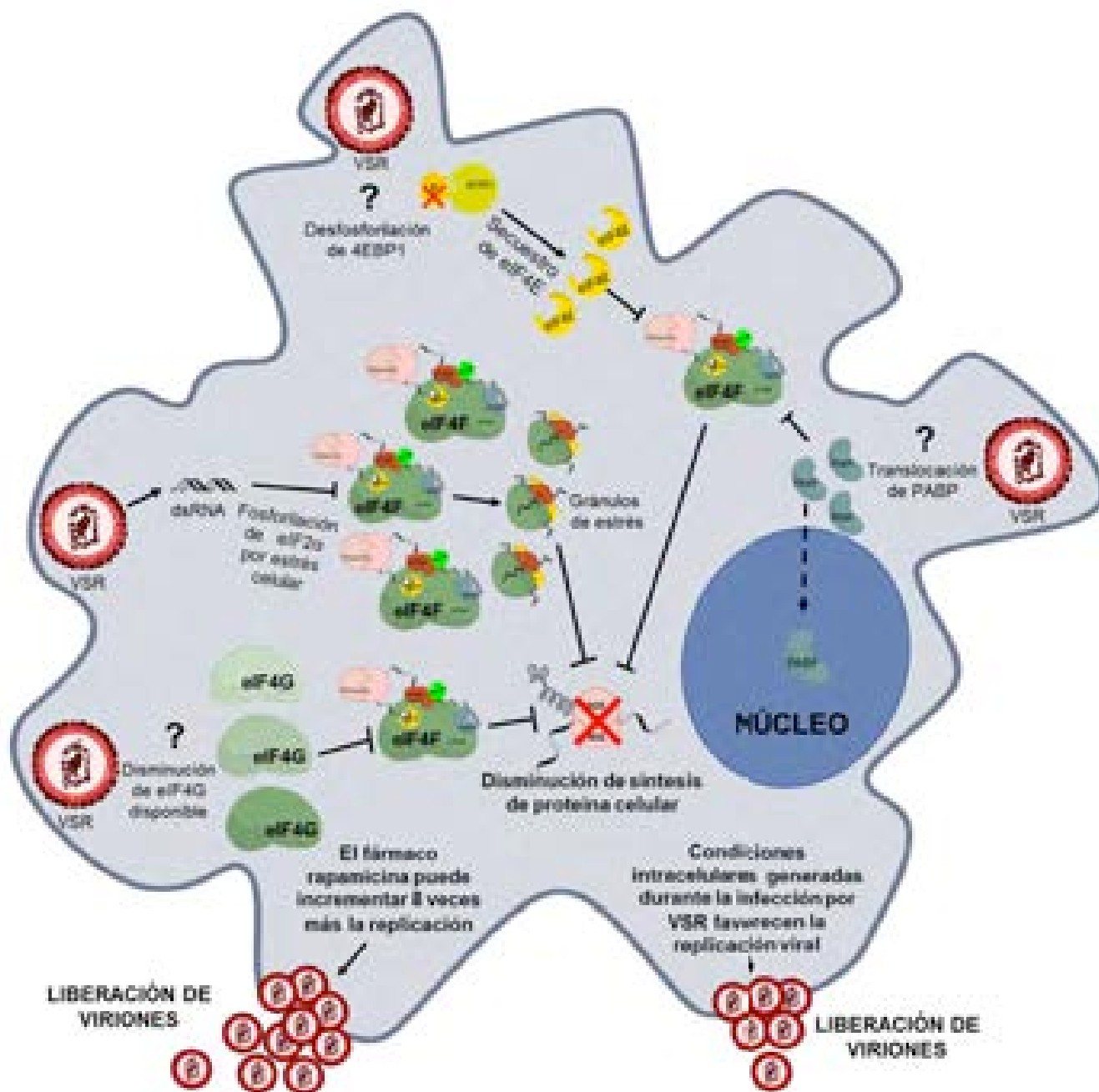


Figura 15. VSR genera condiciones intracelulares que favorecen su replicación. La formación de nuevos viriones se ve favorecido por la defosforilación de 4EBP1, la disminución de eIF4G, la translocación de PABP citoplasmático al núcleo y la disminución de la síntesis de proteína celular. Además, la presencia de rapamicina incrementa aún más la replicación de VSR bajo estas condiciones.

10. REFERENCIAS

1. Alvarez E, Menendez-Arias L, Carrasco L. The eukaryotic translation initiation factor 4GI is cleaved by different retroviral proteases. *J Virol* 2003;77:12392-400.
2. Andino R, Boddeker N, Silvera D, Gamarnik AV. Intracellular determinants of picornavirus replication. *Trends Microbiol* 1999;7:76-82.
3. Barik S. The structure of the 5' terminal cap of the respiratory syncytial virus mRNA. *J Gen Virol* 1993;74 (Pt 3):485-90.
4. Belsham GJ, Sonenberg N. RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation. *Microbiol Rev* 1996;60:499-511.
5. Bermingham A, Collins PL. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:11259-64.
6. Bernstein JM, Hruska JF. Respiratory syncytial virus proteins: identification by immunoprecipitation. *J Virol* 1981;38:278-85.
7. Bitko V, Musiyenko A, Barik S. Viral infection of the lungs through the eye. *J Virol* 2007a;81:783-90.
8. Bitko V, Shulyayeva O, Mazumder B, et al. Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF-kappaB-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth. *J Virol* 2007b;81:1786-95.
9. Blackburn GL, Go VLW, Milner J, Heber D. Nutritional Oncology. Elsevier Science, 2011.
10. Buchan JR, Parker R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell* 2009;36:932-41.
11. Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:1432-7.
12. Bushell M, Poncet D, Marissen WE, et al. Cleavage of polypeptide chain initiation factor eIF4GI during apoptosis in lymphoma cells: characterisation of an internal fragment generated by caspase-3-mediated cleavage. *Cell Death Differ* 2000;7:628-36.
13. Cane P. Respiratory Syncytial Virus. Elsevier Science, 2006.

14. Caron S, Charon M, Cramer E, Sonenberg N, Dusanter-Fourt I. Selective modification of eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F) at the onset of cell differentiation: recruitment of eIF4GII and long-lasting phosphorylation of eIF4E. *Mol Cell Biol* 2004;24:4920-8.
15. Castello A, Quintas A, Sanchez EG, et al. Regulation of host translational machinery by African swine fever virus. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000562.
16. Chase AJ, Semler BL. Viral subversion of host functions for picornavirus translation and RNA replication. *Future Virol* 2012;7:179-191.
17. Collins PL, Melero JA. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Res* 2011;162:80-99.
18. Connor JH, Lyles DS. Vesicular stomatitis virus infection alters the eIF4F translation initiation complex and causes dephosphorylation of the eIF4E binding protein 4E-BP1. *J Virol* 2002;76:10177-87.
19. Costa-Mattioli M, Sonenberg N. Translational control of gene expression: a molecular switch for memory storage. *Prog Brain Res* 2008;169:81-95.
20. Cowton VM, McGivern DR, Fearn R. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *J Gen Virol* 2006;87:1805-21.
21. de Souza AP, de Freitas DN, Antunes Fernandes KE, et al. Respiratory syncytial virus induces phosphorylation of mTOR at ser2448 in CD8 T cells from nasal washes of infected infants. *Clin Exp Immunol* 2016;183:248-57.
22. do Nascimento de Freitas D, Gassen RB, Fazolo T, Souza AP. Rapamycin increases RSV RNA levels and survival of RSV-infected dendritic cell depending on T cell contact. *Toxicol In Vitro* 2016;36:114-9.
23. Eisenhut M. Extrapulmonary manifestations of severe RSV bronchiolitis. *Lancet* 2006;368:988.
24. Eloy B, Itznel P. Caracterización de los factores de iniciación eIF4G y eIF4E durante la infección por el virus sincitial respiratorio. 2012.
25. Evans JE, Cane PA, Pringle CR. Expression and characterisation of the NS1 and NS2 proteins of respiratory syncytial virus. *Virus Res* 1996;43:155-61.
26. Fadden P, Haystead TA, Lawrence JC, Jr. Identification of phosphorylation sites in the translational regulator, PHAS-I, that are controlled by insulin and rapamycin in rat adipocytes. *J Biol Chem* 1997;272:10240-7.
27. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med* 2005;352:1749-59.

28. Fernandez J, Yaman I, Sarnow P, Snider MD, Hatzoglou M. Regulation of internal ribosomal entry site-mediated translation by phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *J Biol Chem* 2002;277:19198-205.
29. Fuentes S, Tran KC, Luthra P, Teng MN, He B. Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *J Virol* 2007;81:8361-6.
30. Fujita Y, Oe M, Tutsumino T, et al. Domain-dependent interaction of eukaryotic initiation factor eIF4A for binding to middle and C-terminal domains of eIF4G. *J Biochem* 2009;146:359-68.
31. Ghildyal R, Hartley C, Varrasso A, et al. Surfactant protein A binds to the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and neutralizes virion infectivity. *J Infect Dis* 1999;180:2009-13.
32. Ghildyal R, Ho A, Wagstaff KM, et al. Nuclear import of the respiratory syncytial virus matrix protein is mediated by importin beta1 independent of importin alpha. *Biochemistry* 2005;44:12887-95.
33. Gibbs JD, Ornoff DM, Igo HA, Zeng JY, Imani F. Cell cycle arrest by transforming growth factor beta1 enhances replication of respiratory syncytial virus in lung epithelial cells. *J Virol* 2009;83:12424-31.
34. Gingras AC, Gygi SP, Raught B, et al. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev* 1999a;13:1422-37.
35. Gingras AC, Raught B, Gygi SP, et al. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev* 2001;15:2852-64.
36. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 1999b;68:913-63.
37. Gradi A, Imataka H, Svitkin YV, et al. A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol Cell Biol* 1998a;18:334-42.
38. Gradi A, Svitkin YV, Imataka H, Sonenberg N. Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998b;95:11089-94.
39. Gray NK, Wickens M. Control of translation initiation in animals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:399-458.
40. Groskreutz DJ, Babor EC, Monick MM, Varga SM, Hunninghake GW. Respiratory syncytial virus limits alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2alpha)

- phosphorylation to maintain translation and viral replication. *J Biol Chem* 2010;285:24023-31.
41. Hacking D, Hull J. Respiratory syncytial virus--viral biology and the host response. *J Infect* 2002;45:18-24.
42. Harb M, Becker MM, Vitour D, et al. Nuclear localization of cytoplasmic poly(A)-binding protein upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN. *J Virol* 2008;82:11283-93.
43. Hardy RW, Wertz GW. The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. *J Virol* 1998;72:520-6.
44. Harmon SB, Wertz GW. Transcriptional termination modulated by nucleotides outside the characterized gene end sequence of respiratory syncytial virus. *Virology* 2002;300:304-15.
45. Heesom KJ, Denton RM. Dissociation of the eukaryotic initiation factor-4E/4E-BP1 complex involves phosphorylation of 4E-BP1 by an mTOR-associated kinase. *FEBS Lett* 1999;457:489-93.
46. Hernandez-Aya LF, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in breast cancer. *Oncologist* 2011;16:404-14.
47. Holland EC, Sonenberg N, Pandolfi PP, Thomas G. Signaling control of mRNA translation in cancer pathogenesis. *Oncogene* 2004;23:3138-44.
48. Ibrahim S. Testing the effects of Hsp90 inhibitor and mToR inhibitor on HPIV3 and RSV replication in lung epithelial cells. 2014.
49. Inoki K, Ouyang H, Li Y, Guan KL. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005;69:79-100.
50. Ison MG. Respiratory viral infections in transplant recipients. *Antiviral therapy* 2006;12:627-638.
51. Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews Molecular cell biology* 2010;11:113-127.
52. Jan E, Sarnow P. Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. *J Mol Biol* 2002;324:889-902.
53. Jang SK. Internal initiation: IRES elements of picornaviruses and hepatitis c virus. *Virus Res* 2006;119:2-15.

54. Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* 1988;62:2636-43.
55. Kapp LD, Lorsch JR. The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem* 2004;73:657-704.
56. Kim JY, Chang J. In Hot Pursuit of the First Vaccine Against Respiratory Syncytial Virus. *Yonsei Med J* 2016;57:809-16.
57. Kim YK, Jang SK. Continuous heat shock enhances translational initiation directed by internal ribosomal entry site. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:224-31.
58. Kobayashi M, Wilson AC, Chao MV, Mohr I. Control of viral latency in neurons by axonal mTOR signaling and the 4E-BP translation repressor. *Genes Dev* 2012;26:1527-32.
59. Kotelkin A, Prikhod'ko EA, Cohen JI, Collins PL, Bukreyev A. Respiratory syncytial virus infection sensitizes cells to apoptosis mediated by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Virol* 2003;77:9156-72.
60. Kudchodkar SB, Yu Y, Maguire TG, Alwine JC. Human cytomegalovirus infection induces rapamycin-insensitive phosphorylation of downstream effectors of mTOR kinase. *J Virol* 2004;78:11030-9.
61. Lee YJ, Glaunsinger BA. Aberrant herpesvirus-induced polyadenylation correlates with cellular messenger RNA destruction. *PLoS Biol* 2009;7:e1000107.
62. Leung AK, Kellner JD, Davies HD. Respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Natl Med Assoc* 2005;97:1708-13.
63. Levine S, Peeples M, Hamilton R. Effect of respiratory syncytial virus infection of HeLa-cell macromolecular synthesis. *J Gen Virol* 1977;37:53-63.
64. Lewis SM, Holcik M. For IRES trans-acting factors, it is all about location. *Oncogene* 2008;27:1033-5.
65. Li Y, Yue P, Deng X, et al. Protein phosphatase 2A negatively regulates eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation and eIF4F assembly through direct dephosphorylation of Mnk and eIF4E. *Neoplasia* 2010;12:848-55.
66. Lindquist ME. Investigations into the role of stress granule formation during respiratory syncytial virus infection. In: Vanderbilt University, 2011.

67. Lindquist ME, Lifland AW, Utley TJ, Santangelo PJ, Crowe JE, Jr. Respiratory syncytial virus induces host RNA stress granules to facilitate viral replication. *J Virol* 2010;84:12274-84.
68. Lindquist ME, Mainou BA, Dermody TS, Crowe JE, Jr. Activation of protein kinase R is required for induction of stress granules by respiratory syncytial virus but dispensable for viral replication. *Virology* 2011;413:103-10.
69. Liuzzi M, Mason SW, Cartier M, et al. Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscriptional mRNA guanylation by viral RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 2005;79:13105-15.
70. Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 2006;25:6416-22.
71. Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, Yoshida K, Ler LW, Sonenberg N. eIF4E--from translation to transformation. *Oncogene* 2004;23:3172-9.
72. Manjarrez ME, Rosete DP, Rincon M, Villalba J, Cravioto A, Cabrera R. Comparative viral frequency in Mexican children under 5 years of age with and without upper respiratory symptoms. *J Med Microbiol* 2003;52:579-83.
73. Manuel O, Lopez-Medrano F, Keiser L, et al. Influenza and other respiratory virus infections in solid organ transplant recipients. *Clin Microbiol Infect* 2014;20 Suppl 7:102-8.
74. Marintchev A, Wagner G. Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. *Q Rev Biophys* 2004;37:197-284.
75. Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer* 2002;2:315-9.
76. McKimm-Breschkin JL. A simplified plaque assay for respiratory syncytial virus--direct visualization of plaques without immunostaining. *J Virol Methods* 2004;120:113-7.
77. McMurry J. Quimica Orgánica. Cengage Learning, 2012.
78. Mohapatra SS, Boyapalle S. Epidemiologic, experimental, and clinical links between respiratory syncytial virus infection and asthma. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:495-504.
79. Mohr I. Phosphorylation and dephosphorylation events that regulate viral mRNA translation. *Virus Res* 2006;119:89-99.
80. Montero H, Trujillo-Alonso V. Stress granules in the viral replication cycle. *Viruses* 2011;3:2328-38.

81. Moudy RM, Sullender WM, Wertz GW. Variations in intergenic region sequences of Human respiratory syncytial virus clinical isolates: analysis of effects on transcriptional regulation. *Virology* 2004;327:121-33.
82. Neuzil KM. Progress toward a Respiratory Syncytial Virus Vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 2016;23:186-8.
83. Noton SL, DeFlub, eacute, LR, Tremaglio CZ, Fearn R. The respiratory syncytial virus polymerase has multiple RNA synthesis activities at the promoter. 2012.
84. Pacheco A, Martinez-Salas E. Insights into the biology of IRES elements through riboproteomic approaches. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:458927.
85. Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 1988;334:320-5.
86. Pestova TV, Hellen CU. The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:651-74.
87. Pickering BM, Willis AE. The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16:39-47.
88. Populo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *Int J Mol Sci* 2012;13:1886-918.
89. Poulin F, Gingras AC, Olsen H, Chevalier S, Sonenberg N. 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *J Biol Chem* 1998;273:14002-7.
90. Preiss TW, Hentze M. Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays* 2003;25:1201-11.
91. Pyronnet S, Dostie J, Sonenberg N. Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes Dev* 2001;15:2083-93.
92. Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T, Sonenberg N. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J* 1999;18:270-9.
93. Pyronnet S, Pradayrol L, Sonenberg N. A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Mol Cell* 2000;5:607-16.
94. Radhakrishnan A, Yeo D, Brown G, et al. Protein analysis of purified respiratory syncytial virus particles reveals an important role for heat shock protein 90 in virus particle assembly. *Mol Cell Proteomics* 2010;9:1829-48.

95. Raught B, Gingras AC. eIF4E activity is regulated at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:43-57.
96. Razonable RR. Management of viral infections in solid organ transplant recipients. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011;9:685-700.
97. Reineke LC, Lloyd RE. Diversion of stress granules and P-bodies during viral infection. *Virology* 2013;436:255-67.
98. Richter JD, Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 2005;433:477-80.
99. Salaun C, MacDonald AI, Larralde O, et al. Poly(A)-binding protein 1 partially relocalizes to the nucleus during herpes simplex virus type 1 infection in an ICP27-independent manner and does not inhibit virus replication. *J Virol* 2010;84:8539-48.
100. Sarmiento RE, Arias CF, Mendez E, Gomez B. Characterization of a persistent respiratory syncytial virus showing a low-fusogenic activity associated to an impaired F protein. *Virus Res* 2008.
101. Sarmiento RE, Tirado R, Gomez B. Characteristics of a respiratory syncytial virus persistently infected macrophage-like culture. *Virus Res* 2002;84:45-58.
102. Schneider RJ, Mohr I. Translation initiation and viral tricks. *Trends in biochemical sciences* 2003;28:130-6.
103. Schneider RJ, Shenk T. Impact of virus infection on host cell protein synthesis. *Annual review of biochemistry* 1987;56:317-332.
104. Shi Y, Taylor SI, Tan SL, Sonenberg N. When translation meets metabolism: multiple links to diabetes. *Endocr Rev* 2003;24:91-101.
105. Shors T. Virus: estudio molecular con orientación clínica. Médica Panamericana, 2009.
106. Sonenberg N, Rupprecht KM, Hecht SM, Shatkin AJ. Eukaryotic mRNA cap binding protein: purification by affinity chromatography on sepharose-coupled m7GDP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4345-9.
107. Thoreen CC, Sabatini DM. Rapamycin inhibits mTORC1, but not completely. *Autophagy* 2009;5:725-6.
108. Tran TL, Castagne N, Bhella D, et al. The nine C-terminal amino acids of the respiratory syncytial virus protein P are necessary and sufficient for binding to ribonucleoprotein complexes in which six ribonucleotides are contacted per N protein protomer. *J Gen Virol* 2007;88:196-206.

