



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS QUE
MODULAN LA VÍA 2'5-OLIGOADENILATO
SINTETASA RNASA L DURANTE LA
INFECCIÓN POR ROTAVIRUS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

LILIANA SÁNCHEZ TACUBA

Tutora: **Dra. Susana López Charretón**

Cuernavaca, Morelos

Junio de 2012

Comité tutorial:

Dra. Susana López Charretón

Dra. Susana Castro Obregón

Dr. José Luis Reyes Taboada

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Susana López Charretón con apoyo del donativo IN211411-3 del PAPIIT/UNAM. Durante la realización de este trabajo se contó con una beca otorgada por el CONACYT.

Agradecimientos

A Susana, mi tutora por su enorme y constante apoyo, por su confianza por su interés en mi formación y por darme la oportunidad de aprender de ella y formar parte de su grupo de investigación.

Al Dr. José Luis Reyes Taboada y a la Dra. Susana Castro, miembros de mi comité tutorial.

A GAL, Don Pedrito, Rafa, Daniela, Tomás, Carlos, Yina, Di, Luis Felipe, Pavel, Andrea P, Andrea M, Yuc, Joaquín, Héctor, Marco A, Jesús, Miguel M, Poncho, Rosa, MAET, Gustavo, Rodrigo, Miguel O, Doña Lore y Sil. Por sus valiosas enseñanzas y apoyo.

A toda mi familia por su cariño y comprensión... casi infinitos.

ABREVIATURAS

2'5-A	2'5-oligoadenilatos
β-TrCP	Proteína que contiene la repetición β -transducina
DLPs	Partículas virales de doble capa
hpi	Horas post infección
hpt	Horas post transfección
Hsc	Proteína de choque térmico
IF	Inmunofluorescencia
IFNs	Interferones
IRF	Factor regulador de IFNs
ISGs	Genes Estimulados por Interferón
JAK	Cinasa Janus
MAD-5	Gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma
MAVS	Proteína mitocondrial de señalización antiviral
NF-κB	Factor nuclear κ B
NSP	Proteína no estructural
OAS	2'5-oligoadenilato sintetasa
P1-P4	Producto de corte 1-4 de la RNasa L
PAMs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PKR	Proteína cinasa dependiente de RNAdc
Poly (I:C)	Ácido poli inosínico: poli citidílico
PPRs	Receptores que reconocen a PAMs
RIG-I	Proteína I inducida por ácido retinoico.
RNAdc	RNA de doble cadena
RNasa L	Ribonucleasa Latente dependiente de 2'5-A
rpm	Revoluciones por minuto
RV	Rotavirus
SI	Sistema inmune
STAT	Proteína señalizadora de transcripción, activación y traducción de señales.
TA	Temperatura ambiente
TLPs	Partículas virales de triple capa
TLR	Receptor Tipo Toll.
UFF	Unidades Formadoras de Foco
UTRs	Regiones no traducidas

ÍNDICE

Agradecimientos	II
Abreviaturas	III
Índice	IV
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Los rotavirus.....	3
1.1.1 Importancia epidemiológica de las infecciones causadas por rotavirus	3
1.1.2 Generalidades de los rotavirus	3
1.1.3 Estructura de los rotavirus.....	4
1.1.4 Ciclo replicativo.....	6
1.2 Inmunidad innata en contra de las infecciones virales.....	8
1.2.1 Respuesta mediada por los IFNs	8
II. ANTECEDENTES	16
2.1 Los rotavirus modulan la respuesta mediada por los IFNs.....	16
2.2 Los rotavirus y la vía 2´5-Oligoadenilato sintetasa/RNasa L.....	18
III. HIPÓTESIS	20
IV. OBJETIVOS	21
V. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1 Líneas celulares	22
5.2 Titulación de virus.....	22
5.3 Purificación de partículas virales y RNA de doble cadena (RNAdc).....	23
5.4 Lipofección.....	24
5.5 Marca metabólica.....	25
5.6 Ensayos de inmunofluorescencia	25
5.7 Detección de la RNasa L y la OAS1 por Western blot	26
5.8 Inactivación de partículas virales	27
5.9 Integridad de RNA ribosomales (rRNA).....	27
VI. RESULTADOS	29
6.1 El RNAdc se encuentra en el citoplasma de las células infectadas con las cepas RRV, UK y YM desde las 3 hpi.	29
6.2 El complejo 2´5-OAS/RNasa L es inactivo durante la infección con rotavirus.....	33
6.3 El RNAdc de rotavirus activa al complejo OAS/RNasa L	34
6.4 Los rotavirus inhiben la activación del complejo 2´5-OAS/RNasa L.	34
6.5 Los Rotavirus inhiben la activación de la RNasa L.	36
6.6 Las DLPs inducen la activación del complejo OAS/RNasa L....	37
6.7 El componente viral que modula a la RNasa L forma parte de la partícula viral, pero su síntesis es requerida para un control más eficiente del complejo antiviral.	39
6.8 El silenciamiento de la RNasa L y OAS 1 no tiene efecto sobre el rendimiento viral.....	41
6.9 Durante la infección con rotavirus la localización y cantidad de RNasa L y OAS1 no se modifican.....	42