109. Vagner S, Galy B, Pyronnet S. Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep* 2001;2:893-8.
110. Ventoso I, Blanco R, Perales C, Carrasco L. HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:12966-71.
111. Ventoso I, MacMillan SE, Hershey JW, Carrasco L. Poliovirus 2A proteinase cleaves directly the eIF-4G subunit of eIF-4F complex. *FEBS Lett* 1998;435:79-83.
112. Villas-Boas CS, Conceicao TM, Ramirez J, Santoro AB, Da Poian AT, Montero-Lomeli M. Dengue virus-induced regulation of the host cell translational machinery. *Braz J Med Biol Res* 2009;42:1020-6.
113. Voet D, Voet JG. Bioquímica. Editorial Médica Panamericana S.A., 2006.
114. von Linstow ML, Eugen-Olsen J, Koch A, Winther TN, Westh H, Høgh B. Excretion patterns of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus among young children. *Eur J Med Res* 2006;11:329-35.
115. Walsh D, Arias C, Perez C, et al. Eukaryotic translation initiation factor 4F architectural alterations accompany translation initiation factor redistribution in poxvirus-infected cells. *Mol Cell Biol* 2008;28:2648-58.
116. Walsh D, Mohr I. Phosphorylation of eIF4E by Mnk-1 enhances HSV-1 translation and replication in quiescent cells. *Genes Dev* 2004;18:660-72.
117. Walsh D, Mohr I. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat Rev Microbiol* 2011;9:860-75.
118. Weber E, Humbert B, Streckert HJ, Werchau H. Nonstructural protein 2 (NS2) of respiratory syncytial virus (RSV) detected by an antipeptide serum. *Respiration* 1995;62:27-33.
119. Welliver RC. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. *J Pediatr* 2003;143:S112-7.
120. Wilkie GS, Dickson KS, Gray NK. Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends in biochemical sciences* 2003;28:182-8.
121. Wu W, Munday DC, Howell G, Platt G, Barr JN, Hiscox JA. Characterization of the interaction between human respiratory syncytial virus and the cell cycle in continuous cell culture and primary human airway epithelial cells. *J Virol* 2011;85:10300-9.

122. Zlateva KT, Lemey P, Moes E, Vandamme AM, Van Ranst M. Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. *J Virol* 2005;79:9157-67.

11. ANEXOS

4EBP1 Is Dephosphorylated by Respiratory Syncytial Virus Infection

Gustavo Pérez-Gil^{A, B} Adriana Landa-Cardena^A Rocío Coutiño^A
Rebeca García-Román^A Clara L. Sampieri^A Silvia I. Mora^C Hilda Montero^A

^AInstituto de Salud Pública, and ^BCentro de Ciencias Biomédicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, and

^CUnidad de Procedimientos Preparatorios y de Acceso a Servicios de Proteómica, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Key Words

Respiratory syncytial virus · eIF4E · 4EBP1 · Rapamycin

Abstract

Respiratory syncytial virus (RSV) requires protein biosynthetic machinery to generate progeny. There is evidence that RSV might alter some translation components since stress granules are formed in their host cells. Consistent with these observations, we found that RSV induces dephosphorylation of 4EBP1 (eIF4E-binding protein), an important cellular translation factor. Our results show no correlation between the 4EBP1 dephosphorylation time and the decrease in the global rate of protein synthesis. Interestingly, treatment with rapamycin stimulates virus generation. The results suggest that RSV is a virus that still contains unknown mechanisms involved in the translation of their mRNAs through the alteration or modification of some translation factors, such as 4EBP1, possibly to favor its replicative cycle.

© 2013 S. Karger AG, Basel

Respiratory syncytial virus (RSV) is a member of the Paramyxoviridae family and is classified in the *Pneumovirus* genus. It is a public health concern around the world, including in our country, where it is the main

pathogen for respiratory infections in children [1]. This virus is highly infectious and most children are infected before they reach 2 years of age, and some of them may develop severe infections, such as bronchiolitis [2]. Infection with this virus is not limited to children; it can infect people of any age, causing complications or death in elderly and immunocompromised adults [3, 4].

RSV is a negative nonsegmented single-stranded RNA-enveloped virus. Neither the genome nor the antigenome of this virus has either cap or poly-A. From the genome, 10 mRNAs containing cap at the 5' end and poly-A at the 3' end are transcribed, just as with cellular mRNAs [5].

Viruses regulate a great number of cellular processes in order to complete their replication cycle, and translation is one of them. Translation is a complex process that involves diverse proteins called translation factors [6, 7] and is usually divided into three phases – initiation, elongation and termination – the first of which is the most regulated [8, 9]. It has been described that the characteristics of mRNA, such as cap at the 5' end and poly-A tail at the 3' end, are important during the initiation phase, as is a protein complex called eIF4F, which is composed of three proteins: eIF4E, which binds to cap, helicase eIF4A and eIF4G. This last translation factor, in turn, binds to eIF4E, eIF4A and poly-A-binding protein

KARGER 125

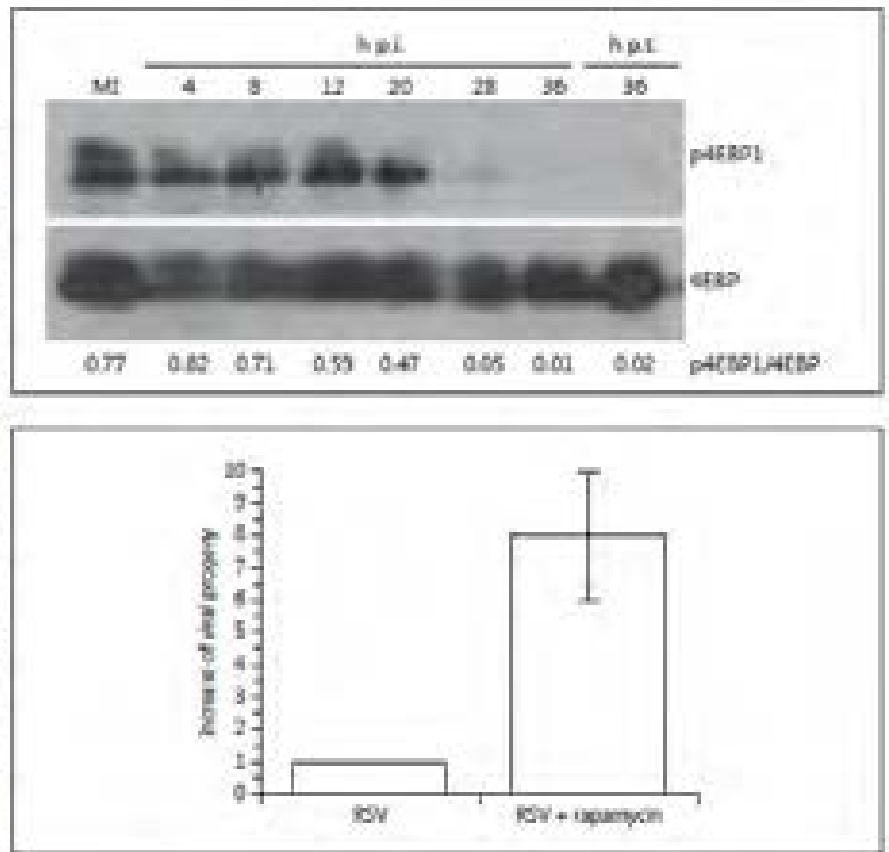
© 2013 S. Karger AG, Basel
1522-202X/13/5803-305\$39.00/0

J. Mail: karger@karger.com
www.karger.com/ist

Hilda Montero
Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana
Avenida Luis Castelnuovo Azuela s/n, Car. Industrial Júpiter
Xalapa, Veracruz 21200 (México)
E-Mail: hmontero@unv.mx

Downloaded from www.karger.com by [IP address] on [date]

Fig. 1. a 4EBP1 is dephosphorylated during RSV infection. Hep-2 cells were mock-infected (MI) or infected with RSV at a multiplicity of infection of 3 and harvested at different postinfection times (in hours). As dephosphorylation 4EBP1 control, uninfected cells were treated with 10 nM of rapamycin, a known mTORC1 repressor, and were lysed at 36 h posttreatment, as indicated. The samples were resolved by SDS-15% PAGE, and the membrane was tested with an antibody directed against phosphorylated 4EBP1 and total 4EBP. A densitometric analysis of the 4EBP1 phosphorylation level was performed. The numbers below the bands represent the ratio of 4EBP1 phosphorylation to the total 4EBP1 level (p4EBP1/4EBP1). A representative experiment of at least four experiments is shown. **b** Rapamycin treatment increases the viral progeny. The cells infected with RSV were untreated or treated at once with rapamycin. At 36 h p.i., the cells were harvested and the viral progeny was quantified by plaque assay. The arithmetic mean \pm standard deviation of three independent experiments is shown. h p.i. = Hours p.i.; h p.t. = hours posttreatment.



cytoplasmic (PABPC), favoring pseudo-circulation of mRNA [7, 10].

Changes in the translation initiation can be made by the regulation of key proteins, which can respond to phosphorylation-dephosphorylation events, proteolytic cleavage or an intracellular location [11, 12]. A regulatory initiation factor that has been extensively studied is eIF4E, which can be regulated by 4EBP proteins, which are considered to be translation repressors because they bind to and kidnap the eIF4E factor. Although three types of 4EBP proteins have been identified (4EBP1, 2 and 3), their diversity function is not known. Of the three types, 4EBP1 is the best characterized and is known to be a phosphoprotein that, when hypophosphorylated, joins to eIF4E, avoiding the formation of eIF4F [12–14].

Regarding protein synthesis regulation during RSV infection, it has been reported that the virus does not cause cellular protein synthesis inhibition [15]. However, Bernstein and Hruska [16] worked with different cell lines (infected or not) with a high NaCl molarity, a condition said to inhibit reinitiation. Interestingly, they reported that

under these conditions the mRNAs of RSV are efficiently translated, unlike cellular mRNAs. Moreover, it was recently found that stress granules, which are cytoplasmic structures in which the protein synthesis machinery is arrested under stress conditions, are formed in cells infected with RSV and they do not interfere with the replication cycle of the virus [17]. Taken together, these studies suggest that the mRNAs of the RSV may have characteristics that favor translation in conditions in which the cell is compromised. This implies that RSV can control cellular processes, favoring its replication cycle, and, despite extreme cell conditions such as stress, is able to replicate itself; however, little is known about this process. Furthermore, whether some translational factors, such as eIF4E, are regulated during infection is not known either.

We studied the phosphorylation state of 4EBP1 in RSV-infected cells. The Hep-2 cells mock-infected or infected with RSV at different postinfection (p.i.) times were analyzed by Western blot. A monoclonal antibody whose target was the 4EBP1 protein that recognizes Thr37/46 in its phosphorylation state was used. As can be

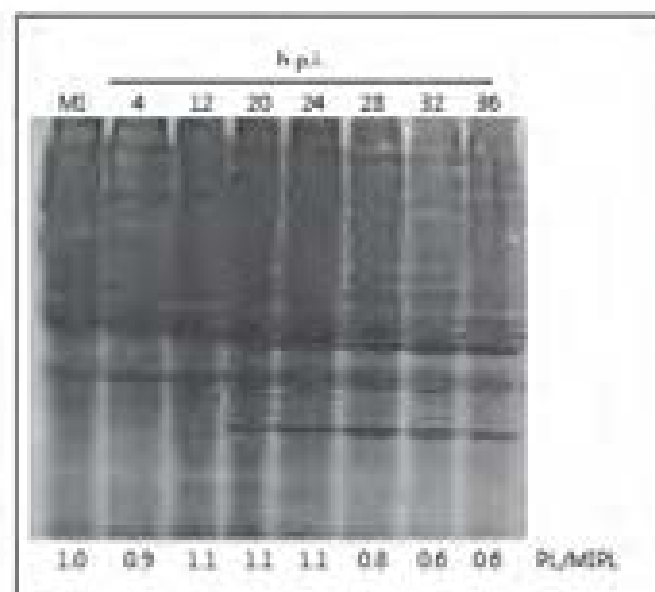


Fig. 2. The global protein synthesis in cells infected with RSV. HEp-2 cells were mock-infected (MI) or infected with RSV at a multiplicity of infection of 5, and the cells were metabolically labeled with 40 μ Ci/ml of EasyTag Express-[35S] for 2 h before the lysis. The cells were lysed in Laemmli sample buffer at different postinfection times (in hours), and the proteins were separated by SDS-10% PAGE. The drying gel was subjected to autoradiogram. A densitometric analysis of the protein cellular area in the autoradiogram was performed. The numbers below the gel represent the ratio of protein level to MI protein level (PL/MIP). h p.i. = Hours p.i.

seen in figure 1a, there is a decrease in the signal of 4EBP1 phosphorylated from 12 h p.i. and it reaches its maximum level at 36 h p.i. Lysates of HEp-2 cells, treated with 10 nM of rapamycin, a known mTORC1 repressor, the 4EBP1 kinase [14], were used to control dephosphorylation of 4EBP1. Detection of total 4EBP1 was performed in parallel (fig. 1b).

The results suggest that eIF4E is regulated during RSV infection through dephosphorylation of 4EBP1. It is important to conduct more studies to understand the mechanism by which RSV induces 4EBP1 dephosphorylation and the responsible viral proteins, since various viral strategies to dephosphorylate 4EBP1 have been found [18, 19].

Because rapamycin is a drug that promotes the dephosphorylation of 4EBP1, we decided to investigate the effect of this drug on the generation of RSV progeny. The cells were infected with or without immediate treatment with 10 nM of rapamycin, and at 36 h p.i. the cells were

lysed. The virus in the samples was quantified by plaque assay. The results show that there was 8 times more virus in infected cells with rapamycin than infected cells without treatment (fig. 1b).

These findings may have clinical implications since rapamycin and its derivatives are administered in transplant patients [20], and infection by RSV may be frequent because of its airborne transmission. However, because rapamycin stimulates formation of RSV progeny, it could have a synergistic effect on the generation of virus particles and a possible impact on the severity of the infection.

4EBP1 dephosphorylation interferes with protein synthesis, so we analyzed the *de novo* synthesis of the cellular protein labeled as 35S from uninfected cells or infected with RSV at different p.i. times using autoradiography. The results showed a decrease of about 40% in the global rate of protein synthesis after 28 h p.i. (fig. 2). Our results show no correlation between the 4EBP1 dephosphorylation time and the decrease in the global rate of protein synthesis.

Finally, our data are consistent with the fact that RSV may be regulating the cellular translation by altering or controlling certain cellular proteins, such as 4EBP1, possibly to ensure the generation of progeny, suggesting that RSV is setting favorable intracellular conditions or that the intracellular conditions in the infection context are used for RSV to replicate itself. However, studies are needed to determine how RSV has its proteins synthesized in its progeny formation, as well as the cellular factors that are required to achieve this.

Acknowledgments

This work was supported by grant 106459 from the National Council for Science and Technology (Mexico). G.P.-G. (No. J46287) and A.L. are recipients of a scholarship from the National Council for Science and Technology (Mexico) and the Dirección General de Investigaciones of the Universidad Veracruzana, respectively. We thank Beatriz Gómez for her assistance in the RSV propagation and Carolina Barrientos and Stefan Walczowski for their advice on this work.

References

- Manjarrez ME, Baschi DP, Escam M, Villalba J, Crivasto A, Cabrera B. Compartmental viral frequency in Mexican children under 5 years of age with and without upper respiratory symptoms. *J Med Microbiol* 2004;52: 576-583.
- Liang AE, Kellner JD, Davies GD. Respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Natl Med Assoc* 2005;97:1708-1713.

- 1 Fabry AE, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh ED. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med* 2005;352:1749-1759.
- 2 Welliver RC. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. *J Pediatr* 2005; 149S112-S117.
- 3 Cortese VM, McGovern DR, Pearce R. Unraveling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *J Gen Virol* 2005; 87:1805-1821.
- 4 Pestov TV, Melén CD. The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis. *Cell Mol Life Sci* 2006;57: 651-674.
- 5 Poyas T, Hentze WM. Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays* 2005;27:1201-1211.
- 6 Gray NK, Wickens M. Control of translation initiation in animals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:399-458.
- 7 Kagey LD, Lorsch JB. The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem* 2004;73:657-704.
- 8 Wilkie GS, Thomson EK, Gray NK. Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci* 2003;28: 182-188.
- 9 Burgess JDM, Richardson WA, Anderson RC, Salan C, Graham SV, Gray NK. Nuclear relocalisation of cytoplasmic poly(A)-binding proteins PABP1 and PABP2 in response to UV irradiation reveals mRNA-dependent export of mammalian PABPs. *J Cell Sci* 2010;124: 3344-3355.
- 10 Devot TE. Translation initiation: adapt it or die. *Trends Biochem Sci* 1999;24:398-400.
- 11 Poulis F, Gingras AC, Olson JJ, Chevalier S, Sonenberg N. 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *J Biol Chem* 1998;273:14002-14007.
- 12 Richter JD, Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 2005;435:477-480.
- 13 Lestae S, Peoples M, Hamilton D. Effect of respiratory syncytial virus infection of Hela cell macromolecular synthesis. *J Gen Virol* 1977; 27:53-63.
- 14 Serrano JM, Hruška P. Respiratory syncytial virus protein: identification by immunoprecipitation. *J Virol* 1983;50:278-285.
- 15 Lindquist MT, Seland AW, Ulley TJ, Santangelo P, Crowe JE Jr. Respiratory syncytial virus induces host RNA stress granules to facilitate viral replication. *J Virol* 2005;79: 12274-12284.
- 16 Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niostrzewicz A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz JD, Wysocki-Chernuska A, Aebersold R, Sonenberg N. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev* 2001;15:2802-2814.
- 17 Gingras AC, Ivetsov T, Bellam GJ, Pause A, Sonenberg N. Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5578-5583.
- 18 Saunders EN, Metcalfe CD, Nicholson MG. Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. *Transp Int* 2003;16:1-14.

RESEARCH

Open Access

Viral coinfection in acute respiratory infection in Mexican children treated by the emergency service: A cross-sectional study

Jahaziel Díaz¹, Jaime Morales-Romero², Gustavo Pérez-Gil^{1,2}, Martín Bedolla-Barajas³, Netzahualpilli Delgado-Figueroa¹, Rebeca García-Román¹, Omar López-López^{1,4}, Evelyn Bañuelos^{1,4}, Cristal Rizada-Antel¹, Roberto Zenteno-Cuevas¹, Ángel Ramos-Ligorio⁵, Clara Luz Sampieri⁶, Luis Gustavo Orozco-Alatone⁷, Silvia I Mora⁸ and Hilda Montero^{1*}

Abstract

Background: Acute respiratory infections (ARIs) cause illness. Children under five years of age are highly vulnerable to these infections. Viral coinfection or multiple viral infection is a variable that can have a significant impact on the evolution of these diseases.

Methods: This cross-sectional study was carried out in Mexican children (under five years of age) who had an ARI and who were treated by an emergency service in a hospital in Guadalajara, Jalisco, Mexico. The viral etiology, as well as the presence of multiple viral infections, was determined. A structured questionnaire was used to obtain demographic and clinical information. Odds ratio (OR) was calculated, and univariate and multivariate analysis using logistic regression were performed.

Results: In the study population, metapneumovirus (hMPV) was the most frequent virus (22%), followed by adenovirus (hAdV) (16%), respiratory syncytial virus (RSV) (14%), rhinovirus (hRV) (12%), bocavirus (hBoV) (9%), influenza virus (IF) (7%), and parainfluenza (PIF) (4%). The frequency of viral coinfections was 31.62%, and multiple logistic regression analysis revealed that hMPV, RSV, PIF, and hBoV were independently associated with multiple viral infection. No difference was found in the clinical manifestation of children with simple and multiple infections. Simple hMPV infection was associated with patients who presented with severe ARI. Using a multivariate analysis, we found that overcrowding is associated with coinfection when the viral etiology was hRV (OR = 2.56, 95% confidence interval (CI) 1.07 to 6.13), IF (OR = 2.56, 95% CI 1.07 to 6.13), PIF (OR = 2.94, 95% CI 1.15 to 7.65), hAdV (OR = 2.56, 95% CI 1.07 to 6.13), and hBoV (OR = 2.6, 95% CI 1.14 to 7.34).

Conclusions: Viral coinfections are frequent in children requiring treatment by an emergency service. However, the severity of ARI is similar to that of children with a simple infection. The hMPV is common and may confer a significant disease burden in the Mexican population. Finally, overcrowding is a housing characteristic that favors the development of coinfections.

Keywords: Respiratory viruses, Coinfection, Acute respiratory infections, Children, Overcrowding, Emergency service, Metapneumovirus

* Correspondence: jmorales@unam.mx
Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana, Av. Luis Cabrera Acuña
s/n, Col. Industrial Arroyo, 91190 Xalapa, Veracruz, México
Full list of author information is available at the end of the article



Background

Acute respiratory infections (ARIs) are a public health problem due to their high morbidity. According to the World Health Organization (WHO), of the total number of new cases of pneumonia in the world, about 7% to 17% require hospitalization [1], and pneumonia results in approximately 1.4 million deaths per year in children under five years of age, mainly in developing countries [2].

Several microorganisms can cause ARI. However, most of them are of viral etiology [3,4]; respiratory syncytial virus (RSV), rhinovirus (hRV), influenza virus (IF), adenovirus (hAd), and parainfluenza (PIF) are the most frequently involved viruses (reviewed in [4,5]). All of these viruses are of clinical importance, and RSV has been found to be one of the most common viruses in ARI. Additionally, RSV infection has been associated with a more aggressive behavior and an increased need for hospitalization [6-9]. Given the way these respiratory viruses are spread and the diversity of types and variants [3,10], it is not surprising that sometimes the same patient is infected with more than one virus. Therefore, many research groups have tried to determine the consequence of multiple infections as clinical manifestations worsen. However, the results show discrepancies, because in some studies severe ARI occurs mainly in individuals with simple infections (reviewed in [11]).

The etiologic factor is not the only one influencing ARI complications; environmental and socioeconomic factors also impact on disease progression. A meta-analysis found that low birth weight, lack of exclusive breastfeeding, and overcrowding, among other factors, are associated with severe ARI (reviewed in [12]).

The purpose of this study was to determine the prevalence of respiratory viruses in Mexican children who were under five years of age, had an ARI, and were admitted to the emergency department of a single institution in Guadalajara, Jalisco, Mexico. It also evaluates the relationship between viral coinfection with clinical manifestations and some possible risk factors related to demographic and housing characteristics.

Methods

Study design

This cross-sectional study was carried out in Mexican children with ARI from December 2012 to April 2013 in a secondary care hospital located in Guadalajara, Jalisco, Mexico. The study was approved by the research committee of the hospital. The parents of the recruited infants were informed about the characteristics of the study and provided written informed consent for a sample to be taken and analyzed. A structured questionnaire was used to obtain demographic and clinical information.

Subjects

In total, 162 samples from children under five years of age were obtained from a pediatric emergency service from December 2012 to April 2013 (corresponding to winter and spring). The inclusion criteria were age of less than five years, upper or lower respiratory tract manifestations of ARI, or both. The patients were divided into two groups according to severity of ARI: mild-moderate and severe. The criterion for determining severe ARI was that the patient had at least one sign of respiratory distress according to Official Mexican Norm NOM-001-SSA2-1998, which pertains to the care of children's health: dyspnea, apnea, wheezing, or intercostal retraction [13]. Mild-moderate ARIs were all ARIs without respiratory distress. In this study, the patients had no fatal outcome.

Definitions

ARI was defined according to the Mexican Official Norm as infectious disease caused by microorganism that affect the respiratory system during a period of shorter than 15 days. The ARI should have been diagnosed by the attending physician [13].

Overcrowded housing was indicated when the quotient obtained by dividing the number of household members by the number of rooms available to sleep in was greater than or equal to 3 [14].

History of breastfeeding was assessed as duration in months and was divided into two groups: greater than or equal to 6 months versus less than 6 months. There was no further questioning about whether breastfeeding was exclusive.

Comorbidity was defined as the presence of one or more diseases or conditions other than those of primary interest [15].

Nutritional status was evaluated by body mass index as underweight, normal weight, and excess weight (overweight or obesity) according to Child Growth Standards, (World Health Organization) [16].

Clinical samples

The nasal swabs were collected with sterile rayon-tipped applicators (Puritan Medical Products Co. LLC, Guilford, ME, USA) in accordance with WHO recommendations [17]. The swab was placed into a tube that contained Leibovitz viral transport medium with 100 IU/mL penicillin (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), 0.25 µg/mL amphotericin B, and 0.01 mg/mL streptomycin (American Type Culture Collection). The samples were maintained at 4°C and transported at this temperature from the hospital in Guadalajara, Jalisco, to the virology laboratory of the Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana (Public Health Institute, University of Veracruz), where the samples were processed and analyzed.

Virus detection

Viral genomes were extracted with a PureLink viral RNA/DNA kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) in accordance with the instructions of the manufacturer. A screening for detecting bocavirus (hBoV) [18], hAd [19], RSV [20], hRV [21], metapneumovirus (hMPV) [22,23], influenza type A (IF), and PIF was carried out by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) or PCR by means of an AccessQuick™ RT-PCR System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) in accordance with the instructions of the manufacturer and with previously described primers and methods; the modifications to these methods are indicated in Additional file 1. The PIF primers were designed by our group, and the IF primers were designed and provided by Susana López and her group (National Autonomous University of Mexico).

Statistical analysis

Associations between different variables were assessed by the chi-square test or Fisher test where necessary. Statistical significance was defined as a *P* value of less than 0.05. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were calculated by logistic regression. Statistical analysis was performed by using SPSS software (PASW Statistics for Windows, Version 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and StatCalc (Epi Info 7; Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA).

Results

Characteristics of the participants

One hundred sixty-two patients were included in this study. The characteristics of the participants were analyzed. The average age of the population was 18.4 months (1.87 to 34.85 months), 28.4% were not more than 6 months old, and 58.6% of participants were male.

Clinical signs of an ARI were evaluated according to the data obtained from the questionnaire. All participants had nasal discharge and cough, and 67.3% had fever.

In regard to the housing characteristics, 8% of the participants lived in houses where they cooked with firewood, 38.9% reported having lived in overcrowded conditions, and less than 2% lived in a house with a soil floor. Furthermore, 88.8% had been breastfed at least once.

Viral etiology

Of the samples tested, 57% were positive for a virus. The viruses most frequently detected were hMPV (22%), hAd (16%), RSV (14%), and hRV (12%). hBoV (9%), IF (7%), and PIF (4%) were detected at a lower frequency (Table 1).

Viral etiology and severity of the acute respiratory infection

The presence of each virus in mild-moderate or severe ARI was analyzed. hMPV was found to be associated

Table 1 Viral detection by polymerase chain reaction

Viruses	Frequency n = 162	Prevalence (95% CI)
Viral etiology	91	0.57 (0.5-0.6)
hMPV	36	0.22 (0.1-0.3)
hAd	26	0.16 (0.1-0.2)
RSV	23	0.14 (0.1-0.2)
hRV	19	0.12 (0.1-0.2)
hBoV	16	0.09 (0.04-0.1)
IF	11	0.07 (0.03-0.1)
PIF	7	0.04 (0.01-0.1)

CI: confidence interval; hMPV: human metapneumovirus; hAd: human adenovirus; RSV: respiratory syncytial virus; hRV: human rhinovirus; hBoV: human bocavirus; IF: influenza virus; PIF: parainfluenza virus.

with the severe ARI group (OR = 4.0, 95% CI 1.33 to 12.06). Other viruses we analyzed showed no association with any of the groups.

Viral coinfections

The presence of more than one virus was evaluated in the sample coming from the same subject. Simple infections were the most frequent, whereas multiple infections occurred in 31.62% of patients with ARI of viral etiology. hMPV was the most frequent virus in coinfections (58.8%), followed by hAd and RSV (38.2% each).

A univariate analysis showed that only four of the seven viruses studied were significantly associated with multiple infection; PIF was the highest coinfection risk (OR = 12.42, 95% CI 1.4 to 108.3), followed by hBoV (OR = 5.16, 95% CI 1.6 to 16.6), hMPV (OR = 3.8, 95% CI 1.6 to 9.4), and RSV (OR = 3.03, 95% CI 1.15 to 8.0). hAd, IF, and hRV showed no association (Table 2).

In the study population, 24.18% of cases of dual infection and 7.44% of triple infection were found. In regard to dual infections, the highest combination was observed between RSV-IF (4.65%). In the triple coinfections, the most common combination was hMPV-hAd-hBoV (2.79%) (Table 3).

Association between clinical and demographic characteristics with coinfection

A univariate analysis was carried out to find the association between coinfection and the following variables: age, sex, using wood as fuel in the house, overcrowding, having a house with a soil floor, and breastfeeding. Age of less than or equal to 6 months and living in overcrowded conditions increased the risk for multiple infection (OR = 3.08, 95% CI 1.08 to 8.6 and OR = 2.6, 95% CI 1.1 to 6.1, respectively). The rest of the demographic variables showed no significant association.

In regard to clinical features, the presence of comorbidity, nutritional state, and severity of ARI were evaluated. We found no significant differences (Table 4).

Table 2 Comparison of viral etiology between subjects with multiple and simple infection

	Coinfection n = 34	Simple infection n = 59	OR (95% CI)	P value
Viral etiology, n (%)				
hMPV	20 (58.8)	16 (27.1)	1.8 (1.0-3.4)	0.031
hAd	13 (38.2)	13 (22.0)	2.19 (0.9-5.3)	0.094
RSV	12 (35.2)	10 (16.9)	3.03 (1.13-8.0)	0.027
hSV	10 (29.4)	9 (15.3)	2.31 (0.9-6.4)	0.103
hBoV	11 (32.4)	5 (8.5)	5.36 (1.6-18.6)	0.007
IF	6 (17.6)	5 (8.5)	2.31 (0.7-8.3)	0.187
PIF	6 (17.6)	1 (1.7)	12.42 (1.4-108.3)	0.009

Proportions were compared by using the chi-square test. OR: odds ratio; CI: confidence interval; hMPV: human metapneumovirus; hAd: human adenovirus; RSV: respiratory syncytial virus; hSV: human rhinovirus; hBoV: human bocavirus; IF: influenza virus; PIF: parainfluenza virus.

Multivariate analysis of factors associated with coinfection

A multivariate analysis was conducted in order to identify the risk factors for viral coinfection by making a stratification according to the etiological agent identified. Infection with hMPV, RSV, PIF, and hBoV showed significant association in the adjusted model. Overcrowding was a variable that remained associated in the adjusted analysis in those cases of infection with hRV (OR = 2.56,

95% CI 1.07 to 6.13), IF (OR = 2.56, 95% CI 1.07 to 6.13), PIF (OR = 2.96, 95% CI 1.15 to 7.65), hAd (OR = 2.56, 95% CI 1.07 to 6.13), and hBoV (OR = 2.9, 95% CI 1.14 to 7.34). The rest of the variables that had shown no significant association in the univariate analysis did not show one in the multivariate analysis either, except for age of less than 6 months, which was associated with infection with PIF and multiple infections (OR = 3.33, 95% CI 1.07 to 10.39) (Table 5).

Discussion

In Mexico, as in other parts of the world, ARIs have a high impact on morbidity, and children are highly vulnerable to these diseases [2,24].

In this study, we conducted an analysis of the viral etiology and clinical features of children admitted to the pediatric emergency service of a secondary care hospital, located in western Mexico.

In regard to viral detection, we found that hMPV was the most frequent virus in simple infections in the population we analyzed. This virus recently has been identified and has been associated with ARI in children and adults [25,26]. In Mexico, a few studies on the prevalence of hMPV have been conducted in the pediatric population, and the frequency has been reported to range from 6% to 20% [27-29]. In this study, this virus was detected in 22% of children, a value that is very similar to what has been reported in Mexico [28,29] and elsewhere (reviewed in [30]). Furthermore, our results contrast with those of other studies in which RSV ranks as the most frequent virus in the pediatric population with ARI [6,7]. The contrasts are probably due to the different temperatures (which are recorded by season) and the different geographical location of Mexico in comparison with those of other countries.

Interestingly, we found hAd to be the second most common virus. This virus is a cause of ARI and has been reported to have a frequency of about 3% in Mexican children from states other than Jalisco [31,32]. In this study, hAd was identified in 16% of patients, a value that is higher than what has commonly been reported in Mexican studies. In other countries, the prevalence of hAd varies from 1% to 20% [33-36]. Our results could be explained by the fact that the sample collection may have coincided with an outbreak of this virus. It is important to consider that genomic material of this virus has been found repeatedly in infants with recurrent episodes of ARI [37] and in children with asthma [38]. This is an important issue to investigate in future studies because infection with hAd may have health complications after the initial infection and this information is not known in the Mexican population.

Table 3 Description of the coinfection type

Coinfection	Frequency n = 93	Percentage
Dual infection	26	28.1
RSV-IF	5	4.8
hMPV-hSV	4	3.7
hMPV-RSV	4	3.7
hMPV-hAd	4	3.7
hMPV-hBoV	3	2.8
hAd-hSV	2	1.8
hAd-hBoV	1	0.9
hMPV-PIF	1	0.9
PIF-RSV	1	0.9
PIF-hBoV	1	0.9
PIF-hAd	1	0.9
Triple infection	8	7.4
hMPV-hAd-hBoV	3	2.7
hMPV-hAd-PIF	2	1.8
hAd-hAd-hBoV	2	1.8
hAd-RSV-IF	1	0.9
Total coinfection	34	31.2

hMPV: human metapneumovirus; hAd: human adenovirus; RSV: respiratory syncytial virus; hSV: human rhinovirus; hBoV: human bocavirus; IF: influenza virus; PIF: parainfluenza virus.

Table 4 Demographic and clinical characteristics of subjects with multiple or simple infection

	Coinfection n = 34	Simple infection n = 39	OR (95% CI)	P value
Demographic, n (%)				
Age of < 6 months	11 (32.4)	8 (20.5)	1.04 (0.28-4.6)	0.93
Sex, male	20 (58.8)	33 (85.9)	1.1 (0.5-2.6)	0.79
Use of wood fuel ^a	6 (17.6)	4 (10.3)	2.3 (0.8-11.2)	0.10
Overcrowding	18 (52.9)	18 (46.1)	2.4 (1.1-5.1)	0.03
Floor other than soil	34 (100)	57 (96.6)	-	-
Without breastfeeding	5 (14.7)	7 (17.9)	1.37 (0.4-4.7)	0.61
Breastfeeding < 6 months ^b	1 (2.9)	6 (15.4)	0.18 (0.02-1.58)	0.89
The patient was born as a twin	0 (0)	1 (2.5)	-	0.44
Clinical, n (%)				
Chronic disease	2 (5.9)	8 (20.5)	0.39 (0.1-1.8)	0.25
Severe ARI ^c	28 (82.4)	46 (96.1)	1.46 (0.59-4.22)	0.49
Nutritional status ^{***} Underweight/low weight	6 (17.6) 3 (11.5)	8 (18.2) 15	1.36 (0.38-4.9)	0.56 (0.16)
Normal weight	11 (32.4)	24 (61.5) 20 (48.5)	0.29 (1.54-1.8)	

Proportions were compared by using the chi square test. CI, confidence interval; OR, odds ratio.

^aOnly in children who are more than 6 months old.

^bSevere acute respiratory infection (ARI) was defined as respiratory distress (Official Mexican Norm NOM 033-SSA2-1993).

^cNutritional status assessed by body mass index according to Child Growth Standards (World Health Organization). There were 30 children in whom it was not possible to measure weight or height.

^dOverweight or obesity was included in excess weight.

In addition to determining the frequency of the viruses in each of the two groups in our study, we investigated whether a virus was associated with the severity of ARI. Our results showed that hMPV was associated with patients who presented with a severe ARI similar to that found in other populations [39-41]. Owing to the hMPV association with a greater severe clinical profile and its high frequency in our population, the results indicate that it is necessary to enhance surveillance for ARI in order to identify hMPV as an emerging virus, similarly to what is carried out with IF in the Mexican population.

The presence of more than one type of virus in the same patient has been an interesting topic that has led us to investigate the importance and clinical relevance of a coinfection. In some populations, coinfection with multiple respiratory viruses is a possible risk factor for complications of ARI. However, this has not occurred consistently in all of the studies [8,11,42]. The frequency of coinfection in our study was 31.62%, and according to our results, this did not create conditions for a different severity of ARI compared with those with a simple infection. Disagreements about the impact of a viral coinfection on the clinical manifestations may be due to the sample collection period, the amount and type of virus detected, viral detection technique, and the characteristics of the population. On

the other hand, we should consider that, owing to its cross-sectional design, our study did not follow the evolution of the clinical profile.

Little is known about viral coinfections and the variables influencing them. We analyzed some risk factors for infection with multiple viruses. Interestingly, by conducting a multivariate analysis, we found that certain types of viral etiology were significantly associated with the presence of coinfections: PIV, HBoV, hMPV, and RSV. Similar to what we found, RSV, hMPV, and HBoV have been reported as having a high frequency in infections with more than one virus [43-45].

Moreover, factors other than etiological agent may influence the development of ARI. In this regard, many research groups have investigated those factors that may be modifiable and that have an impact on the health of the population. Breastfeeding, exposure to smoke of wood or cigarettes, nutritional status, and variables related to housing have been reported as possible factors impacting the evolution of respiratory infections (reviewed in [12,46]). In this study, we evaluated breastfeeding, age of less than 6 months, chronic illness, floor type in the house, exposure to wood smoke, and overcrowding as possible factors related to viral coinfection. Of these, age of less than 6 months was found to be a risk factor for coinfection only when the disease is caused by PIV.