VII. DISCUSIÓN	45
VIII. CONCLUSIONES.....	48
IX. PERSPECTIVAS	49
REFERENCIAS.....	50

Índice de Figuras

Figura 1.1: Estructura de la partícula viral de rotavirus y los patrones electroforéticos de su genoma viral y proteínas.....	4
Figura 1.2: Ciclo replicativo de los rotavirus.....	7
Figura 1.3: Señalización involucrada en la producción de IFNs.....	12
Figura 1.4: Vía de señalización de los IFNs.....	14
Figura 1.5: Vía 2´5-Oligoadenilato sintetasa/RNasa L inducida por el RNAdc.....	15
Figura 2.1: Eventos que ocurren durante etapas tempranas del reconocimiento de los rotavirus.....	17
Figura 5.1: Cuantificación de los productos de corte de la RNasa L.....	28
Figura 6.1: Cinética de la exposición del RNAdc en células MA104 infectadas con RRV.....	30
Figura 6.2: Cinética de la exposición del RNAdc en células MA104 infectadas con UK.....	31
Figura 6.3: Cinética de la exposición del RNAdc en células MA104 infectadas con YM.....	32
Figura 6.4: Estado de los rRNAs durante la infección con rotavirus.....	34
Figura 6.5: Estado de los rRNAs en presencia del RNAdc.....	35
Figura 6.6: Estado de los rRNAs en presencia del RNAdc y RRV.....	36
Figura 6.7: Estado de los rRNAs en presencia de 2´5-A y RRV.....	37
Figura 6.8: Estado de los rRNAs en presencia de TLPs y DLPs.....	38
Figura 6.9: Estado de los rRNAs en presencia de 2´5-A y RRVi.....	40
Figura 6.10: Efecto del silenciamiento de RNasa L y OAS1 en la progenie viral.....	41
Figura 6.11: Localización de la RNasa L y OAS1.....	43
Figura 6.12: Cuantificación de la RNasa L y OAS1.....	44

RESUMEN

El RNA de doble cadena (RNAdc) es uno de los inductores más potentes de la respuesta de los interferones tipo I (IFNs), mecanismo que podría por sí mismo, contrarrestar casi cualquier infección viral. Por ello la gran mayoría de los virus han desarrollado diferentes estrategias para inhibir dicha respuesta celular. De acuerdo al paradigma actual, durante la replicación de los rotavirus (RV), el RNAdc siempre se encuentra confinado en estructuras celulares o virales, lo cual impide que la respuesta mediada por los IFNs se active en las células infectadas.

Recientemente, se ha descrito que este modelo podría no ser del todo cierto, puesto que proteínas celulares que detectan la presencia del RNAdc se encuentran activas durante la infección con RV. En nuestro laboratorio, encontramos que durante la infección con RRV, la proteína cinasa dependiente de RNAdc (PKR) fosforila al factor eIF2 α , inhibiendo así la síntesis de proteínas. Además encontramos que en el citoplasma de células infectadas con RV hay RNAdc, el cual proponemos es el responsable de activar a la PKR.

En este trabajo, caracterizamos que tan general es la presencia del RNAdc entre diferentes cepas de RV; encontramos que la exposición del RNAdc al citoplasma es una característica general en las cepas estudiadas y la presencia de éste se observa en el citoplasma celular desde las 3 hpi, teniendo una colocalización no exclusiva con los viroplasmos, sobre todo en tiempos tardíos de la infección.

Exploramos otro sistema antiviral, inducible por los IFNs y activado por el RNAdc, el complejo 2'5-Oligoadenilato sintetasa/RNasa L (OAS/RNasa L). Encontramos que durante la infección este complejo se encuentra inactivo, pero sorprendentemente la infección con RV suprime la activación del complejo en presencia de potentes inductores como el RNAdc y los 2'5-oligoadenilatos (2'5-A), lo que sugiere que RV es capaz de modular dicho complejo. También encontramos que el o los componentes virales que inhiben la activación del complejo OAS/RNasa L forman parte de la capa externa de la partícula viral y que su efecto es en al menos dos etapas; la primera, en tiempos tempranos de la infección, donde proponemos que la proteína presente en la partícula viral entrante es suficiente para inhibir al complejo, pero que en tiempos tardíos de la infección, su síntesis es requerida para mantener

inactivo al complejo de forma eficiente. Por último, encontramos que el mecanismo molecular implicado en la modulación de dicho complejo antiviral no involucra cambios en la cantidad, ni en la distribución subcelular de la OAS1 y la RNasa L.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Los rotavirus

1.1.1 Importancia epidemiológica de las infecciones causadas por rotavirus

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades diarreicas son la segunda causa de muerte en niños menores de cinco años. En todo el mundo, se producen 2 000 millones de casos de diarrea y mueren 1.5 millones de niños cada año, lo cual constituye un serio problema de salud pública a nivel mundial.^[1]

Se ha identificado a los rotavirus como el principal agente etiológico de dichas enfermedades. La infección por rotavirus es la responsable de alrededor de 500 000 muertes anuales y aproximadamente el 39% de las hospitalizaciones por enfermedades diarreicas en menores de 5 años.^[1,2]

La tasa de incidencia de la infección por rotavirus es similar en los países en desarrollo y en los desarrollados, en donde ni la calidad del suministro de agua ni las condiciones higiénicas y sanitarias han tenido un impacto positivo en el control de la infección; sin embargo, en los países más pobres la tasa de mortalidad es mayor, como consecuencia de la desnutrición y de las dificultades para acceder oportunamente a los servicios de salud.^[1,2]