Table 5 Multivariate analysis of identified risk factors for coinfections

	Non-adjusted model			Adjusted model ^a		
	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
RSV	2.8	1.03-7.68	0.045	3.09	1.13-8.60	0.025
Age < 6 months	2.50	0.80-7.90	0.12	-	-	-
Male	1.10	0.43-2.79	0.84	-	-	-
Overcrowding	2.53	1.03-6.34	0.047	-	-	-
hMPV	3.35	1.40-8.06	0.008	3.84	1.57-9.37	0.003
Age < 6 months	2.14	0.66-6.96	0.21	-	-	-
Male	0.97	0.37-2.52	0.95	-	-	-
Overcrowding	2.6	1.02-6.62	0.046	-	-	-
hRV	2.43	0.82-7.21	0.110	-	-	-
Age < 6 months	2.45	0.78-7.85	0.12	-	-	-
Male	1.26	0.50-3.20	0.61	-	-	-
Overcrowding	2.75	1.10-6.87	0.030	2.56	1.07-6.13	0.034
IF	2.05	0.54-7.78	0.29	-	-	-
Age < 6 months	2.58	0.64-7.97	0.16	-	-	-
Male	1.08	0.43-2.71	0.87	-	-	-
Overcrowding	2.57	1.04-6.34	0.041	2.58	1.07-6.13	0.034
PIF	17.72	1.8-165.22	0.012	17.80	1.92-165.30	0.011
Age < 6 months	3.25	1.06-10.60	0.040	3.33	1.07-10.39	0.038
Male	1.03	0.40-2.70	0.95	-	-	-
Overcrowding	2.95	1.13-7.67	0.027	2.98	1.15-7.85	0.025
hAD	2.88	0.89-9.31	0.083	-	-	-
Age < 6 months	2.83	0.90-8.84	0.074	-	-	-
Male	1.34	0.49-3.74	0.61	-	-	-
Overcrowding	2.64	1.06-6.57	0.037	2.58	1.07-6.13	0.034
hBoV	5.93	1.75-20.10	0.004	5.83	1.74-19.53	0.004
Age < 6 months	2.67	0.84-8.48	0.095	-	-	-
Male	1.06	0.41-2.74	0.91	-	-	-
Overcrowding	3.02	1.17-7.80	0.023	2.90	1.14-7.34	0.025

Odds ratio (OR) was obtained by logistic regression. ^aAdjusted model variables used for adjusting do not show their OR, CI (confidence interval). hMPV: human metapneumovirus; hAD: human adenovirus; RSV: respiratory syncytial virus; hRV: human rhinovirus; hBoV: human bocavirus; IF: influenza virus; PIF: parainfluenza virus.

Furthermore, overcrowding, which in the univariate analysis had been identified as a factor independently associated with the presence of coinfection, kept this association in the multivariate analysis only when the ARI is caused by hRV, IF, PIF, hAD, and hBoV. Overcrowding is common in developing countries, where the presence of a large number of people in a single room used for sleeping favors the transmission of different pathogens, and children are the most vulnerable to acquire and develop the infection, and it was reported that this housing characteristic was a risk factor for ARI [47,48]. In a meta-analysis to find factors

associated with severity of respiratory infections, it was found that overcrowding conferred a meta-estimated OR of 1.9 (95% CI 1.5 to 2.5) [12]. Interestingly, in a study conducted in refugee camps in Kenya, the frequency of respiratory viruses was determined, and hAD, RSV, hMPV, PIF, and IF (in descending order) were found to be the most prevalent in circumstances characterized by a great number of people in a single space [35]. It is noteworthy that most of the population in our study is located in one of the most populated metropolitan areas in Mexico, suggesting that overcrowding still occurs. Thus, the characteristics of housing continue to be a factor for health problems in the Mexican population, and overcrowding does not occur only in rural areas [14,49].

There are some limitations to our study. First, this research was conducted only from December 2012 to April 2013 (in Mexico, winter begins on December 20), and so we might be overestimating the frequency of some viruses if the study coincided with the peak incidence of any of them or we might be underestimating if it did not. Second, this study did not look for any bacteria in the samples. It has been found that some viruses bring on bacterial infections and this condition could influence these signs and symptoms present during infection [50]. This topic is very interesting and needs to be developed in future research. Third, the study included patients who went to the emergency department, which is usually required when patients develop complications of ARI. Therefore, to have a better understanding of the influence of viral etiology on the clinical spectrum of the disease, it would be interesting to study patients with different degrees of respiratory infection severity, including ambulatory patients from outpatient clinics and hospitalized patients as well as asymptomatic subjects, given that respiratory viruses have been found in children without symptoms of ARI [51]. In the future, it would also be desirable to conduct further studies that completely follow the clinical course of patients with ARI.

Conclusions

In conclusion, viral coinfections have a high frequency in the population of Mexican children treated in the emergency department in this population, overcrowding is a significant risk factor that allows contact of the host with multiple pathogens, but the coinfection depends on the type of virus occurring in the infection. hMPV is a common virus in the population we studied and is significantly associated with severe ARI, a situation that seems to create conditions for an increase in medical attention in the emergency department. Therefore, this virus could represent a major health burden among Mexican children.

Additional file

Additional file 1: Methods PCR.

Abbreviations

ARI: Acute respiratory infection; OD: Otitis media; MPM: Human metapneumovirus; HAd: Human adenovirus; RSV: Respiratory syncytial virus; HRV: Human rhinovirus; hMPV: Human bocavirus; IF: Influenza virus; PF: Parainfluenza virus; CI: Confidence interval.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

HRI and JMA designed the research. JI, CR-A, and HM wrote the manuscript. JI, CR-A, and IS performed the experiments. RCH, CL, and IM standardized the method for viral detection. JI, CR-G, JAA, MSA, RC-C, HRL, and HRI carried out data analysis. MSA, RCH, and CLGA collected the samples and conducted medical/clinical interpretations. All authors contributed to the final interpretation of results and assisted in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

JJI (811895), CR-G (834828), and CR-A (836923) are recipients of a scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (National Council for Science and Technology). We thank Adriana Landi-Carreira for her valuable technical assistance in this study, Susana López for her advice in the RT-PCR detection, and for providing the sequence of the oligonucleotides, Julio Santiago Dour for his assistance in the detection of HRV and Programa para el Desarrollo Profesional Docente (Professional Teacher Development Program) for financial support.

Author details

¹Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana, Av. Luis Carrasco Ayala s/n, Col. Industrial Armas, 91180 Xalapa, Veracruz, México. ²Centro de Ciencias Biomédicas, Universidad Veracruzana, Av. Luis Carrasco Ayala s/n, Col. Industrial Armas, 91180 Xalapa, Veracruz, México. ³Hospital Civil de Guadalupe "Dr. Juan C. Miranchal", Salvador Guerrero y Zuleta 750, Col. La Peña, 44100 Guadalupe, Jalisco, México. ⁴Facultad de Química Farmacéutica Biológica, Universidad Veracruzana Lomas del Estero s/n, Col. Zona Universitaria, 91000 Xalapa, Veracruz, México. ⁵Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Prolongación de Oriente 6, 9006 Col. Rafael Aranda, 94340 Orizaba, Veracruz, México. ⁶Unidad de Procedimientos Preparativos y de apoyo a servicios de Previsión, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad, Col. Ciudad Universitaria, 04510 Colonia-Federal, México.

Received: 9 December 2014 Accepted: 24 March 2015

Published online: 18 April 2015

References

- Rubin I, Boockvar C, Kojouhar Z, Mulholland K, Campbell H. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. *Bull World Health Organ*. 2009;67:66-76.
- Lu L, Johnson HB, Cousens L, Peen L, Scott S, Lawn SD, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*. 2012;379:2111-61.
- Mackay RL. The classification of viruses infecting the respiratory tract. *Fam Pract Respir Rev*. 2003;4:84-88.
- Harcmond S, Charney E, Durbin JE. Respiratory virus infection in infants and children. *Pediatr Dev Pathol*. 2002;101:73-86.
- Srinivas CA. Viral pneumonia in children: incidence and aetiology. *Fam Pract Respir Rev*. 2010;18(Suppl A):197-200.
- Dawson-Caswell M, Mancini JH. Respiratory syncytial virus infection in children. *Am Fam Physician*. 2011;83:141-6.
- Sabat M, Gough PJ, Mitty MM, Yu PL, Mitchell J, Smith P, et al. The role of mortality among young children hospitalized for severe respiratory syncytial virus infection. *Fam Pract Respir Rev*. 2011;13(Suppl 2):1-8.
- Hasegawa Y, Kurokawa R, Yoshida EM, Minoh N, Suzuki M, Akimoto S, et al. Does respiratory virus co-infection increase the clinical severity of acute

- respiratory infection among children infected with respiratory syncytial virus? *Pediatr Infect Dis J*. 2012;51:441-1.
- Hall CB, Worthington GA, Iwane BB, Blumberg NG, Edwards KM, Staat MA, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med*. 2009;360:588-96.
- Pavia AT. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clin Infect Dis*. 2011;52(Suppl 4):S294-299.
- Sly PD, Jones CM. Viral co-infection in infants hospitalized with respiratory disease: is it important to detect? *J Pediatr Res*. 2011;87:277-80.
- Jackson L, Mathew RH, Poljanec D, Falciano R, Rubin I, Campbell H, et al. Risk factors for severe acute lower respiratory infections in children: a systematic review and meta-analysis. *Cochrane Med J*. 2011;54:170-21.
- Ministry Official System NOM-021-SSA2-1988. Ministry of Health of Mexico. To care for the child's health. 2001.
- National Population Council. Appendix C Methodology for Estimating Urban Magnification Index. (http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Indice_de_magnificacion_urbana_2010)
- Valverde AG, Barfield B, Sibbald B, Salsbery C, Ireland M. Defining comparability: implications for understanding health and health services. *Am Fam Med*. 2009;71:7-13.
- World Health Organization. Child Growth Standards (http://www.who.int/childgrowth/standards/inf_parc_inf/inf.html)
- World Health Organization. Guidelines for the collection of human specimens for laboratory diagnosis of acute influenza infection (http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/virology_administration_and_sociodemographic_collection_HONI_humans/en/index.html)
- Smith H, Henle D. Human bocavirus in hospitalized children. *South Africa. Emerg Infect Dis*. 2008;14:1437-8.
- Dobay C. Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol*. 1998;36:1749-54.
- Almagro PL, Al-Jarrah A, Ballew M, Lam A, Giamprini L, Arora HD. Prevalence of respiratory syncytial virus infection in health-care during the winter season 2007-2008 and different risk factors impact. *Int J Med*. 2009;114:4-12.
- Landi-Carreira A, Morales-Romero L, Garcia-Roman R, Cobos-Curros AG, Mendez E, Otero-Luxon C, et al. Clinical characteristics and genetic variability of human bocavirus in Mexico. *Virom*. 2012;4:250-50.
- Reed TC, Brown JC, Li Y, Caswell M, Humphrey C, Omerovic AD, et al. Characterization of human metapneumovirus isolated from patients in North America. *J Infect Dis*. 2002;185:1660-6.
- Smith HE, Eisenmeyer J, Smith L, Smith T. Human metapneumovirus infection in South African children hospitalized with respiratory tract disease. *S Afr Med J*. 2004;94:1259-61.
- National Health Information System (<http://snis.salud.gob.mx/index.html>)
- Pringle N, Fujisaki S. Pediatric human metapneumovirus infection: epidemiology, prevention and therapy. *J Clin Med*. 2014;3:141-7.
- Pardo L, Mohamad MB, Pena L, Riera S. Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen. *Int J Infect Dis*. 2014;28:48-52.
- Tabares CA, Weng-Chew H, Human metapneumovirus in children with influenza-like illness in Tuxtla, Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76:102-3.
- Noysa DE, Alpuerto-Solis AG, Herrera-Dour A, Sierra-Correa BE, Sanchez-Alvarado L, Lopez-Rovilla R. Human metapneumovirus infections in Mexico: epidemiological and clinical characteristics. *J Med Microbiol*. 2009;54:969-74.
- Morales-Romero L, Alpuerto-Solis AG, Zavala-Chavez V, Sanchez-Alvarado L, Herrera-Dour A, Noysa DE. Human metapneumovirus and other respiratory viral infections in children attending a day care center. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;48:1038-41.
- Milán E, Arnold JC. Human metapneumovirus and human bocavirus in children. *Pediatr Res*. 2009;65:788-809.
- Rodríguez-Aud JF, Nava-Frías M, Casade-Pérez L, Johnson HB, Navafrías A, Ponce-Rubén V, et al. The epidemiology and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infection in children at a public pediatric referral hospital in Mexico. *Int J Infect Dis*. 2012;36:528-33.
- Weng-Chew H, Farfan-Guero R, Sanchez-Puerta A, Nava-Frías M, Casade-Pérez L, Santos-Perdomo J. Frequency of respiratory viruses and clinical characteristics in children attending a care center in Mexico City. *Salud Pública Mex*. 2012;54:26-32.
- Lu Y, Wang Z, Zhang L, Xu C, Han C, Wang Z, et al. Epidemiology of human respiratory viruses in children with acute respiratory tract infections in Jiang. *China Clin Dev Immunol*. 2013;2013:10498.

34. Reichell C, Garber K, Daly J, Paula AT, Bangson G. Adenoviral infections in children: the impact of rapid diagnosis. *Pediatrics*. 2004;113(5):1–6.
35. Ahmed JA, Katz MA, Aduki E, Njenga MK, Winkberg M, Kapella BK, et al. Epidemiology of respiratory viral infections in two long-term refugee camps in Kenya, 2007–2010. *BMC Infect Dis*. 2012;12:7.
36. Videla C, Carbajal G, Marfan A, Aguila M. Acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus and adenovirus among hospitalized children from Argentina. *Clin Diagn Virol*. 1996;10:17–21.
37. Kaku SI, Loebelholz M, Beck E, Pined JA, Resai K, Fan J, et al. Persistence of adenovirus nuclear coat II nasopharyngeal secretions: a diagnostic conundrum. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29:746–50.
38. Marin J, Iribarriza D, Izusti K, Marín V. Persistence of viruses in upper respiratory tract of children with asthma. *J Infect*. 2003;4:169–72.
39. Wilkemann A, Schödlgen D, De-Haerling AM, Galloway T, Gabrel T, Linnas M, et al. Human metapneumovirus infections cause similar symptoms and clinical severity as respiratory syncytial virus infections. *Eur J Pediatr*. 2008;183(4):471–75.
40. Cebalga M, Carducci F, Corvino ER, Clement M. The role of infections and cofactors with newly identified and emerging respiratory viruses in children. *Virus J*. 2012;9:247.
41. Janti T, Janti L, Raastanen O, Soderlund-Renonen M. New respiratory viral infections. *Curr Opin Pulm Med*. 2012;18(2):71–8.
42. Pasarlo-Bacale G, Koushan-Pasali F, Richard N, Verret G, Lina B, Pavesi D. Novel respiratory virus infections. *J Clin Virol*. 2008;43:407–10.
43. Stempel HE, Martin ET, Kuppert L, England JA, Zur DM. Multiple viral respiratory pathogens in children with bronchiolitis. *Acta Paediatr*. 2009;98:123–6.
44. Cilla G, Orzan E, Penco-Luca EG, Morici M, Viorio G, Penco-Talero E. Virus in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: High rate of viral coinfection. *J Med Virol*. 2008;80:1940–6.
45. de Silva EE, Piment MC, Amato E, Martello R, Sena EE, de Paula RL, et al. Severe lower respiratory tract infection in infants and toddlers from a non-affluent population: viral etiology and co-detection as risk factors. *BMC Infect Dis*. 2013;13:49.
46. Braubach M, Jochim CE, O'Meara D. Environmental burden of disease associated with inadequate housing. World Health Organization. 2011. www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0001/14257/1095004.pdf
47. Bana A, Tawak M, Fouad SF. Determinants of respiratory distress in East Sudan. *BMC Res Notes*. 2013;6:254.
48. Sankha MB, Nandan-Pwari SB, Kumar MC, ul Haque F, Raju CS, Modhale MB. Factors for acute lower respiratory tract infections. *Indian J Pediatr*. 2007;74(4):77–82.
49. Epidemiological Profile of Children in Mexico. www.epidemiologia.salud.gob.mx/dicms/infoped/publicaciones/2011/monografias/P_EP_IDE_IJA_INFANCIA_EN_MEXICO_2010.pdf
50. Harcourt JM, Krasner JL, Flew A, Wolf TF. Respiratory viral infection predisposing for bacterial illness: a canine model. *PMS Immunol Med Microbiol*. 1996;26:180–85.
51. Achari S, Sriniganta A, Ponnar M, Valumalai A, Mishra AM. Detecting respiratory viruses in asymptomatic children. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;51:1021–6.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



UniverSalud

REVISTA DEL INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA
DE LA UNIVERSIDAD VERACRUZANA

EDITORIAL

12 años de Altepepaktli, hoy UniverSalud
Oscar Efraim Arriaga Holguera

ARTÍCULOS ORIGINALES Y ENSAYOS

Relación entre los niveles séricos de ceruloplasmina y obesidad en estudiantes
Maria del Carmen Torres Valencia, Sara Ortaqui-Cotlerrez, Fernando Ciro López-Fernández, Roberto Cattanedo-Hernández, Aurora Díaz-Vega y Mario González-Santos

Estructura factorial exploratoria en torno a variables relativas a la interrupción del embarazo en estudiantes
Erne García-Lirio, María de Lourdes Mercedes Flores, Agustín Mondéz Martínez, María de Los Angeles Delgado Carrillo, Felipe de Jesús Vilchis Mora y Sofía López de Nava Tapia

Promoción de la salud: propuesta universitaria con trabajo intergeneracional
Sandra Areli Sosa Ibarra y Sebastián Figueroa Rodríguez

Leptospirosis: generalidades de la enfermedad
Rocio Coutado Rodríguez, Inel Rivas-García, Yolanda Campos Escanda, Socorro Fernández y Everest de Igartua-López

A Starry Mind: Vincent Van Gogh and His Mental Illness
Victor Hugo Contreras Gutiérrez

Identificación de virus sincitial respiratorio en niños con infección respiratoria aguda atendidos en Xalapa, Veracruz
Gustavo Pérez-Gil, Milva Montero, Jaime Morales-Romero, Adriana Linda-Carlósa y Felipe Pitanda

MICROBIOMAS

2007-3526(201603)12:23:1-0



FACTORES DE RIESGO

2007-3526(201603)12:23:1-0

2007-3526(201603)12:23:1-0

SUICIDIO

2007-3526(201603)12:23:1-0

2007-3526(201603)12:23:1-0

INFECCIONES RESPIRATORIAS



Identificación de virus sincitial respiratorio en niños con infección respiratoria aguda atendidos en Xalapa, Veracruz

Identifying the Human Respiratory Syncytial Virus in Children with Acute Respiratory Infection Treated in Xalapa, Veracruz

Custavo Pérez-Gil,¹ Hilda Montero,^{1*} Jaime Morales-Romero,² Adriana Landa-Cardena³ y Felipe Pitalúa⁴

Recibido: 19 de junio de 2015

Aceptado: 10 de octubre de 2016

RESUMEN

Introducción. El virus sincitial respiratorio (VSR) es una de las principales causas de enfermedades de vías respiratorias bajas en niños. Debido a su tropismo a través de una amplia variedad de tejidos y su presencia en muchas secreciones corporales este virus cuenta con un extenso modo de transmisión, ocasionando grandes epidemias y elevando su tasa de morbilidad y mortalidad. El objetivo de este estudio fue identificar la presencia de VSR en niños con infección respiratoria aguda (IRA), atendida en una institución de salud de Xalapa, Veracruz.