1.1.2 Generalidades de los rotavirus

Los rotavirus fueron descubiertos en 1973 por Ruth Bishop y colaboradores al estudiar por microscopia electrónica biopsias del intestino delgado de niños que tenían diarrea de causa desconocida. Posteriormente, se propuso el nombre de rotavirus (del latín *rota* “rueda”) con base en su morfología y se les incluyó en la familia *Reoviridae*.^[3]

Los rotavirus están divididos genéticamente e inmunológicamente en siete serogrupos del A al G. El serogrupo A de rotavirus es el más importante epidemiológicamente y por tanto es el que más se ha estudiado; este serogrupo está a su vez subdividido en diferentes serotipos y genotipos, clasificación basada en las

proteínas que forman la capa externa del virus,^[3] las cuales se describirán en la siguiente sección.

1.1.3 Estructura de los rotavirus

Los rotavirus son virus no envueltos, cuya partícula infecciosa con un diámetro de 75-100 nm está formada por tres capas concéntricas de proteínas que rodean el genoma viral, constituido por 11 segmentos de RNA de doble cadena (RNA_{dc}), que codifican para seis proteínas estructurales: VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7 (VP; *Viral Protein*) y para seis proteínas no estructurales: NSP1-NSP6 (NSP; *Non Structural Protein*). Debido a la diferencia en el tamaño de los segmentos de RNA_{dc}, es posible obtener un patrón electroforético característico del genoma viral, así como de sus proteínas (Figura 1.1).^[3,4,5]

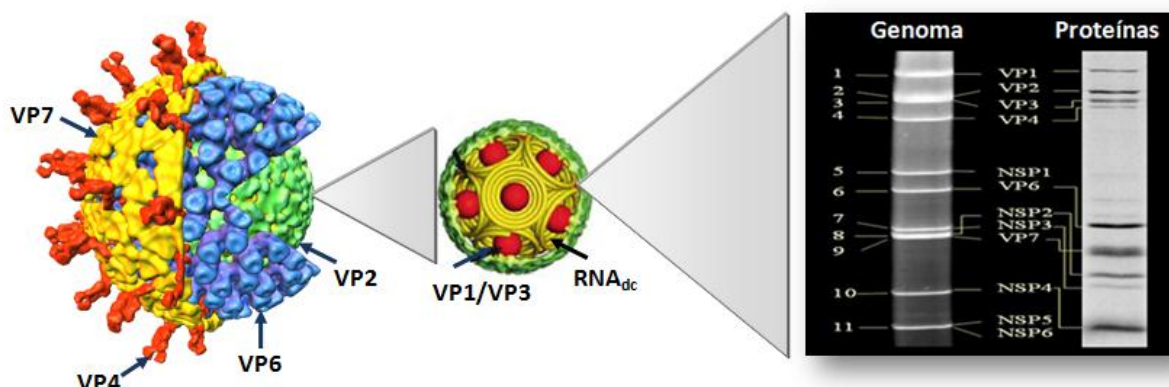


Figura 1.1: Estructura de la partícula viral de rotavirus y los patrones electroforéticos de su genoma viral así como de sus proteínas. Modificada de 5 y 6.

El genoma viral de rotavirus se encuentra rodeado por la nucleocápside, la cual está compuesta por 60 dímeros de la proteína VP2 y por pequeñas cantidades de VP1 y VP3. A su vez, la nucleocápside se encuentra rodeada por una capa intermedia compuesta por 260 trímeros de VP6; a las partículas de dos capas se les conoce como DLPs (del Inglés *Double Layered Particles*) y tienen la actividad de transcriptasa. La capa externa está compuesta por 780 moléculas de VP7 y de esta

capa se proyectan 60 espículas formadas por trímeros de VP4. Las partículas de tres capas conocidas como TLPs (*Triple Layered Particles*) constituyen la partícula infecciosa.^[3]

Las proteínas no estructurales de los rotavirus tienen diversas funciones, algunas se describen en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1: Características de los genes y proteínas codificadas por rotavirus. Adaptada de 3, 4, 5 y 11.

Gen	Tamaño (pb)	Proteína	Masa Molecular (KDa)	Función y propiedades de la proteína
1	3302	VP1	125	RNA polimerasa dependiente de RNA Existen 12 copias de VP1 en la partícula viral. Se une al RNAdc e interactúa con VP2 y VP3.
2	2690	VP2	102	Componente estructural de la nucleocápside Existen 120 copias de VP2, es una proteína que se une al RNAdc.
3	2591	VP3	88	Enzima con actividad de guanilil y metil transferasa Existen 12 copias de VP3, es una proteína de unión al RNA de cadena sencilla, se asocia con VP1.
4	2362	VP4	87	Actividad de hemaglutinina Existen 180 copias de VP4, es una proteína importante en la interacción con los receptores de la célula huésped y en la penetración del virus a la célula. Constituye las espículas de las TLPs.
5	1611	NSP1	59	Implicada en la modulación de la respuesta mediada por los interferones.
6	1356	VP6	45	Componente estructural de la capa intermedia. Con 780 copias asociadas en 260 trímeros por partícula viral. Es una proteína altamente hidrofóbica.
7	1104	NSP3	37	Implicada en la traducción de los mRNA virales. Proteína de unión al RNAdc, interactúa con eIF4G en el mismo lugar que PABP.
8	1059	NSP2	35	Componente estructural de los viroplasmata. Importante en la replicación y empaquetamiento del genoma viral, tiene actividad de NTPasa.
9	1062	VP7	37	Componente estructural de la capa externa. Con 780 copias asociados en 260 trímeros por partícula viral. Proteína de unión a iones calcio.
10	751	NSP4	20	Enterotoxina viral. Glicoproteína que se asocia al retículo endoplásmico, importante en los procesos de morfogénesis.
11	667	NSP5	26	Componente estructural de los viroplasmata. Interactúa con NSP2, proteína de unión al RNA y con actividad de cinasa.
		NSP6	11	Constituyente de los viroplasmata, interactúa con NSP5.

1.1.4 Ciclo replicativo

Los rotavirus tienen un alto tropismo por los enterocitos maduros presentes en las vellosidades del intestino delgado. Se ha reportado también, que estos virus son capaces de infectar varias líneas celulares de origen epitelial de riñón y de intestino.^[3]

El mecanismo de entrada de estos virus a sus células hospederas, es un fenómeno no del todo conocido, para el rotavirus de simio (cepa RRV) las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$ y la proteína de choque térmico hsc70 son las moléculas receptoras para la unión y la entrada en células de la línea MA104. La entrada está mediada por una vía dependiente de dinamina y colesterol. La unión de los rotavirus con su célula hospedera, es mediada por las proteínas de capa externa VP4 y VP7, las cuales se unen a diferentes receptores en la superficie celular. Para la correcta interacción de VP4 con sus receptores celulares es necesario un procesamiento previo con tripsina, el cual da origen a dos péptidos llamados VP5 y VP8.^[4,7,8]

Durante o justo después del proceso de entrada, los rotavirus pierden la capa más externa de proteínas quedando como DLPs en el citoplasma celular. En el interior de las DLPs, la polimerasa viral VP1 utiliza los 11 segmentos del RNAdc como molde para sintetizar los transcritos virales, los cuales migran hacia el citoplasma a través de canales formados por VP2. Cada uno de los genes de rotavirus tiene un marco de lectura abierto, el cual está flanqueado por regiones 5' y 3' que no se traducen, conocidas como UTRs (del Inglés *UnTranslated Region*), cuya longitud es variable, pero con pequeñas secuencias (4-6 bases) conservadas en los extremos las cuales son características para los 11 genes.^[3,8]

Durante la infección, los transcritos virales tienen dos funciones: a) dirigir la síntesis de proteínas y b) ser utilizado como molde para la síntesis del RNAdc.

En células infectadas, las proteínas virales NSP2 y NSP5 interaccionan entre sí y forman estructuras llamadas viroplasmos, en donde otras proteínas virales y el RNA viral se acumulan y se lleva a cabo la replicación así como el inicio de la morfogénesis viral (Figura 1.2). La replicación inicia con la formación de los

intermediarios de replicación (RI), llamados así por contar con actividad de replicasa. Los RIs llevan a cabo la síntesis del RNA_{dc} tomando como molde los mRNA virales. Estos intermediarios se forman a partir de un complejo inicial denominado precoreRI que carece de actividad de replicación e incluye a las proteínas VP1 y VP3. A partir de éste se ensambla otro complejo que ya incluye a las proteínas del núcleo viral llamado coreRI, el cual está constituido de VP1, VP2 y VP3 y puede tener asociadas las proteínas NSP2 y NSP5. Se ha propuesto que NSP2 puede funcionar como un motor molecular que se une al mRNA viral y acelera su empaquetamiento en las partículas recién formadas. La adición de VP6 da lugar al complejo llamado VP6RI que posee actividad de replicación y transcripción. Esta partícula da lugar a las DLPs formadas por las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP6. En la etapa final de maduración, las DLPs geman desde los viroplasmata hacia el lumen del retículo endoplásmico (RE) en un proceso dependiente de NSP4, proteína que funciona como receptor de las DLPs. Durante este proceso, las DLPs adquieren una membrana transitoria de lípidos la cual incluye a las proteínas VP4, VP7 y NSP4. Posteriormente, por un mecanismo aún desconocido la membrana lipídica y NSP4 se pierden y las DLPs retienen selectivamente a las proteínas VP4 y VP7 que se ensamblan formando la tercera capa del virus. Finalmente los viriones maduros se acumulan en el lumen del RE hasta que son liberados por lisis (ver Figura 1.2).^[3,5,7,8,9,10]

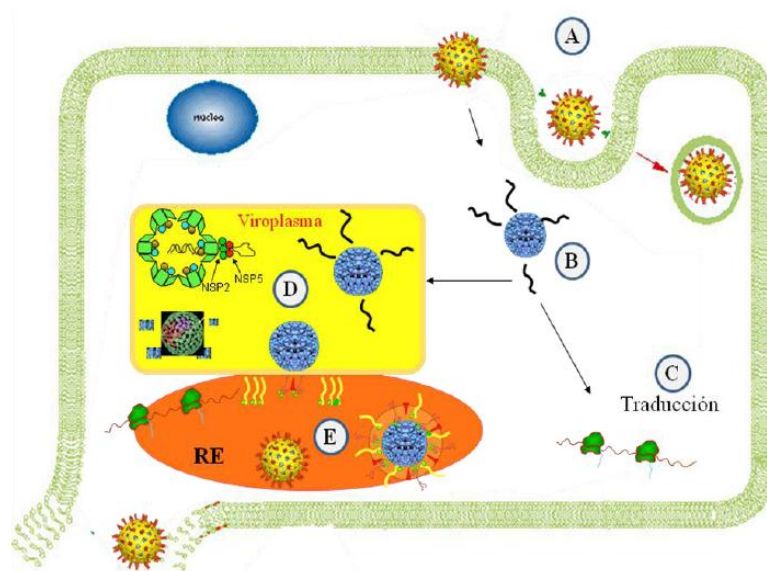


Figura 1.2: Ciclo replicativo de los rotavirus. Modificada de 5 y 6.