Métodos. Se analizaron 89 muestras de exudados nasofaríngeos y, de manera concomitante, se aplicó un cuestionario para recolectar información clínica y sociodemográfica del paciente. La detección de VSR se realizó mediante retro transcripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR y PCR). Se buscó asociación significativa entre la presencia del virus y el tipo de atención del paciente.

Resultados. Se encontró que el VSR está asociado a niños que requirieron hospitalización.

Conclusiones. El VSR se encuentra presente en nuestro medio y predomina en niños menores de 6 años de la región de Xalapa hospitalizados por IRA.

Palabras clave: Virus sincitial respiratorio, infecciones respiratorias.

ABSTRACT

Respiratory Syncytial Virus (RSV) is one of the main lower respiratory tract diseases among children. RSV is widely transmitted because of its tropism for a large variety of body tissues and its presence in many body fluids. All of this causes large scale epidemics and increases the morbidity and mortality rates. This study aimed to identify the presence of RSV in children treated at a medical institution located in Xalapa, Veracruz.

Methods. We analyzed 89 samples of nasopharyngeal fluids and we concomitantly conducted a questionnaire to collect clinical and sociodemographic data. RSV detection was performed by reverse transcription polymerase chain reaction and polymerase chain reaction (RT-PCR and PCR). We searched significant association between RSV presence and classification of patient care.

Results. We found significant association between RSV and hospitalized children.

Conclusions. We detected RSV in children under the age of 6 from Xalapa and hospitalized for ARI.

Keywords: Respiratory syncytial virus, acute respiratory infection in children.

1 Estudiante, Doctorado del Centro de Ciencias Biomédicas, Universidad Veracruzana, México.

2 Académico investigador y autor de correspondencia, Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana, México. *hmontero@uv.mx

3 Académico investigador, Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana, México.

4 Asistente de investigador, Laboratorio de Ecología y Salud, Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana, México.

5 Médico adscrito al Hospital Regional de Xalapa, Dr. Luis F. Natchin, SESVR, México.

Introducción

El Virus sincitial respiratorio (VSR) es reconocido como una de las principales causas de enfermedades de vías respiratorias bajas en niños.¹ La infección por este virus causa hasta 90,000 casos de hospitalización al año.² En Estados Unidos se ha determinado que es una causa de morbilidad en niños hospitalizados y ambulatorios.³ Algunos estudios han sugerido que la infección por VSR puede agravarse en coinfecciones con otros virus respiratorios⁴ e incluso incrementar el riesgo de mortalidad⁵ en presencia de enfermedades cardíacas congénitas y displasias broncopulmonares.⁶

El VSR pertenece a la familia *paramyxoviridae* y está clasificado dentro del género *pneumovirus*. Es altamente contagioso, y la mayoría de los niños lo han contraído antes de los dos años de edad desarrollando infecciones severas como la bronquiolitis.⁷ La infección por este virus no se limita a infantes, sino que también puede infectar a personas de cualquier edad, ocasionando complicaciones o la muerte en adultos mayores y en personas inmunocomprometidas.^{8,9} Una de las características de este virus es que las infecciones pueden ser recurrentes, además, a partir de diversos estudios, se ha propuesto que puede llegar a provocar infecciones persistentes, incluso asma.^{10,11}

El VSR tiene un tropismo (especificidad por ciertos tejidos) que no está totalmente caracterizado. Recientemente se ha encontrado a este virus, o a su genoma, en ojos, sangre, hígado, fluido cerebroespinal y miocardio,¹²⁻¹⁴ también se le ha hallado en secreciones nasales, saliva, sudor y heces fecales,¹⁵ lo que podría constituir un extenso modo de transmisión que ocasiona grandes epidemias y eleva la tasa de morbilidad y mortalidad, si no se cuenta con las medidas de control adecuadas. El propósito de este trabajo fue identificar la presencia de VSR en niños veracruzanos menores de 6 años que presentan IRA y que acuden a una unidad de salud de segundo nivel de atención en la ciudad de Xalapa, Veracruz; además de analizar si la presencia de VSR podría estar relacionada con la hospitalización del paciente. **Método**

Diseño de estudio

Se realizó un estudio transversal analítico en donde se incluyó a pacientes pediátricos con infección respiratoria aguda, atendidos en una institución de salud de segundo nivel de atención, ubicada en Xalapa, Veracruz, México. Los criterios de inclusión fueron edad menor de 6 años, diagnóstico médico de infección respiratoria aguda y haber solicitado atención médica en el periodo comprendido de diciembre de 2010 a septiembre de 2011. Mediante muestreo no probabilístico, los sujetos seleccionados se clasificaron de acuerdo con el tipo de atención médica recibida como pacientes hospitalizados (aquellos que requirieron ingresar al servicio de pediatría para continuar el tratamiento médico de la IRA) o pacientes ambulatorios (quienes no requirieron hospitalización y continuaron el tratamiento médico en su hogar).

Un encuestador, previamente capacitado, aplicó un cuestionario estructurado dirigido a los padres o tutores legales de los niños para recabar la siguiente información: nombre, edad, sexo, cuadro clínico y características de la vivienda. Adicionalmente, se revisó el expediente clínico para complementar o corroborar la información requerida.

Muestras clínicas y detección de VSR

A cada sujeto de estudio se le tomó una muestra de exudado nasofaríngeo para la identificación de VSR mediante la técnica RT-PCR y PCR, y usando como control positivo una cepa de VSR cepa long, proporcionada por la Doctora Beatriz Gómez de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El protocolo para la colección, transporte y almacenamiento de las muestras, así como de la extracción del genoma viral y la técnica de RT-PCR han sido reportados previamente.¹⁶

Consideraciones éticas

El protocolo de estudio fue aprobado por el comité de investigación de la Secretaría de Salud del Estado de Veracruz y por el hospital sede del estudio. Los padres o tutores legales de los infantes incluidos autorizaron por escrito su consentimiento informado.

Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva: frecuencias, proporciones, media y desviación estándar. La comparación de proporciones se obtuvo mediante la prueba chi-cuadrada. La asociación entre el tipo de atención médica recibida (hospitalización o ambulatoria) y la presencia de VSR se midió a través de razón de momios (OR) de prevalencia con sus respectivos intervalos de confianza al 95% (IC95%). Un valor de p menor de 0.05 se consideró estadísticamente significativo. Los análisis fueron realizados a través de los programas estadísticos SPSS versión 18 y Epi info versión 7.

Resultados

De 106 pacientes incluidos inicialmente, se excluyeron 17 (16%) a los que no se les pudo extraer una muestra de exudado nasofaríngeo. De los 89 pacientes incluidos en el análisis, un 55.1% fue de sexo masculino, además 66 (74.2%) recibieron atención ambulatoria y 23 (25.8%) se encontraban en hospitalización por IRA. En la Tabla 1 se presentan las características clínicas y algunas sociodemográficas de los sujetos de estudio de acuerdo con el tipo de atención médica recibida. En general, los pacientes hospitalizados tuvieron una edad menor y mayor frecuencia de los síntomas respiratorios, con excep-

Tabla 1. Características demográficas, clínicas y otras de los pacientes

	Hospitalizados n=23	Ambulatorios n=66
Edad (meses) media \pm SD	14.21 \pm 15.72	20.53 \pm 17.25
Edad \leq 1 año	14/23 (60.9)	28/66 (42.4)
Género (femenino)	8/23 (34.8)	32/66 (48.5)
Clinicos, n/n (%) [Valores perdidos]		
Flujo nasal	18/23 (78.3)	62/66 (93.9)
Tos	22/23 (95.7)	61/66 (92.4)
Fiebre	15/23 (65.2)	14/66 (21.2)
Disnea	23/23 (100)	33/66 (50)
Apnea	7/23 (30.4)	8/66 (12.1)
Sibilancias	19/23 (82.6)	40/66 (60.6)
Diarrea	7/23 (30.4)	14/66 (21.2)
Lagrimeo	9/23 (39.1)	27/66 (41.5) [1]
Dolor de garganta	13/15 (86.7) [8]	24/45 (53.3) [21]
Somnolencia	11/21 (52.4) [2]	32/66 (33.8) [1]
Ojos irritados	8/23 (34.8)	19/66 (28.8)
Hundimientos intercostales	14/23 (60.9)	6/66 (9.1)
Prescripción de antibióticos	15/21 (71.4) [2]	12/42 (28.6) [24]
Otros, n/n (%) [Valores perdidos]		
Madres cocinaban con leña	13/23 (56.5)	18/66 (27.3)
Hacinamiento (comparte dormitorio con 3 o más personas)	15/23 (65.2)	22/66 (33.3)
Vivienda con piso de tierra	2/23 (8.7)	8/64 (12.5) [2]
Casa con techo de lámina	14/23 (60.9)	19/63 (30.2) [3]
Casa no cuenta con servicio de agua potable	3/23 (13.0)	8/66 (12.1)

n/n=Proporción de sujetos con la característica de interés del total de sujetos con datos disponibles

Tabla 2. Asociación de infección por VSR y el tipo de atención hospitalaria

	Hospitalizados n=23	Ambulatorios n=66	OR (IC 95%)	Valor de p
Infección por VSR n/n (%)	11/23 (47.8)	4/66 (6.1)	14.20 (3.86 a 52.16)	< 0.05

n/n=Proporción de sujetos con la característica de interés del total de sujetos con datos disponibles.

El valor de p fue obtenido mediante la prueba Chi cuadrado.

IC, intervalo de confianza; OR, razón de momios; VSR, Virus sincitial respiratorio.

ción del flujo nasal y lagrimeo. Respecto a las características de la vivienda, los niños hospitalizados tuvieron mayor frecuencia, en el antecedente de exposición al humo de leña, hacinamiento y hogares de techo de lámina, que los niños con atención ambulatoria.

De acuerdo con los resultados de RT-PCR, el VSR se identificó en el 47.8% de los hospitalizados, mientras que en los ambulatorios, sólo se encontró en el 6.1%, lo que nos arroja una asociación estadísticamente significativa (OR=14.20, IC95% 3.86-52.16, $p<0.05$) (Tabla 2).

Discusión

En nuestro conocimiento, este estudio es el primero en describir la frecuencia de infecciones por VSR en una población de pacientes pediátricos atendida en Xalapa, Veracruz. Es importante señalar que la unidad de salud sede de este estudio corresponde a una institución que da cobertura a una zona importante del estado de Veracruz, por lo que nuestros resultados tienen implicaciones más allá del ámbito local. En cuanto a los signos y síntomas que son característicos de las infecciones respiratorias agudas, éstos pueden ser muy variados.¹⁸ Como era de esperarse, la fiebre, la dificultad respiratoria, las sibilancias y el tiraje intercostal, entre otros datos de infección respiratoria, tuvieron mayor frecuencia en el grupo de pacientes hospitalizados, lo que nos indica un cuadro de mayor severidad que el de los sujetos tratados de forma ambulatoria.

En este mismo sentido, tampoco resulta sorprendente que se haya observado una mayor frecuencia de niños con menor edad en el grupo hospitalizado.²⁰ Finalmente, también resulta interesante que características de la vivienda como la exposición a humo de leña, el hacinamiento y el techo de lámina fueran más frecuentes en pacientes hospitalizados, ya que algunas publicaciones han mencionado estas asociaciones.^{11,18}

Nuestros resultados indican que la infección por VSR está fuertemente asociada con la hospitalización por IRA en este grupo de estudio. Al respecto, se estima que el VSR genera alrededor de 34,000,000 de IRAs de vías inferiores en todo el mundo; siendo las incidencias en países en vías de desarrollo dos veces más altas que las de los países industrializados.¹⁸ En un meta-análisis realizado en 2013 con estudios elaborados entre 1995 y 2011 con niños de 0 a 4 años de edad con presencia de IRAs bajas, se determinó que existía una proporción de 50.4% de infección por un virus, incluido VSR, en todos los casos de pacientes hospitalizados con episodios severos de IRA bajas.²⁰ En este estudio no se da una proporción que englobe únicamente casos de hospitalización por IRA causada por VSR por considerar que el rol de este virus, así como otros agentes causales como *S. pneumoniae* y *H. influenzae* se encuentran caracterizados y bien establecidos en una publicación previa.¹⁸ Por otro lado, en un meta-análisis de 15 artículos que representan 82,008 casos, el 1.9% de éstos corresponden a casos de hospitalización por infección con VSR durante los

primeros 3 años de vida.¹¹ En nuestro análisis determinamos que de 89 pacientes menores de 6 años que fueron atendidos por IRA en una institución de Salud de la ciudad de Xalapa, Veracruz, 11 casos que dieron positivo a VSR requirieron de hospitalización, lo cual representa un 12.4%, cifra mayor a lo que se ha reportado en otros países.¹¹ También se debe hacer énfasis en que, en múltiples ocasiones, ante un cuadro clínico más severo de los pacientes hospitalizados, el médico toma la decisión de administrar antibióticos, lo cual es una práctica muy común en diversos países, sobre todo cuando se carece de cultivo bacteriano y de la detección temprana de patógenos como los virus.^{11,12}

Para hacer una adecuada extrapolación de nuestros resultados es necesario mencionar las limitaciones principales de esta investigación y sus posibles sesgos: en principio, nuestro trabajo incluyó una muestra pequeña, la cual, aunque no fue un obstáculo para encontrar asociación entre el agente viral y la hospitalización, nos limitó en el desarrollo de un análisis multivariado que permitiera explorar la participación de otras covariables; por otro lado, la naturaleza transversal del diseño no permitió indagar adecuadamente otros posibles factores de riesgo para hospitalización por IRA; finalmente, la falta de aleatorización de los sujetos de estudio podría ser la limitante más importante y esto deberá considerarse en estudios futuros, los cuales, tendrían la posibilidad de dar seguimiento a la evolución clínica de la infección respiratoria por VSR, así como a la determinación de los genotipos circulantes en esta

población mediante estudios de genotipificación y caracterización molecular. Respecto a posibles errores sistemáticos, consideramos que no se produjo un sesgo de selección al haber incluido niños atendidos solamente en una unidad de segundo nivel de atención, por lo contrario, al hacerlo de esta manera tenemos la certeza de que todos los niños tuvieron la oportunidad de ser hospitalizados si hubiera sido necesario, por lo que los resultados continúan siendo válidos. Pudo haberse dado la situación contraria si algún niño que requiriera de hospitalización hubiese sido tratado de forma ambulatoria por motivos no médicos, empero, de haber sucedido lo anterior, consideramos que habría sido en una frecuencia mínima.

En conclusión, este trabajo documenta que el VSR se encuentra en nuestro medio y que predomina en niños menores de 6 años de edad con IRA que requiere hospitalización para su tratamiento. Mayores estudios son requeridos para conocer con mejor detalle la situación epidemiológica de este agente y su impacto en la población pediátrica de la zona de Xalapa.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por la subvención 109397 y por la beca otorgada al becario del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Veracruzana con el No. 281310 proporcionados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Referencias bibliográficas

1. Hammond S, Chenevier E, Durbin JE. Respiratory virus infection in infants and children. *Pediatr Dev Pathol.* 2007;10(3):172-188.
2. Dawson-Caswell M, Muncie HL. Respiratory syncytial virus infection in children. *Am Fam Physician.* 2011;83(2):141-146.
3. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med.* 2009;360(6):588-598.
4. Harada Y, Kinoshita F, Yoshida LM, Minh le N, Suzuki M, Morimoto K, et al. Does respiratory virus coinfection increase the clinical severity of acute respiratory infection among children infected with respiratory syncytial virus? *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32(5):441-445.
5. Szabo SM, Gooch KL, Bibby MM, Vo PC, Mitchell I, Bradt P, et al. The risk of mortality among young children hospitalized for severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Respir Rev.* 2013;13(Suppl 2):S1-8.
6. Leung AK, Kellner JD, Davies HD. Respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Natl Med Assoc.* 2005;97(12):1708-1713.
7. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med.* 2005;352(17):1749-1759.
8. Welliver RC. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. *J Pediatr.* 2003;143(5 Suppl):S112-117.
9. Sarmiento RE, Tirado R, Gomez B. Characteristics of a respiratory syncytial virus persistently infected macrophage-like culture. *Virus Res.* 2002;84(1-2):45-58.
10. Sarmiento RE, Arias CF, Mendez E, Gomez B. Characterization of a persistent respiratory syncytial virus showing a low-fusogenic activity associated to an impaired F protein. *Virus Res.* 2009;139(1):39-47.
11. Mohapatra SS, Boyapalle S. Epidemiologic, experimental, and clinical links between respiratory syncytial virus infection and asthma. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(3):495-504.
12. Eisenhut M. Extrapulmonary manifestations of severe RSV bronchiolitis. *Lancet.* 2006;368(9540):988.
13. Birkó V, Musiyenko A, Barik S. Viral infection of the lungs through the eye. *J Virol.* 2007;81(2):783-790.
14. Von Lintow ML, Eugen-Olsen J, Koch A, Winther TN, Westh H, Høgh B. Excretion patterns of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus among young children. *Eur J Med Res.* 2006;11(8):329-335.
15. Diaz J, Morales-Romero J, Perez-Gil G, Bedolla-Barajas M, Delgado-Figueroa N, Garcia-Roman R, et al. Viral coinfection in acute respiratory infection in Mexican children treated by the emergency service: A cross-sectional study. *Ital J Pediatr.* 2015;41(1):33.
16. Rodriguez MH. *Pediatría.* Díaz de Santos; 1994.
17. Fakunle GA, Ana GR, Ayede AI. Environmental risk factors for acute respiratory infections in hospitalized children under 5 years of age in Ibadan, Nigeria. *Paediatr Int Child Health.* 2014;34(2):120-124.
18. Cardoso AM, Coimbra CE, Wernick GL. Risk factors for hospital admission due to acute lower respiratory tract infection in Guarani indigenous children in southern Brazil: a population-based case-control study. *Trop Med Int Health.* 2013;18(5):596-607.
19. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2010;375(9725):1545-1555.
20. Luksic I, Kearns PK, Scott F, Rudan I, Campbell H, Nair H. Viral etiology of hospitalized acute lower respiratory infections in children under 5 years of age -- a systematic review and meta-analysis. *Croat Med J.* 2013;54(2):122-134.
21. Regnier SA, Huels J. Association between respiratory syncytial virus hospitalizations in infants and respiratory sequelae: systematic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32(8):820-826.
22. Gerber JS, Newland JC, Coffin SE, Hall M, Thurm C, Prasad PA, et al. Variability in antibiotic use at children's hospitals. *Pediatrics.* 126(6):1067-1073.
23. Landa-Cardena A, Morales-Romero J, Garcia-Roman R, Cobian-Guemes AG, Mendez E, Ortiz-Leon C, et al. Clinical characteristics and genetic variability of human rhinovirus in Mexico. *Viruses.* 2012;4(2):200-210.