Dada la naturaleza del ciclo replicativo de los rotavirus se pensaba que durante toda la infección, el genoma de los rotavirus se mantenía dentro de estructuras virales o celulares, impidiendo que la célula detectara este RNA extraño y montara una respuesta celular para contrarrestar la infección viral.^[3,10,17]

1.2 Inmunidad innata en contra de las infecciones virales

El sistema inmune está encargado de proteger al organismo de distintos agentes patógenos así como de la formación de células tumorales. Una vez que el organismo entra en contacto con alguno de estos agentes, se monta una respuesta conjunta y coordinada en contra de ellos, denominada respuesta inmune.^[12]

El sistema inmune innato es esencial para detectar las infecciones virales, uno de sus principales medios para contenderlas es la respuesta mediada por los Interferones, la cual podría contender por si misma casi con cualquier infección viral.^[12,13]

1.2.1 Respuesta mediada por los Interferones (IFNs)

Los interferones (IFNs) son glicoproteínas solubles de 5-50 kDa, formados en promedio por 150 aminoácidos, son producidos por una gran variedad de células y ejercen su actividad a muy bajas concentraciones. Están involucrados en el envío de señales indispensables en la comunicación celular, especialmente entre las células del sistema inmune.^[12,14]

Estas citocinas se agrupan, con base en su secuencia, localización cromosomal y el receptor al que se unen, en tres grupos diferentes:

- **Interferones Tipo I (IFN I) o virales:** Comprenden a los IFN α , IFN β , IFN δ , IFN ϵ , IFN κ , e IFN ω . Constituyen la primera línea de defensa contra las infecciones virales.

- **Interferones tipo II (IFN II):** Comprende al IFN γ el cual es producido por los Linfocitos T y las células NK activadas por mitógenos. Llevan a cabo funciones inmunomoduladoras.
- **Interferones tipo III (IFN III):** Comprende a los IFN λ_1 , λ_2 , λ_3 , los cuales son conocidos como Interleucina 29 (IL-29), IL-28A e IL-28B respectivamente. Se les ha descrito actividad antiviral e inmunomoduladora, principalmente durante el embarazo.^[13,14]

Dentro del grupo de los IFNs, los del tipo I son los de mayor actividad antiviral, principalmente los IFN α e IFN β .^[15] En el resto del manuscrito, se referirá a los IFNs tipo I sólo como IFNs.

Las infecciones virales en casi todas las células inducen la producción y secreción de los IFNs. Los IFNs son producidos principalmente por las células mononucleares de sangre periférica; (de ahí su denominación como interferón leucocitario), linfocitos B y macrófagos, la gran mayoría de las células nucleadas de mamíferos también pueden producirlo, pero lo hacen en pequeñas cantidades.^[12,18]

En estado basal, las células no producen ni secretan IFNs de manera constitutiva, la transcripción de los genes que codifican para los IFNs ocurre sólo después de la exposición a un inductor apropiado que puede ser de origen bacteriano, fúngico o viral. Una vez producidos los IFNs, sus efectos biológicos *in situ* son casi inmediatos y algunos de ellos, como la transcripción de genes blancos, ocurren casi inmediatamente después de recibir el estímulo. Así mismo, los IFNs tipo I también tienen la capacidad de promover el crecimiento, diferenciación y función de diferentes células del sistema inmune, además de modificar la actividad de células inmunes una vez que éstas ya están activadas para potenciar su efecto contra células tumorales o infectadas por virus.^[15]

A continuación se mencionan los mecanismos descritos hasta la fecha, mediante los cuales las células detectan la presencia de agentes patógenos e inducen la producción de IFNs.

A) Inducción de los Interferones

Desde inicios de los 70's se conocía que el RNA de doble cadena (RNAdc) es un potente inductor de la respuesta de los interferones. Los grupos de Marcus & Sekellick, en 1977 y 1983, fueron los primeros en proponer un modelo para describir la producción de los IFNs en respuesta a la exposición de RNAdc. Hasta la fecha los mecanismos descritos comprenden la participación de receptores que reconocen a patrones moleculares asociados a patógenos (PPRs; *Pattern-Recognition Receptors*), en especial a los Receptores tipo Toll (TLRs; *Toll-like Receptor*) y a los receptores parecidos a RIG-1 (RLRs; *RIG-1-like Receptor*). En todos los casos la inducción de los IFNs, requiere de la activación del Factor Nuclear kappa B (NF- κ B) y de un conjunto de factores citoplásmicos conocidos como Factores de Regulación del IFN (IRF; *Interferon Regulatory Factors*), en donde el IRF-3 tiene un rol esencial.^[16,17]