INICIO DE LA TRADUCCION, MANIPULACIÓN TRADUCCIONAL VIRAL Y CÁNCER DESDE EL PUNTO DE VISTA DE eIF4A

eIF4A es una proteína de la familia DEAD box con actividad de ATPasa y helicasa cuya función es de vital importancia en el proceso de inicio de la traducción, ésta se encarga principalmente de que la subunidad ribosomal pequeña sea montada en la región 5'UTR de los mRNA como complejo 48S, si esta tarea no fuese llevada a cabo el ribosoma no puede ser ensamblado en el codón de inicio. Se ha propuesto que la actividad de helicasa de eIF4A deshace estructuras secundarias estables en la región 5'UTR y/o desplaza proteínas de unión a mRNA. Experimentalmente se ha determinado que sin la capacidad de ATPasa y helicasa de eIF4A la síntesis de proteína en la célula no puede llevarse a cabo. Tan altamente regulado es el inicio de la traducción y cada uno de sus componentes que éste puede ser blanco de control durante algunas infecciones virales y el descontrol de alguno de los factores de inicio; entre ellos eIF4A, ha sido correlacionado con algunas enfermedades cancerígenas. El estudio de algunos inhibidores selectivos de eIF4A como hippuristanol, silvestrol y pateamina A ha dilucidado algunos mecanismos de control traduccional viral y el desencadenamiento de algunos cánceres, además estas sustancias han demostrado ser promesas a futuro como terapias farmacológicas anticancerígenas y antivirales.

eIF4A ES UNA ATPasa Y HELICASA PERTENECIENTE A LA FAMILIA DEAD BOX

eIF4A es el modelo de las llamadas helicinas DEAD-box (Revisado en [1, 2]). Las helicinas DEAD-box son un grupo de proteínas caracterizadas por presentar un llamado "helicase core" formado por dos dominios denominados "RecA-like" y una región bisagra flexible central. En los dominios existen 9 motivos conservados denominados "helicase core motif", dichos motivos presentan funciones de unión de ATP, hidrólisis de ATP, unión de RNA y desenrollamiento de RNA dúplex (Revisado en [1-3]). Con base en estos motivos las helicinas se han clasificado en tres grandes superfamilias que son: SF1, SF2 y SF3. Las primeras dos familias presentan los 9 dominios, mientras que la última solo presenta tres (Revisado en [3]). Se ha observado que todos los miembros de la familia muestran actividad NTPasa, pero solo algunos miembros, entre ellos eIF4A, han demostrado poseer actividad de desenrollamiento de RNA dúplex (Revisado en [3]). Las helicinas DEAD-box pertenecientes a las proteínas SF2 están relacionadas en varios aspectos al metabolismo del RNA tales como transcripción, biogénesis ribosomal, splicing de RNA, exportación de RNA, traducción y degradación de RNA (Revisado en [1]). En mamíferos existen tres isoformas de eIF4A que son eIF4AI, eIF4AII y eIF4AIII. eIF4AI y eIF4AII son altamente homólogos en casi un 89 % y son funcionalmente equivalentes, sin embargo responden a procesos regulatorios muy diferentes. En cuanto a eIF4AIII, es homóloga con eIF4AI en un 66% y no tienen equivalencia funcional (Revisado en [4]). En relación con los otros miembros de la familia DEAD-box se dice que eIF4A es una DEAD-box helicasa mínima, ya que posee el helicase core con los motivos conservados característicos y con una región amino-terminal muy corta, pero

sin una extensión carboxilo-terminal que es característica de los demás miembros de la familia, sin embargo, la información que se tiene de esta proteína ha permitido entender los mecanismos funcionales de las proteínas helicicas DEAD-box. También se ha demostrado que eIF4A posee una actividad de ATPasa que es activada por RNA y que la actividad de eIF4A también puede ser regulada por otros factores de inicio de la traducción que provocan las actividades de ATPasa y desenrollamiento y/o la interacción con RNA. Toda la información con que se cuenta de eIF4A la hacen la helicasa DEAD-box mejor caracterizada [1]. eIF4A es sometido a una serie de cambios conformacionales en las que los NTPs están involucrados y es que durante la unión de ATP a eIF4A se produce una hidrólisis de éste, la formación y liberación de ADP; cada uno de estos tres procesos dará como consecuencia un cambio conformacional en eIF4A que afectarán a los dominios del *helicase core* y dependiendo de qué tipo de complejo este unido a los motivos del *helicase core* tendremos un desenrollamiento o un rearrreglo de la conformación terciaria de RNA dúplex, o una ruptura de uniones proteína-proteína o proteína-RNA en el caso de complejos RNA-proteína. Los datos experimentales sugieren que el fosfato gamma de los NTPs es el interruptor de estos cambios conformacionales en los motivos de estas helicicas [5, 6]. Al parecer la actividad de ATPasa resulta crucial para llevar a cabo los procesos de helicasa. Se ha observado que la actividad de hidrólisis de ATP de eIF4A está íntimamente relacionada con la actividad de helicasa, y es que se ha observado que mutantes de eIF4A defectivos en actividad de hidrólisis de ATP también lo son en la actividad de helicasa[7]. Ya se ha planteado que la actividad de ATPasa en eIF4A es

necesaria para los cambios conformacionales que culminan con la actividad de helicasa. ¿Pero cuáles son las implicaciones biológicas de este ciclo de cambios conformacionales? La actividad de helicasa de eIF4A tiene como propósito el desenrollamiento de estructuras dúplex de los mRNA en la región 5' UTR, y es que al parecer la presencia de estas estructuras hacen ineficiente la unión de la subunidad ribosomal 40S en el mRNA (Revisado en [8]), además el grado de estabilidad de las estructuras en la región 5'UTR está relacionado con la cantidad de proteína eIF4A para llevar a cabo la iniciación [9].

eIF4A Y SU ROL EN EL INICIO DE LA TRADUCCIÓN

Los mRNAs eucarióticos presentan en su región 5' UTR estructuras secundarias que pueden dificultar el montaje del complejo 43S; este último se encuentra formado principalmente por la subunidad ribosomal 40S asociada por reciclamiento de ribosomas a las proteínas eIF3, eIF1 y eIF1A y por el complejo ternario o complejo eIF2-GTP-Met-tRNA^{Met}. Por lo tanto es indispensable la presencia de una helicasa capaz de desenrollar estas estructuras secundarias en los mRNAs, sin embargo eIF4A por si misma presenta una actividad de helicasa muy débil por lo que para incrementar esta actividad requiere de la cooperación de los factores eIF4B o eIF4H y formar parte del complejo eIF4F; formado por eIF4G (proteína de andamiaje), eIF4E (proteína de unión a cap), PABP (Proteína de unión al trazo polidensado) y eIF3; esta última durante la adición del complejo 43S (Revisado en [10]). Los estudios realizados por Rogers y colaboradores demuestran que la actividad de helicasa de eIF4A se ve estimulada en presencia de eIF4B y/o eIF4H y cuando es una subunidad de eIF4F; de hecho cuando los

cuatro factores se encontraban presentes se alcanzaba el mayor grado de desenrollamiento de RNA. Además se observó que el mecanismo de desenrollamiento de RNA de eIF4A solo y en forma de subunidad es no procesivo: es decir que son capaces de desarrollar un mínimo número de pares de bases durante el lento proceso de hidrólisis de ATP antes de disociarse del duplex [11-13]. Al parecer eIF4A interactúa con los motivos conservados HEAT-1, HEAT-2 y el motivo de unión entre éstos en eIF4G y simultáneamente interactúa con eIF4H donde eIF4A pasa a ser el núcleo de todo este ensamblaje proteínico, esto además se complementa con el hecho de que la interacción con HEAT-1 de eIF4G, eIF4H y la unión de RNA incrementan la actividad de unión de ATP mientras que la unión al motivo HEAT-2 tiene justo el efecto contrario, además la unión eIF4A-HEAT1 afectan de manera positiva la unión de eIF4A a RNA, mientras que HEAT-2 tiene también el efecto contrario. El modelo propuesto es el siguiente: Para que la subunidad ribosomal 40S pueda ser reclutada al ribosoma es necesario que exista una interacción entre el complejo eIF4F-eIF4H/4B; también llamado complejo de unión al cap y eIF3, además de que las estructuras secundarias en la región 5' UTR del mRNA sean desarrolladas, mientras que en los extremos del mRNA las proteínas eIF4E y PABP se unen a la estructura cap en 5' y al tracto polidensilado en 3' respectivamente [14]. El dominio HEAT-1 además de unirse a la región amino terminal de eIF4A también tiene un sitio de unión para RNA lo que provoca que una porción 5' UTR del mRNA se posiciona entre HEAT-1 y eIF4A, la unión de eIF4E al cap y la posición que adquiere el mRNA entre HEAT-1 y eIF4A deja al mRNA en una posición circularizada. A pesar de la gran

capacidad de helicasa del complejo de inicio de la traducción esta nunca dejará de tener una procesividad limitada, sin embargo éste siempre mantendrá la región 5'UTR preparada para la unión de 40S [15]. Se ha planteado también que la actividad de helicasa de eIF4A como subunidad de eIF4F permite la remoción de proteínas adheridas al mRNA y es que, debido a que los mRNAs proceden del núcleo celular es común encontrarlo recubierto de proteínas o moléculas heterogéneas de ribonucleoproteína (Revisado en [3, 8]). El escaneado del codón de inicio se realiza en dirección 5' → 3', esto es dependiente de hidrólisis de ATP y es posible que los factores eIF1 y eIF1A también intervengan en este proceso. Una vez encontrado el codón de inicio, se produce la unión codón-anticodón lo que lleva a la hidrólisis de GTP por eIF2 y eIF5. Inmediatamente el complejo eIF2-GDP es liberado de 40S; también son disociados eIF1, eIF1A, eIF3 y eIF5 lo que promueve la unión de la subunidad ribosomal 60S. Previamente al ensamblado del ribosoma el complejo eIF5B-GTP se une al complejo e inmediatamente que se forma el ribosoma ocurre una hidrólisis de GTP con lo que es liberado eIF5B-GDP (Revisado en [14]).

EFFECTO DE ALGUNAS INFECCIONES VIRALES SOBRE eIF4A

Algunos virus son capaces de regular la traducción al alterar el complejo de inicio de la traducción eIF4F, y en estos casos los mRNAs virales son traducidos eficientemente mediante mecanismos de iniciación poco comunes y diferentes a los observados para los mRNAs celulares. Los virus pueden emplear mecanismos de inicio de la traducción, en los cuales no utilizan o reducen la utilización de los factores del complejo eIF4F, y en la mayoría de los casos,

estos virus inactivan uno o más componentes de este complejo proteico siendo los principales blancos eIF4E y eIF4G (Revisado en [16, 17]). Sin embargo, a continuación se hablará de cómo algunos virus pueden depender o no o incluso alterar de alguna forma al factor de inicio eIF4A.

Virus cuya expresión génica es dependiente de eIF4A

Los mRNAs del virus de influenza para su expresión son dependientes de eIF4A, lo anterior ha sido observado en modelos experimentales *in vitro* como *in vivo*[18]. Algunos Caliciviruses como el calicivirus felino (FCV) y el norovirus murino (MNV) también parecen poseer mRNAs que son dependientes de la actividad de eIF4A, sin embargo parece que el grado de dependencia de eIFs es diferente en estos virus; y es que los datos muestran que los RNAs de MCV son más dependientes de eIF4A que los de FCV[19]. El Sindbis virus es un virus que es capaz de infectar a artrópodos y mamíferos y cuyos mRNAs presentan un comportamiento curioso; los estudios de los mRNAs genómicos y subgenómicos de Sindbis virus realizados por García-Moreno y colaboradores mostraron que en condiciones consideradas como fisiológicas como la infección de células de mamíferos o artrópodos o la transfección de células con replicones de sindbis virus, la expresión de los mRNAs virales era independiente de eIF4A, sin embargo cuando el mRNA genómico y subgenómico eran transfectados con la ayuda de un vector en células, la expresión de estos era totalmente dependiente de eIF4A; la presencia de alguna proteína viral que pudiera estar replicando las funciones de eIF4A en el sistema fue también descartada experimentalmente. Los resultados de esta investigación parecen sugerir que los mRNAs de sindbis virus son capaces de

adaptarse a diferentes condiciones de disponibilidad de factores de inicio de la traducción[20]. Citomegalovirus humano (HCMV) expresa una proteína denominada pUL69 que muestra interacción con eIF4A1, PABP, polisomas y mRNA viral, dicha interacción podría tratarse de un mecanismo regulatorio que pudiera favorecer la expresión de los mensajeros virales de HCMV[21], interesantemente también se ha observado que este virus puede incrementar los niveles de las proteínas eIF4A, eIF4E, eIF4G y PABP, esto fue observado en poblaciones asíncronas de células subconfluentes en continua división e infectadas con HCMV, al parecer este mecanismo desplegado por HCMV depende en gran medida de la expresión génica de éste ya que el silenciamiento y el uso virus defectivos de los genes virales IE2 eIE1, esenciales en la replicación viral de HCMV mostraron fenotipos de concentración de eIF4A, PABP y otros factores de inicio de la traducción similares al de células no infectadas[22].

La proteína virion host shutoff (VHS) codificada en el gen UL41 de HSV es una RNasa específica de mRNAs que durante la infección del virus de herpes simple HSV produce una rápida inhibición en la síntesis de proteínas celular, disrupción de polirribosomas ya existentes y degradación de mRNA celular en ausencia de expresión génica viral de novo (Revisado en [23]). Se ha observado que VHS es capaz de unirse a los factores de inicio eIF4H y eIF4B y que mutantes de VHS que son defectuosos en su actividad de RNasa también lo son en su capacidad de unión a eIF4H. La actividad de RNasa de esta proteína viral es incrementada por los factores de inicio eIF4B/eIF4H aunque al parecer estos no son suficientes y también se requiere la presencia de eIF4A[24]. Heidi y colaboradores observaron que la actividad de degradación de mRNAs

depende de la unión de VHS a eIF4H y eIF4F, además de que la unión a eIF4F y a eIF4A está altamente correlacionada[25]. VHS al parecer presenta interacción *in vitro* solo con eIF4II (una de las tres isoformas de eIF4A), además eIF4H no actúa como intermediario de unión entre estas, si no que cada una de estas proteínas presentan sitios de interacción para las otras dos; es decir que tienen sitios de unión genéticamente diferentes. Se ha propuesto que VHS utilice a eIF4A y eIF4H para ser reclutado a los mRNAs en una posición preferencial para llevar a cabo su actividad de RNasa [26]. VHS también presenta la función de impedir condiciones celulares en la que los factores de inicio se encuentran limitados como en la formación de gránulos de estrés y es que al parecer estas estructuras resultan ser contraproducentes para la expresión de genes tardíos de HSV. Los datos de esta investigación sugieren que en la actividad de la proteína VHS el factor limitante es eIF4A[27].

A pesar de que eIF4A es una proteína que participa en la traducción cap-dependiente como parte del complejo eIF4F, se encontró que durante algunas infecciones participa en la traducción cap-independiente de mRNAs virales, via IRES. Por ejemplo el IRES del picornavirus de simio tipo 9 (SPV9) es dependiente de eIF4A ya que su expresión puede ser moderadamente inhibida por el mutante defectivo de eIF4A (eIF4A^{D60D}) y que la formación del complejo 48S sobre este IRES depende parcialmente algunos factores de inicio de la traducción como eIF4A, eIF4B y eIF4F[28]. El Virus de la encefalomiocarditis (ECMV) también es un virus que emplea un mecanismo inicio de la traducción dependiente de IRES y que requiere la presencia de eIF4A, de acuerdo a los estudios de Pestova y colaboradores la ausencia de ATP impide la formación del

complejo 48S en el mRNA de este virus; recordado que el mecanismo de helicasa de eIF4A depende de la hidrólisis de ATP y además observaron que eIF4B y el dominio central de eIF4G o únicamente el fragmento carboxilo terminal de eIF4G podían estimular la unión de eIF4A al IRES de EMCV[29].

Un dato interesante observado en la investigación de Borman y colaboradores es que el IRES del virus de la hepatitis A (HAV) pudiera ser dependiente de eIF4A en su forma de complejo eIF4F y es que en uno de sus experimentos de cross-linking, SDS-PAGE y Western blot en el que ensayaron IRES radiomarcados de HAV en presencia de proteínas eIF4F sometidas o no a proteasas y a los fragmentos carboxilo y amino terminal producto del corte catalítico purificados, encontraron señales con pesos de 43 kDa acompañando a las señales correspondientes a eIF4F completa, eIF4F cortada y el fragmento Carboxilo terminal de eIF4F lo que pudiera indicar la presencia de eIF4A. También observaron que la actividad del IRES de HAV requiere que PABP y eIF4E estén unidas a eIF4G. Los datos de este grupo de investigación parecen indicar que la actividad del IRES de HAV es dependiente del complejo eIF4F del cual eIF4A forma parte[30].

Los mRNAs de las proteínas Gag de VIH pueden ser traducidos a través de tres mecanismos, uno via cap-dependiente, via cap-independiente mediante un IRES localizado en la región 5'UTR del mensajero y otro también via-cap-independiente a través de un IRES localizado en el ORF Gag. La región 5'UTR comprende los nucleótidos 104 al 336 donde se encuentra un codón de inicio (AUG1), mientras que el ORF de Gag está en la región de los nucleótidos 336-761 que va desde AUG1 a UAG2 (entre los productos de esta región se encuentra un fragmento N-

términal de la poliproteína Gag) (Revisado en [31]). Los mecanismos de inicio de la traducción cap-independientes de este mRNA son dependientes de eIF4A, sin embargo los estudios realizados por Breyne y colaboradores demuestran que uno de estos dos eventos de inicio de la traducción es menos dependiente de eIF4A que el otro y es que esta investigación indicó que el inicio de la traducción del codón AUG1 en ausencia de la región 5'UTR es mucho menos sensible al uso de mutantes defectivos de eIF4A y al uso de hippuristanol que es un inhibidor selectivo de eIF4A. Al igual a lo observado con Sindbis virus VIH tiene una gran capacidad de adaptabilidad en la utilización de los factores de inicio de la traducción como eIF4A[31].

eIF4A no siempre es requerida en la síntesis de proteínas de algunos virus

El virus de la Hepatitis C (HCV) en contraste con los mecanismos de expresión viral anteriormente mencionados, posee mensajeros que utilizan IRES independientes de la presencia de eIF4A para su expresión y no sólo de éste, sino también de otros como eIF2, eIF3, eIF4B y eIF4F y es que en la investigaciones de Pestova y colaboradores observaron que para la formación del complejo 48S en un RNA de HCV únicamente era requerida la presencia la subunidad ribosomal 40S, interesantemente también observaron tendencias muy similares con el IRES del virus de la fiebre porcina clásica (CSFV); los resultados indican que la unión del complejo 43S con el IRES de HCV y CSFV y la estabilización de los codones de inicio no requiere de eIF4A, eIF4B e interesantemente tampoco necesita eIF4F, sin embargo eIF3 pudiera afianzar esta unión pero sin ser realmente vital para esto, además la expresión de los mRNAs de estos dos virus no es mermada en presencia de un mutante

defectivo de eIF4A[32]. Fletcher y colaboradores en un interesante experimento no pudieron rescatar la actividad de IRES defectivos de HCV y CSFV utilizando una proteína Wild-type de eIF4A e inclusive en presencia de eIF4B que es un estimulador de la actividad de ésta[33]. Estos resultados parecen afianzar la idea de que la actividad de ambos IRES es independiente de eIF4A tanto solo como en forma de complejo eIF4F. El caso del teschovirus porcino tipo 1 (PTV-1) es un dato curioso y es que el IRES de este picornavirus solo tiene una longitud de 280 nt, mientras que la mayoría de los picornavirus poseen IRES de aproximadamente 450 nt, los datos experimentales muestra que los 280 nt del PTV-1 son suficientes para dirigir eficientemente la iniciación de la síntesis de proteína, además éste no requiere de eIF4A y otros factores de inicio como eIF1, eIF3, eIF4B y eIF4F para el ensamblaje sobre éste del complejo 48S[34]. Bordenau y colaboradores con la utilización del inhibidor hippuristanol, también pudieron confirmar que la actividad del IRES de PTV-1 es independiente de eIF4A, en esta investigación también se evaluaron los IRES de Poliovirus, EMCV y CrPV (Cricket paralysis virus); mientras que el hippuristanol afecto la actividad de los IRES de poliovirus y EMCV, la de CrPV no lo fue[35]. El IRES del virus de la diarrea viral bovina (BVDV) también se ha reportado que no requiere de los factores eIF4A, eIF4B o eIF4F para la unión ribosomal y el posicionamiento del complejo de preinicio 48S sobre este mRNA, además la traducción de los mRNA de este virus es resistente al efecto inhibitorio del mutante defectivo eIF4A^{330Q}[36].

La proteína N de Hantavirus presenta una actividad interesante y es que ésta puede asumir las funciones de la proteína eIF4G, eIF4A y eIF4E durante la traducción. Se ha

observado que esta proteína puede suplir a eIF4G en células que expresan proteínas que cortan a ésta y contrarrestan su actividad, en cuanto a la actividad de eIF4E se ha observado que esta proteína interacciona con las estructuras cap de los mensajeros, mostrando mayor preferencia por las estructuras cap de los mensajeros de *Hantavirus*; esto permite que durante la infección los mensajeros virales sean preferentemente traducidos que los celulares y en lo referente a eIF4A se ha podido observar que la proteína N puede rescatar la expresión de mRNAs reporteros en sistema de extractos de reticulocitos de conejo en presencia de mutantes defectivos de eIF4A, lo que indica claramente que es capaz de suplir las funciones de eIF4A, interesantemente se ha observado que la proteína N no puede interactuar con la proteína de unión al tracto poliadenilado, lo que parece sugerir que la circularización de los mRNAs de *Hantavirus* no es requerida para su traducción[37].

El virus de DNA *Cotestia platellae brucovirus* (CpBv) forma simbiosis con la avispa *Cotestia platellae* (que es un endoparásito de otros insectos) y cuyo blanco de infección son los insectos parasitados por esta avispa. Este virus es capaz de producir control traduccional de las células que infecta a través de la inhibición de la expresión de algunos mRNAs celulares, esto a través de proteínas virales que secuestran eIF4A (Revisado en [38]). *Plutella xylostella* es un insecto que es blanco de parasitosis por parte de esta avispa y en los que se han encontrado en su plasma durante tiempos tardío de la parasitosis la presencia de dos proteínas expresadas por dos genes virales de CpBv denominados CpBV15 α y CpBV15 β y con secuencias de aminoácidos homólogas con los factores de inicio eIF5 y eIF4G [39]. También ha sido observado que estas dos

proteínas virales transfectadas en larvas sanas de *Plutella xylostella* producen una reducción de proteínas totales en relación a larvas no tratadas y además provocan la inhibición de los mRNA celulares en un proceso en el que la presencia o no de las regiones 5'UTR está involucrada[40] y es importante señalar que la proteína CpBV15 β es capaz de producir una inhibición traduccional en la proteína SPI de *Plutella xylostella*[41]. Suzuki y colaboradores determinaron que estas proteínas virales presentan un mecanismo que les permite favorecer la expresión de los mRNAs virales por encima de los celulares diferenciando entre las regiones 5'UTR virales y celulares. Interesantemente un análisis de las secuencias de aminoácidos de CpBV15 β en este estudio determinó su homología con la región de eIF4G que se encarga de interactuar con eIF4A, más adelante un ensayo de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos contra CpBV15 β y eIF4A determinó que esta proteína viral interactúa con eIF4A, lo que pudiera indicar un secuestro de eIF4A durante el transcurso de la infección[38].

Durante la infección de células con el Food and disease virus (FMDV) a tiempos tempranos se ha observa disminución de la síntesis de proteína celular y corte proteolítico de eIF4G y eIF4A1 a tiempos tardíos [42], pero no eIF4AII [43]; la proteína 3C de FMDV corta a eIF4G y eIF4A, mientras que otra proteína de este virus llamada Lb corta únicamente a eIF4G, este mecanismo al parecer es un efecto colateral de la acumulación de la proteína 3C durante la infección y que ésta llega a un punto en que sobrepasa su función de procesamiento de la poliproteína viral y es que experimentalmente los tiempos en que se detecta por inmunoblot el corte de eIF4A y la acumulación de 3C coinciden[42]. Como dato extra se ha observado que durante la

infección por FMDV existe proteólisis de las proteínas PTB (polypyrimidine tract-binding protein), las subunidades a y b de eIF3 y PABP[44].

eIF4A EN CÁNCER Y EL USO DE ESTA PROTEÍNA COMO BLANCO TERAPÉUTICO

La desregularización del control traduccional es una de las características que definen a muchos tipos de cánceres, siendo la iniciación uno de los procesos de la traducción donde este descontrol existe y siendo que el complejo eIF4F es responsable del control de este paso altamente regulado, se ha convertido en blanco de terapéutico de este tipo de enfermedades. Es sabido que una de las vías para inhibir la función de eIF4F es a través del factor clave eIF4A[45]. A continuación se muestra el papel clave de eIF4A en algunas enfermedades cancerígenas y como el uso de sustancias inhibitoras de este factor plantean terapias futuras para tratar este tipo de padecimientos.

En la línea celular MCF7, una línea celular derivada de cáncer de mama, los niveles del factor de inicio eIF4A1 son elevados, experimentos realizados en este tipo de células induciendo una disminución de eIF4A1 provocan disminución de la proliferación celular, por otro lado en estas células se han podido identificar hasta 175 mRNAs dependientes de la acción de eIF4A1; incluido a PLKCA que es uno de los oncogenes más comúnmente mutados en cáncer de mama[46], estos transcritos están relacionados a proteínas estructurales como subunidades α de proteínas G, dominios N-terminales de ciclinas y proteínas cinasas de serina/treonina, también genes involucrados en vías de señalización oncogénicas y numerosas proteínas involucradas en vías de señalización[47]. La sobreexpresión de la

proteína MUC1-C y la interacción de esta proteína con el receptor del factor de crecimiento epidemal (EGFR) en glándulas mamarias provoca la aparición de tumores mamarios[48-50]. En los estudios de Jin y colaboradores observaron que el uso del inhibidor de mTOR rapamicina[51] y el inhibidor selectivo eIF4A silvestrol[52] podían disminuir los niveles de esta proteína y es que los datos indican que rapamicina impide que mTOR fosforile a S6K1 que a su vez tiene como blanco de fosforilación a la proteína PDCD4 que es un inhibidor de eIF4A[53]. Los resultados parecen soportar la idea de que la activación de la vía PI3K-AKT provoca la traducción de MUC1-C dependiente de la actividad de eIF4A[54].

Los mecanismos de inicio de la traducción mediados por IRES y dependientes de la actividad de eIF4A, no son exclusivos de algunos virus, este es el caso de la leucemia mieloide crónica (CML). En la CML la proteína LEF-1 está regulada al alta, además la traducción de este mRNA es dependiente de IRES y potenciada por eIF4A. Tsai y colaboradores en sus investigaciones con CML sensible a imatinib que es un fármaco inhibidor del oncogen Bcr-Abl[55] observaron que LEF-1 es expresado en todas las fases de la enfermedad y que es regulado por el oncogen Bcr-Abl, además sus datos soportan el hecho de que las concentraciones de LEF-1 son sensibles a la actividad de eIF4A y mTOR, ya que en sus experimentos ensayaron los efectos del inhibidor de eIF4A hippuristanol y el inhibidor de mTOR PP242[56] sobre el IRES de LEF-1. Lo anterior indica que el efecto regulatorio del oncogen Bcr-Abl sobre la actividad IRES de LEF-1 es mediada por eIF4A y mTOR. De la misma forma Tsai y colaboradores evaluó los efectos de estos dos inhibidores en una línea celular de leucemia de Jurkat, donde observaron que el hippuristanol reducía los

niveles de LEF-1, el PP242 afectaba poco o nada a esta proteína, pero el uso de ambos producía una alta disminución de LEF-1, lo anterior parece indicar que entre las leucemias existe un mecanismo regulatorio muy similar[57].

El linfoma difuso de células B grandes (DLBCLs) es una malignidad linfoide derivada de células B antígeno experimentadas, en ésta los oncogenes CARD11, BCL10 Y MALT1 cuyos mensajeros poseen regiones 5'UTR complejas son expresados durante la activación del receptor de células B (RCB), este receptor de linfocitos B al ser activado produce señales de crecimiento celular, sobrevivencia y maduración. La expresión de estos oncogenes puede ser atenuada por el inhibidor de eIF4A silvestrol [58, 59]. Steinhardt y colaboradores en sus ensayos con células B esplénicas activadas con anticuerpos dirigidos contra BCR, y CD40 observaron fosforilación de p70s6K dependiente de mTOR, fosforilación de RPS6, PDCD4, eIF4B y 4EBP1 y baja en los niveles de PDCD4 total e interesantemente incremento de la actividad cap-dependiente de eIF4A. El uso de silvestrol en estas células disminuyó la actividad de eIF4A y los niveles de las proteínas oncogénicas CARD11, BCL10 y MALT1, además observaron que las regiones 5'UTR de los mensajeros de estos oncogenes son sensibles a la inhibición de eIF4A[60]. Se ha observado también que el silvestrol puede inducir muerte celular en muestras primarias humanas de T-ALL (leucemia linfoblástica aguda de células T), líneas celulares T-ALL y células T-ALL de murino a bajas concentraciones, *in vivo* el silvestrol es efectivo contra T-ALL xenoinjertadas y de murino, en ratones NOD SCID portadores de tumores KOPT-K1 el tratamiento con silvestrol produce retraso del crecimiento tumoral, apoptosis y arresto

del ciclo celular, siendo el uso de este fármaco, además el silvestrol también es capaz de inhibir oncoproteínas como MYC, NOTCH, BCL2, etc. vagiriendo un potencial efecto contra otros tipos de cánceres[61]. Otro dato interesante del uso de los inhibidores de eIF4A como terapias anticancerígenas es el observado en la investigación de Nasr y colaboradores y es que éste grupo observó en células TM15 (células murinas de cáncer de mama metastásicas) que tanto el silvestrol e hippuristanol además de afectar la traducción en estas células, también tenían la capacidad de inhibir migración celular e invasión, interesantemente Rapamicina produjo las mismas respuestas en estas células. Lo anterior parece indicar que los inhibidores de eIF4A también podrían ser usados como terapias contra metástasis tumoral[62].

La leucemia de células T adultas (ATL) es causada por la infección del virus de la leucemia de células T adultas (HTLV-1) (revisado en [63, 64]). Los estudios realizados por Tsumura y colaboradores con este tipo de células e hippuristanol han arrojado datos interesantes y es que en líneas celulares infectadas con HTLV-1 y cultivos primarios de células ATL tratados con dosis crecientes de hippuristanol la viabilidad celular se ve reducida en comparación con controles de células sanas, además se ha observado que hippuristanol puede inducir apoptosis dependiente de caspasas en células infectadas con HTLV-1 y produce una disminución de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular y antiapoptóticas, además hippuristanol puede inhibir a la proteína de supervivencia NF-kappaB que tiene como función prevenir apoptosis en la célula y activación de caspasas[65] y a la proteína promotora del ciclo celular e inhibidora de vías de muerte celular AP-1[66]. interesantemente hippuristanol también puede inhibir a la

anhidrua carbónica (CAII)[67], lo que resulta interesante debido a que las células tumorales requieren altas cantidades bicarbonato[68], además de que PDCD4 además de inhibir a eIF4A también inhibe a CAII[67]. El grupo de Tsunawaya también ha observado que hippuristanol es efectivo contra ATL en condiciones *in vivo*[69].

Pateamina A también presenta propiedades prometedoras como terapia anticancerígena a través de la inhibición de eIF4A[70]. Experimentalmente se ha observado que la molécula de Pateamina A se une con eIF4A1 y en células HELA que sobreexpresan eIF4A1 se ha observado que Pateamina A puede inhibir la proliferación celular. Pateamina A y el análogo de esta (B-PatA) tienen su efecto antiproliferativo como consecuencia de un efecto inhibitorio de la síntesis de RNA que lleva a la disminución de la síntesis de proteínas, inhibe la síntesis *cap*-dependiente y en cuanto a eIF4A, Pateamina A no inhibe la actividad de helicasa de RNA dependiente de ATP de esta, tal parece que la incrementa, sin embargo afecta a su capacidad de unión con eIF4G y promueve la unión con eIF4B, además provoca que los factores eIF4A, eIF4B y eIF4G sean translocados a gránulos de estrés. Pateamina A ha mostrado efectos antiproliferativos en las líneas celulares cancerosas como HeLa y MCF-7[71]. Pateamina A a mostrado efectos apoptóticos en células 32D-*bcr/abl* y 32D-*ras* (líneas celulares mieloides transformadas)[72]. Pateamina A a mostrado efectos apoptóticos en células 32D-*bcr/abl* y 32D-*ras* (líneas celulares mieloides transformadas)[72]. El análogo de pateamina A DMDA-PatA, ha mostrado actividad antiproliferativa en 32 tipos de líneas celulares cancerígenas que incluyen tumores sólidos y malignidades de células hematológicas. *In vivo* DMDA-PatA ha mostrado resultados satisfactorios en

cánceres humanos xenotransplantados en ratones como LOX (melanoma humano), DLD-1 (cáncer de colon resistente a taxano) y H522-T1 (cáncer pulmonar), pero no en MiaPaca-2 (cáncer pancreático) y HT-29 (otro modelo de cáncer xenotransplantado)[73].

CONCLUSIONES

La función de eIF4A resulta de tan alta importancia en el inicio de la traducción, lo anterior ha sido probado experimentalmente a través de estudios mutacionales de la proteína, además se ha observado que eIF4A puede ser alterado por los mecanismos de manipulación viral, esto en relación a la dependencia que pudieran tener los mensajeros virales con eIF4A. Una de las sorpresas observadas en los últimos años es que algunos mecanismos de traducción viral dependientes de IRES han mostrado una alta dependencia de eIF4A a pesar de que este factor realiza su actividad en la vía *cap*-dependiente de síntesis de proteínas, entre algunos virus que presentan mensajeros con IRES dependientes de eIF4A para expresarse están SPV, ECMV, HAV y poliovirus, los anteriores descubrimientos no hubieran sido posible sin la utilización de sustancias selectivamente inhibidoras de eIF4A como hippuristanol. Hippuristanol no es la única sustancia que se ha observado tiene capacidades de inhibir a eIF4A, esto también ha sido observado en sustancias como Silvestrol y Pateamina A y dado que algunas enfermedades cancerígenas han sido relacionadas con desregulación de algunos factores de inicio como eIF4A el uso de estos inhibidores ha sido prometedor para el tratamiento de algunas enfermedades cancerígenas como cáncer de mama y algunas leucemias; los resultados en este campo muestran resultados alentadores.