Para la activación de los IRFs se requiere que éstos sean fosforilados, lo cual provoca un cambio de conformación, seguido de su asociación en dímeros; de este modo, las señales de localización nuclear (NLs) son expuestas y permiten su translocación hacia el núcleo. Una vez en el núcleo, dichos factores permanecen ahí hasta que son nuevamente defosforilados. Para el caso de NF- κ B, en células sin estimular, este factor se encuentra asociado a sus proteínas inhibidoras, las I κ Bs, que lo retienen en el citoplasma. Una vez recibido el estímulo, las I κ Bs son fosforiladas por el complejo de cinasas de I κ B (IKK), principalmente por la subunidad catalítica IKK β que requiere de la subunidad reguladora IKK γ (conocida como NEMO). Dicha fosforilación resulta en la posterior ubiquitinación y degradación vía proteasoma de los I κ B. Una vez disociado de I κ B, las NLs de NF- κ B median su translocación hacia el núcleo.^[19,20]

Los principales inductores de los IFNs, conocidos hasta la fecha son:

1) RNAdc extracelular o proveniente de los endosomas

Desde hace más de 30 años se observó que al adicionar RNAdc sintético en el medio de cultivo de líneas celulares, varias de ellas producían IFNs; también se

reportó que la presencia de RNAdc confinado en endosomas de células infectadas por virus cuyo genoma viral estaba constituido por RNAdc, inducía la producción de los IFNs. Fue hasta el 2001, cuando se esclareció que el receptor responsable de mediar la producción de IFNs en respuesta al RNAdc extracelular y en los endosomas era el TLR3.^[18,21]

La unión del RNAdc al TLR3 activa toda una vía de señalización para activar a NF- κ B y los IRFs (ver Figura 1.3).

2) RNA de cadena sencilla confinados en endosomas

Los TLR7 son los responsables de detectar el RNA de cadena sencilla confinado en los endosomas. La vía de inducción para la producción de los IFNs es esquematizada en la Figura 1.3 y es dependiente de la proteína MyD88.^[18,23]

3) DNA confinado en endosomas

Los TLR9 reconocen el DNA de patógenos confinado en endosomas e inducen la producción de IFNs en la célula infectada. La vía hasta ahora descrita se resume en la Figura 1.3 y también es dependiente de MyD88.^[23]

4) RNA viral intracelular

Recientemente se ha descrito una nueva forma de respuesta celular para contrarrestar las infecciones virales a nivel de citoplasma, en la cual participan las helicasas RIG-1 y MDA-5. La vía descrita para estas proteínas se resume en la Figura 1.3. Brevemente, una vez activas RIG-1 y MDA-5 reclutan y activan a moléculas de Cardif (*CARD Adaptor inducing IFN β*), conocidas con los nombres de VISA (*Virus Induced Signaling Adaptor*), IPS-1 (*IFN β promoter stimulator protein 1*). IPS-1 interactúa directamente con TRAF6 y se sospecha que también con TRAF3. En ratones deficientes de IPS-1, se ha demostrado que dicho adaptador es una molécula clave para la vía, la cual no es redundante con la de los TLRs y que NF- κ B puede activarse de manera dependiente de caspasa 10 y 8.^[17,21,22]

5) DNA citoplásmico

Algunas células de mamíferos, en especial los macrófagos y las células dendríticas, son capaces de responder a la presencia de DNA extraño que se encuentra en su

citoplasma e inducir la producción de interferones. Pese a que aún se desconoce la vía de inducción, se cree que el receptor involucrado es una molécula llamada DAI/DLM-1/ZBP1, descrita por primera vez en 2007 por Takaoka y colaboradores.^[24]

6) Componentes estructurales

Algunos componentes estructurales de patógenos; especialmente ciertas proteínas virales, como la proteína de envoltura gp120 del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV), así como proteínas de superficie de los Citomegalovirus humanos y/o Herpes virus tipo-1, son capaces de inducir la producción de los IFNs. También se ha descrito que los TLRs 1, 2 y 4 son capaces de inducir la producción de IFNs, tras unirse a sus ligandos.^[21,24]

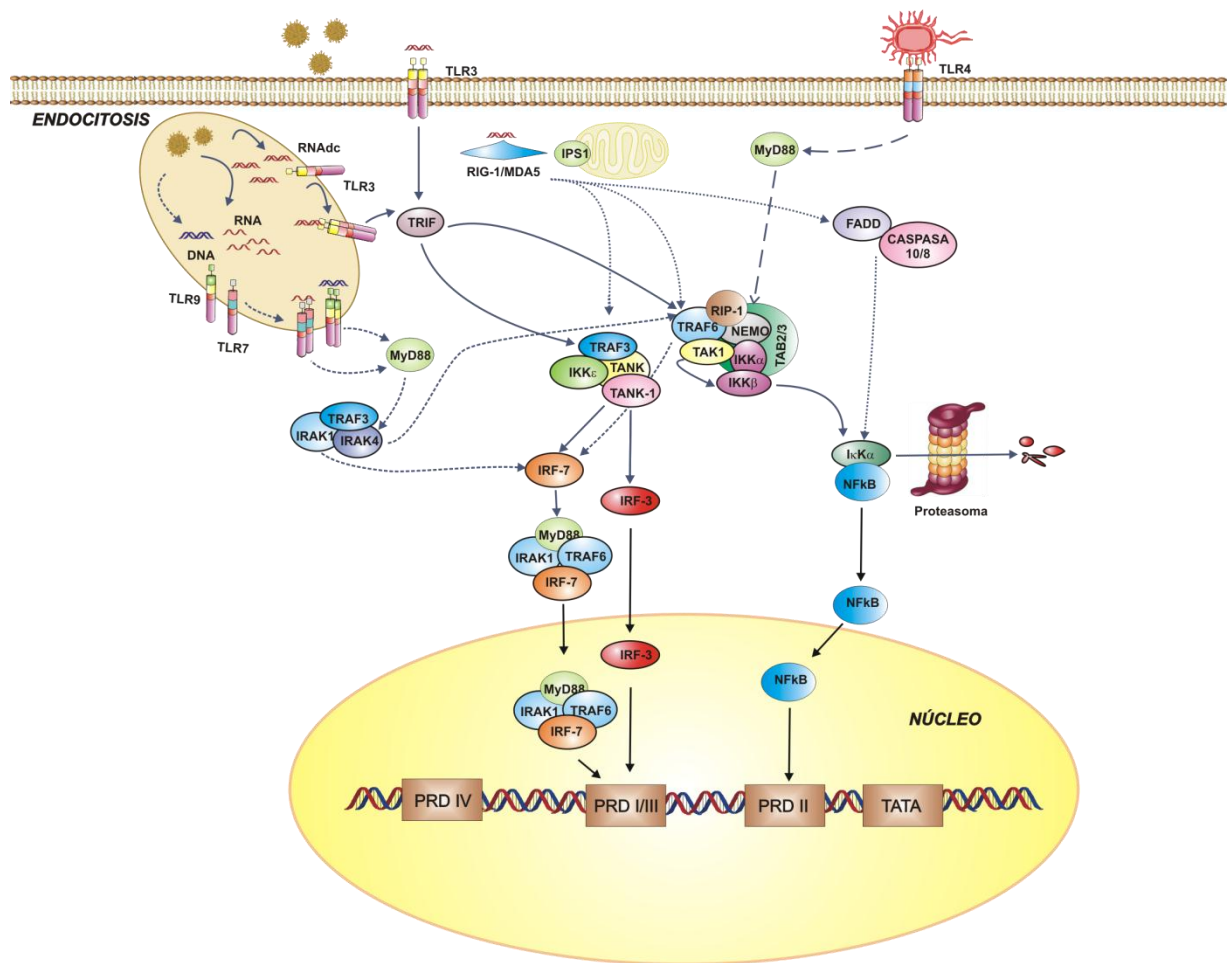


Figura 1.3: Señalización involucrada en la producción de IFNs.

Una vez que los IFNs son sintetizados, estos son exportados al medio extracelular para unirse a sus receptores expresados de manera ubicua en todas las células nucleadas.^[24]

Los receptores para los IFNs tipo I, están compuestos por al menos dos subunidades diferentes: I) IFNRA1 y II) IFNRA2, (*Interferon Receptor*). Cada una de estas subunidades interactúa con una cinasa miembro de la familia de las Janus (*JAK; Janus Kinase*), para el caso específico de INFR1 ésta se encuentra asociada con TYK2 (*Tyrosine kinase 2*) mientras que la subunidad IFNRA2 se encuentra asociada a JAK1.^[12,20]

La unión de los IFNs a su receptor, induce un cambio conformacional en éste para inducir un rearrreglo conformacional seguido de la dimerización del receptor, que permite la autofosforilación y activación de sus JAKs asociadas. A continuación la señal es transmitida por la vía de las JAK-STAT. De esta manera, las proteínas se estabilizan por dimerización y pueden ser capaces de realizar su función como factores de transcripción (ver Figura 1.4).^[12,20]

En el citoplasma, los dímeros STAT, se asocian con IRF-9 formando el complejo conocido como ISFG3, el cual migra al núcleo donde se une y reconoce a secuencias de DNA y activa la transcripción de cientos de genes que confieren un estado antiviral a la célula, este grupo de genes se conoce como ISG's (Genes Estimulados por Interferón) cuyos productos impiden la replicación viral por diversos mecanismos que incluyen desde la inhibición de la síntesis de proteínas virales, aumento en la expresión de genes cuyos productos desempeñan un importante papel antiviral o en última instancia induciendo la muerte de la célula infectada.^[19,24]

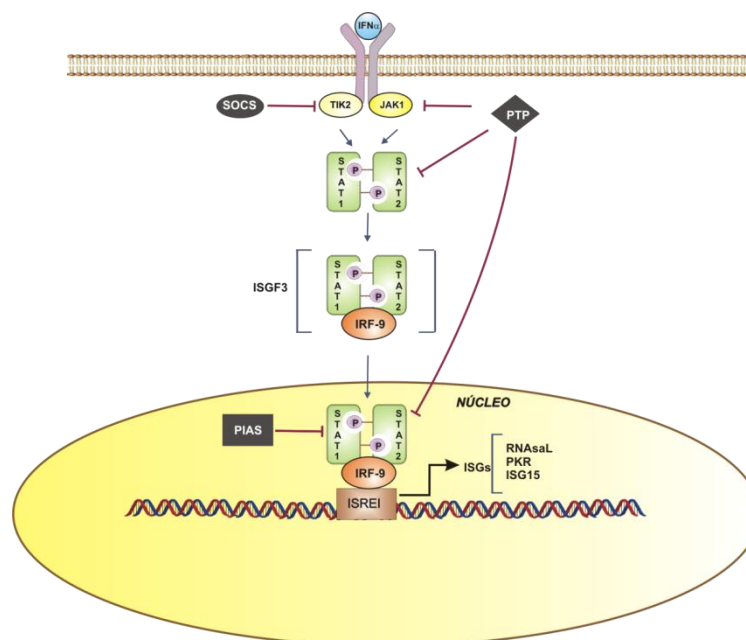


Figura 1.4: Vía de señalización de los IFNs.