Referencias:

1. Andreou, A.Z. and D. Klostermeier, *The DEAD-box helicase eIF4A: paradigm or the odd one out?* RNA Biol, 2013. **10**(1): p. 19-32.
2. Lu, W.T., et al., *The diverse roles of the eIF4A family: you are the company you keep.* Biochem Soc Trans, 2014. **42**(1): p. 166-72.
3. Tuteja, N., A.A. Vashisht, and R. Tuteja, *Translation initiation factor 4A: a prototype member of dead-box protein family.* Physiol Mol Biol Plants, 2008. **14**(1-2): p. 101-7.
4. Gingras, A.C., B. Raught, and N. Sonenberg, *eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation.* Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 913-63.
5. Lorsch, J.R. and D. Herschlag, *The DEAD box protein eIF4A. 2. A cycle of nucleotide and RNA-dependent conformational changes.* Biochemistry, 1998. **37**(8): p. 2194-206.
6. Lorsch, J.R. and D. Herschlag, *The DEAD box protein eIF4A. 1. A minimal kinetic and thermodynamic framework reveals coupled binding of RNA and nucleotide.* Biochemistry, 1998. **37**(8): p. 2180-93.
7. Blum, S., et al., *ATP hydrolysis by initiation factor 4A is required for translation initiation in Saccharomyces cerevisiae.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(16): p. 7664-8.
8. Rogers, G.W., Jr., A.A. Komar, and W.C. Merrick, *eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases.* Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2002. **72**: p. 307-31.
9. Svitkin, Y.V., et al., *The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure.* RNA, 2001. **7**(3): p. 382-94.
10. Jackson, R.J., C.U. Hellen, and T.V. Pestova, *The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(2): p. 113-27.
11. Richter, N.J., et al., *Further biochemical and kinetic characterization of human eukaryotic initiation factor 4H.* J Biol Chem, 1999. **274**(50): p. 35415-24.
12. Rogers, G.W., Jr., et al., *Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F.* J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 30914-22.
13. Rogers, G.W., Jr., N.J. Richter, and W.C. Merrick, *Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A.* J Biol Chem, 1999. **274**(18): p. 12236-44.
14. Kapp, L.D. and J.R. Lorsch, *The molecular mechanics of eukaryotic translation.* Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 657-704.
15. Marintchev, A., et al., *Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation.* Cell, 2009. **136**(3): p. 447-60.
16. Bushnell, M. and P. Sarnow, *Hijacking the translation apparatus by RNA viruses.* J Cell Biol, 2002. **158**(3): p. 395-9.
17. Kleijn, M., et al., *Phosphorylation state of the cap-binding protein eIF4E during viral infection.* Virology, 1996. **217**(2): p. 486-94.
18. Yanguz, E., et al., *Functional impairment of eIF4A and eIF4G factors correlates with inhibition of influenza virus mRNA translation.* Virology, 2011. **413**(1): p. 93-102.
19. Chaudhry, Y., et al., *Caliciviruses differ in their functional*

- requirements for eIF4F components. *J Biol Chem*, 2006. **281**(35): p. 25315-25.
20. Garcia-Moreno, M., et al., Requirements for eIF4A and eIF2 during translation of Sindbis virus subgenomic mRNA in vertebrate and invertebrate host cells. *Cell Microbiol*, 2013. **15**(5): p. 823-40.
21. Aoyagi, M., M. Gaspar, and T.E. Shenk, Human cytomegalovirus UL69 protein facilitates translation by associating with the mRNA cap-binding complex and excluding 4EBP1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(6): p. 2640-5.
22. Perez, C., et al., Translational control of the abundance of cytoplasmic poly(A) binding protein in human cytomegalovirus-infected cells. *J Virol*, 2011. **85**(1): p. 156-64.
23. Smiley, J.R., Herpes simplex virus virion host shutoff protein: immune evasion mediated by a viral RNase? *J Virol*, 2004. **78**(3): p. 1063-8.
24. Doepker, R.C., et al., Herpes simplex virus virion host shutoff protein is stimulated by translation initiation factors eIF4B and eIF4H. *J Virol*, 2004. **78**(9): p. 4684-99.
25. Page, H.G. and G.S. Read, The virion host shutoff endonuclease (UL41) of herpes simplex virus interacts with the cellular cap-binding complex eIF4F. *J Virol*, 2010. **84**(13): p. 6886-90.
26. Feng, P., D.N. Everly, Jr., and G.S. Read, mRNA decay during herpes simplex virus (HSV) infections: protein-protein interactions involving the HSV virion host shutoff protein and translation factors eIF4H and eIF4A. *J Virol*, 2005. **79**(15): p. 9651-64.
27. Dauber, B., J. Pelletier, and J.R. Smiley, The herpes simplex virus 1 vhs protein enhances translation of viral true late mRNAs and virus production in a cell type-dependent manner. *J Virol*, 2011. **85**(11): p. 5363-73.
28. de Breyne, S., et al., Factor requirements for translation initiation on the Simian picornavirus internal ribosomal entry site. *RNA*, 2008. **14**(2): p. 367-80.
29. Pestova, T.V., I.N. Shatsky, and C.U. Hellen, Functional dissection of eukaryotic initiation factor 4F: the 4A subunit and the central domain of the 4G subunit are sufficient to mediate internal entry of 43S preinitiation complexes. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(12): p. 6870-8.
30. Borman, A.M., Y.M. Michel, and K.M. Kean, Detailed analysis of the requirements of hepatitis A virus internal ribosome entry segment for the eukaryotic initiation factor complex eIF4F. *J Virol*, 2001. **75**(17): p. 7864-71.
31. de Breyne, S., et al., In vitro studies reveal that different modes of initiation on HIV-1 mRNA have different levels of requirement for eukaryotic initiation factor 4F. *FEBS J*, 2012. **279**(17): p. 3098-111.
32. Pestova, T.V., et al., A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev*, 1998. **12**(1): p. 67-83.
33. Fletcher, S.P., et al., The influence of viral coding sequences on pestivirus IRES activity reveals further parallels with translation initiation in prokaryotes. *RNA*, 2002. **8**(12): p. 1558-71.
34. Pisarev, A.V., et al., Functional and structural similarities between the internal ribosome entry sites of hepatitis C virus and porcine teschovirus, a picornavirus. *J Virol*, 2004. **78**(9): p. 4487-97.

35. Bodeleau, M.E., et al., Functional characterization of IREs by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. *Nat Chem Biol*, 2006. **2**(4): p. 219-20.
36. Pestova, T.V. and C.U. Hellen, Internal initiation of translation of bovine viral diarrhoea virus RNA. *Virology*, 1999. **250**(2): p. 249-56.
37. Mir, M.A. and A.T. Panganiban, A protein that replaces the entire cellular eIF4F complex. *The EMBO journal*, 2008. **27**(23): p. 3129-3139.
38. Surakasi, V.P., M. Nafini, and Y. Kim, Host translational control of a polydnavirus, *Cotesia plutellae* bracovirus, by sequestering host eIF4A to prevent formation of a translation initiation complex. *Insect Mol Biol*, 2011. **20**(5): p. 609-18.
39. Lee, S. and Y. Kim, Two homologous parasitism-specific proteins encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus and their expression profiles in parasitized *Plutella xylostella*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2008. **67**(4): p. 157-71.
40. Barandac, K.P. and Y. Kim, Translation inhibitory factors encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus require the 5'-UTR of a host mRNA target. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2010. **156**(2): p. 129-36.
41. Nafini, M. and Y. Kim, Transient expression of a polydnaviral gene, *CpβV15beta*, induces immune and developmental alterations of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J Invertebr Pathol*, 2009. **100**(1): p. 22-8.
42. Belsham, G.J., G.M. McInerney, and N. Ross-Smith, Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells. *J Virol*, 2000. **74**(1): p. 272-80.
43. Li, W., et al., Cleavage of translation initiation factor 4A1 (eIF4A1) but not eIF4A11 by foot-and-mouth disease virus 3C protease: identification of the eIF4A1 cleavage site. *FEBS Lett*, 2001. **507**(1): p. 1-5.
44. Rodriguez Pulido, M., et al., Foot-and-mouth disease virus infection induces proteolytic cleavage of PTB, eIF3a,b, and PABP RNA-binding proteins. *Virology*, 2007. **364**(2): p. 466-74.
45. Malina, A., J.R. Mills, and J. Pelletier, Emerging therapeutics targeting mRNA translation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(4): p. a012377.
46. Samuels, Y. and T. Waldman, Oncogenic mutations of *PIK3CA* in human cancers. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2010. **347**: p. 21-41.
47. Modelska, A., et al., The malignant phenotype in breast cancer is driven by eIF4A1-mediated changes in the translational landscape. *Cell Death Dis*, 2015. **6**: p. e1603.
48. Kufe, D.W., Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(12): p. 874-85.
49. Schroeder, J.A., et al., MUC1 overexpression results in mammary gland tumorigenesis and prolonged alveolar differentiation. *Oncogene*, 2004. **23**(34): p. 5739-47.
50. Schroeder, J.A., et al., Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland. *J Biol Chem*, 2001. **276**(16): p. 13057-64.
51. Sonenberg, N. and A.G. Hinnebusch, Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 2009. **136**(4): p. 731-45.
52. Cencic, R., et al., Antitumor activity and mechanism of action of the

- cyclopenta[b]benzofuran, silvestrol. *PLoS One*, 2009. **4**(4): p. e5223.
53. Dorrello, N.V., et al., *S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth*. *Science*, 2006. **314**(5798): p. 467-71.
 54. Jin, C., et al., *Targeting the eIF4A RNA helicase blocks translation of the MUC1-C oncoprotein*. *Oncogene*, 2013. **32**(17): p. 2179-88.
 55. Golan, D.E., *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*. 2008: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
 56. Acton, Q.A., *Leukemia: New Insights for the Healthcare Professional: 2012 Edition*. 2012: ScholarlyEditions.
 57. Tsai, B.P., et al., *A novel Bcr-Abl-mTOR-eIF4A axis regulates IRES-mediated translation of LEF-1*. *Open Biol*, 2014. **4**(11): p. 140180.
 58. Hwang, B.Y., et al., *Silvestrol and episolvestrol, potential anticancer roscoglate derivatives from *Aglaia silvestris**. *The Journal of organic chemistry*, 2004. **69**(10): p. 3350-3358.
 59. Lucas, D.M., et al., *The novel plant-derived agent silvestrol has B-cell selective activity in chronic lymphocytic leukemia and acute lymphoblastic leukemia in vitro and in vivo*. *Blood*, 2009. **113**(19): p. 4656-4666.
 60. Steinhardt, J.J., et al., *Inhibiting CARD11 translation during BCR activation by targeting the eIF4A RNA helicase*. *Blood*, 2014. **124**(25): p. 3758-67.
 61. Wolfe, A.L., et al., *RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer*. *Nature*, 2014. **513**(7516): p. 65-70.
 62. Nasr, Z., et al., *eIF4F suppression in breast cancer affects maintenance and progression*. *Oncogene*, 2013. **32**(7): p. 861-71.
 63. Polesz, B.J., et al., *Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(12): p. 7415-9.
 64. Yoshida, M., I. Miyoshi, and Y. Hinuma, *Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. **79**(6): p. 2031-5.
 65. Dolcet, X., et al., *NF-kB in development and progression of human cancer*. *Virchows Arch*, 2005. **444**(5): p. 475-82.
 66. Hall, W.W. and M. Fujii, *Deregulation of cell-signaling pathways in HTLV-1 infection*. *Oncogene*, 2005. **24**(39): p. 5965-75.
 67. Linkat-Buttgereit, B., et al., *Pcdh4 inhibits growth of tumor cells by suppression of carbonic anhydrase type II*. *Mol Cell Endocrinol*, 2004. **214**(1-2): p. 149-53.
 68. Chegwidde, W.R., S.J. Dodgson, and I.M. Spencer, *The roles of carbonic anhydrase in metabolism, cell growth and cancer in animals*. *EXS*, 2000(90): p. 343-63.
 69. Tsumuraya, T., et al., *Effects of hippuristanol, an inhibitor of eIF4A, on adult T-cell leukemia*. *Biochem Pharmacol*, 2011. **81**(6): p. 713-22.
 70. Low, W.X., et al., *Second-generation derivatives of the eukaryotic translation initiation inhibitor pateamine A targeting eIF4A as potential anticancer agents*. *Bioorg Med Chem*, 2014. **22**(1): p. 116-25.
 71. Low, W.X., et al., *Inhibition of eukaryotic translation initiation by the marine natural product pateamine A*. *Mol Cell*, 2005. **20**(5): p. 709-22.

72. Hood, K.A., et al., Induction of apoptosis by the marine sponge (*Mycale*) metabolites, mycalamide A and pateamine. *Apoptosis*, 2001. **6**(3): p. 207-19.
73. Kuznetsov, G., et al., Potent *in vitro* and *in vivo* anticancer activities of des-methyl, des-amino pateamine A, a synthetic analogue of marine natural product pateamine A. *Mol Cancer Ther*, 2009. **8**(5): p. 1250-60.



SS

SECRETARÍA DE SALUD

VER Salud
VERACRUZANA



EDIFICIO ET
CALLE DE LA SALUD Y SERVICIOS DE SALUD
VERACRUZANO



LA SECRETARÍA DE SALUD Y SERVICIOS DE SALUD DE VERACRUZ

Otorga la presente

Constancia

A: Gustavo A. Pérez-Gil Cervantes

Por haber participado como ponente de Cartel con el tema "Virus sincitial respiratorio está asociado a hospitalización en niños xalapeños" en el Foro de Investigación en Salud 2017 "Atención a la Salud Basada en Evidencias".

Coautores: Hilda Montero, Jaime Morales-Romero, Adriana Landá-Cardeña y Felipe Pitulúa.

Xalapa, Ver., a 20 de noviembre de 2017.

DR. GABRIEL RUANDE JUÁREZ
Director de Atención Médica

DRA. MARÍA CONCEPCIÓN ARRAZATE GARCÍA
Subdirectora de Enseñanza, Investigación y
Capacitación



SS
ESTADO DE VERACRUZ

VER Salud
SERVICIOS DE SALUD



CONAVENET
CONVENIO INTERMUNICIPAL
DE ATENCIÓN INTEGRAL
EN SALUD



IMSS



ISSSTE



LA SECRETARÍA DE SALUD Y SERVICIOS DE SALUD DE VERACRUZ

Otorga la presente

Constancia

A: Gustavo A. Pérez-Gil Cervantes

Por haber participado como ponente de Cartel con el tema "El inmunodepresor rapamicina aumenta la progenie de virus sincicial respiratorio por inducir la defosforilación de 4EBP1" en el Foro de Investigación en Salud 2017 "Atención a la Salud Basada en Evidencias".

Coautores: Hilda Montero L. de Guevara, Daira L. Sampieri Ramirez, Adriana Landa-Cardeña, Rocio Coustño Rodríguez, Silvia L. Mora Hemsra.

Xalapa, Ver., a 20 de noviembre de 2017

DR. GABRIEL RANDE JUÁREZ
Director de Atención Médica

DRA. MARÍA CONCEPCIÓN ARGUAJUTE GARCÍA
Subdirectora de Enseñanza, Investigación y
Capacitación



UNIVERSIDAD VERACRUZANA



INSTITUTO
DE
SALUD
PÚBLICA / IUV



El Instituto de Salud Pública de la Universidad Veracruzana
y la Red Mexicana de Virología

otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

a

Gustavo Antonio Pérez Gil Cervantes

por haber impartido el tema

Inmunofluorescencia

como parte del curso nacional teórico práctico:
Técnicas de identificación de virus,
celebrado del 12 al 16 de octubre del 2015 .

Xalapa, Ver. a 16 de octubre 2015

MSP Gabriel Riancho Juárez
Director del Instituto de Salud Pública

Dra. Rosa María del Ángel Núñez
Representante de la Red Mexicana de Virología



Gobierno Veracruzano



INSTITUTO
DE
SALUD
PÚBLICA / UV



El Instituto de Salud Pública de la Universidad Veracruzana
y la Red Mexicana de Virología

otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

a

Gustavo Antonio Pérez Gil Cervantes

por haber impartido el tema

Cultivo celular y propagación de virus

como parte del curso nacional teórico práctico:

Técnicas de identificación de virus,

celebrado del 12 al 16 de octubre del 2015 .

MSP Gabriel Ruano Juárez
Director del Instituto de Salud Pública

Xalapa, Ver. a 16 de octubre 2015

Dra. Rosa María del Ángel Núñez
Representante de la Red Mexicana de Virología



IX CONGRESO NACIONAL DE VIROLOGÍA

La Rama de Bioquímica y Biología Molecular de Virus,
De la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.

otorga la presente

CONSTANCIA

a:

**Pérez-Gil Cervantes GA, Montero L. de Guevara H, Landa Cardaña
A, Coutiño Rodríguez EMR, García Román , Sampieri Ramírez CL,
Mora Herrera SI.**

**Por su participación como:
PONENTE**

**DEFOSFORILACIÓN DE 4EBP1 DURANTE LA INFECCIÓN POR VIRUS SINCICIAL
RESPIRATORIO**

**En el IX Congreso Nacional de Virología
Morelos, México del 22 al 25 de septiembre de 2015.**

COMITÉ ORGANIZADOR

Pavel Isa- IBT UNAM

Elizabeth Loza Rubio- INIFAP

Ramón A. Gonzalez- CIDC UAEM



A quien corresponda:

La que suscribe, Coordinadora de la Maestría en Salud Pública del Instituto de Salud Pública dependiente de la Dirección General de Investigaciones de la Universidad Veracruzana, hace:

Consta

Que el C. **Q.F.B. Gustavo Antonio Pérez-Gil Cervantes**, apoyó en el curso optativo teórico práctico "Técnicas de identificación de virus", durante el intersemestral junio - julio 2014 de la Maestría en Salud Pública, generación 2013-2015.

Para los fines que al interesado convengan, se extiende la presente constancia en la ciudad de Xalapa-Enríquez, Veracruz, a los treinta días del mes de septiembre del año dos mil catorce.

Atentamente
"Lis de Veracruz: Arte, Ciencia, Luz"

Dra. Dulce María Cinta Loaiza
Coordinadora de la Maestría en Salud Pública



UNIVERSIDAD VERACRUZANA
INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA

CLDM/ter.



UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE QUÍMICA
FARMACÉUTICA BIOLÓGICA,
CAMPUS XALAPA



Xalapa, Veracruz a 11 de Noviembre de 2013.

A QUIEN CORRESPONDA:

La presente hace constar que el **Q.F.B. Gustavo Antonio Pérez Gil Cervantes** fungió como **profesor adjunto** en la Experiencia Educativa "**Microbiología Laboratorio**" en el periodo escolar Agosto-Diciembre 2013, los días lunes de 14:00-18:00 (4h), sumando un total de 48h distribuidas en 12 semanas, con un total de 33 alumnos inscritos.

De acuerdo a la evaluación docente realizada por los mismos estudiantes y una servidora, su desempeño final fue de **95 puntos**, tomando en consideración lo siguiente:

- Conocimientos teóricos y prácticos sobre el contenido del curso.
- Facilidad de palabra para explicar los temas y/o aspectos técnicos de las prácticas.
- Puntualidad, disponibilidad de tiempo y equidad al revisar las actividades y/o bitácoras.
- Grado de empatía y confianza con los estudiantes.

A petición del interesado y para los fines legales que al mismo convengan, se expide la siguiente constancia en la Cd. de Xalapa, Equez., Ver.

Atentamente
Lis de Veracruz: Arte, Ciencia y Luz



FAC. DE QUÍMICA
FARMACÉUTICA
BIOLÓGICA
DIRECCIÓN
CAMPUS XALAPA



Dra. Minerva Hernández Lozano
Profesor titular de la EE
Facultad de Q.F.B., campus Xalapa
Universidad Veracruzana

Dra. Margarita V. Saavedra Vázquez
Directora de la Facultad de Q.F.B.,
campus Xalapa,
Universidad Veracruzana

Calle la Pergola s/n.
Zona Universitaria.
Xalapa, Ver. México.

Tel: (228)842-1759
(228)842-1700 Ext. 1645
Fax: (228)842-2743

email: gfi@uv.mx

Universidad Nacional Autónoma de México



Bioinformática

UN

Unidad Universitaria de Apoyo Bioinformático

otorga la siguiente

CONSTANCIA

a

Gustavo Antonio Pérez Gil Cervantes

Por su participación en el curso

INTRODUCCIÓN A LA BIOINFORMÁTICA

del 1 al 8 de Abril de 2013, cubriendo un total de 36 horas

"Por mi raza hablará el espíritu"

Cuernavaca, Morelos a 8 de Abril de 2013

Dr. Enrique Rudiño Piñera
Secretario Académico
Instituto de Biotecnología

Dr. Alejandro Sánchez Flores
Encargado de la Unidad Universitaria de Apoyo
Bioinformático



Sociedad Mexicana
de Salud Pública, A.C.



UNIVERSIDAD
de Pachuca

Otorgan la presente

Constancia

PÉREZ GIL CERVANTES GUSTAVO ANTONIO

por su asistencia a la



LXVI Reunión Anual de
Salud Pública
Pachuca, Hidalgo 2012
Sociedad Mexicana de Salud Pública, A.C.

realizada del 21 al 24 de noviembre del 2012
Pachuca, Hidalgo.

Con el aval académico de la Universidad Pública de Pachuca del Estado de Hidalgo
Cuenta con un total de 30 horas de valor curricular para fines de acreditación continua.

Dr. Guillermo Ruiz Matus
Presidente
Sociedad Mexicana
de Salud Pública, A.C.

Lic. Paola Lina Morte Monterrubio
Secretaría de Salud y Dirección General
de los Servicios de Salud Hidalgo

Dr. Raúl Viegas Arredondo
Presidente
Comité Hidalgo de
Salud Pública, A.C.

Soy Salubrista
hago Salud Pública