Entre las principales proteínas inducibles por los IFNs, con actividad antiviral directa, destacan:

- A) **Proteína cinasa dependiente de RNAdc (PKR):** Se autofosforila y mediante la fosforilación del factor eIF2, inhibe la síntesis de proteínas. Esta proteína también es requerida para activar a NF- κ B e IRF-1.
- B) **Proteína p56:** Es capaz de interactuar con el factor eIF-3 e inhibir la síntesis de proteínas.
- C) **Proteínas Mx:** Son GTP-asas miembros de la superfamilia de las dinaminas que juegan un papel esencial en infecciones por virus de RNA. Son encontradas en vertebrados y están involucradas en la resistencia contra infecciones virales, bloqueando la replicación de una gran variedad de virus.^[13,15]
- D) **El complejo 2'5-Oligoadenilato sintetasa/RNasa L:**
 La RNasa L es una endoribonucleasa con funciones antivirales y antitumorales, es la enzima ejecutora del sistema 2'5-Oligoadenilato sintetasa (2'5 OAS)/RNasa L, que se activa en respuesta a infecciones virales.^[25]

El RNAdc producido durante la infección viral se une y activa a la OAS, una vez activada dicha enzima convierte el ATP a pirofosfato y a una inusual serie de oligoadenilatos con enlaces 2'5, colectivamente llamados 2'5-oligoadenilatos. En humanos se han descrito 4 genes: OAS1, OAS2, OAS3 y OASL, que codifican para al menos 20 isoformas de la OAS, como resultado del procesamiento de los mRNAs. Hasta la fecha, la única función descrita de los 2'5- A es activar a la RNasa L, los 2'5-A se unen con alta afinidad a los monómeros de la RNasa L, induciéndoles un cambio conformacional que permite la dimerización de dicha enzima. Una vez formado el dímero de RNasa L, este tiene actividad de endonucleasa, que corta RNA de cadena sencilla; como el RNA ribosomal (rRNA) y mensajero (mRNA) en secuencias ricas en UU y UA, conduciendo a la inhibición de la síntesis de proteínas (ver Figura 1.5). También se ha descrito que la RNasa L induce la apoptosis de las células infectadas, no obstante los mecanismos implicados aún no son del todo conocidos.^[25,26,27]

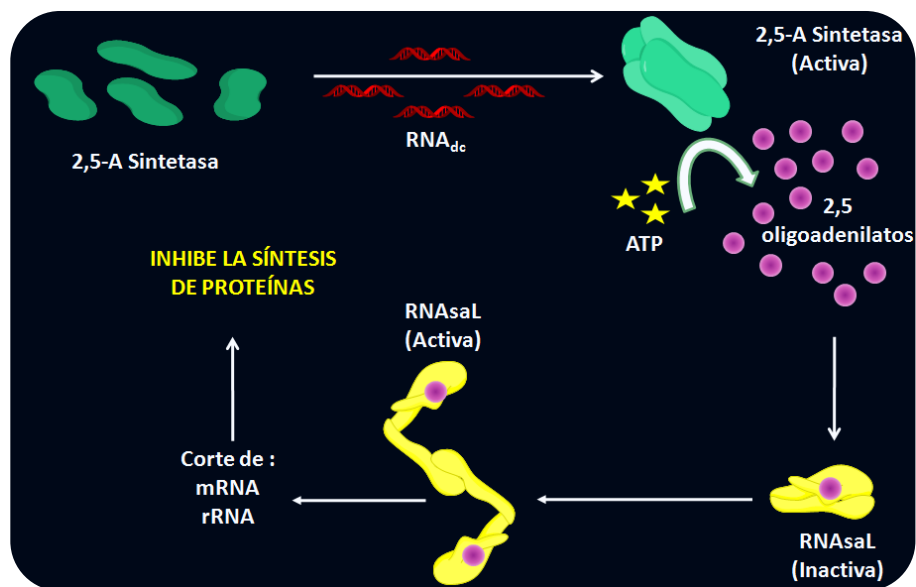


Figura 1.5: Vía 2'5-Oligoadenilato sintetasa/RNasa L inducida por el RNAdc. Adaptada de 20.

II. ANTECEDENTES

2.1 Los rotavirus modulan la respuesta mediada por los interferones tipo I

En humanos y otros mamíferos la infección por rotavirus induce la respuesta mediada por interferones. Se ha demostrado que el pretratamiento con IFNs puede reducir la gravedad de los episodios diarreicos en terneros, mientras que en ratones se han obtenido resultados controversiales, que abarcan desde un efecto protector, irrelevante o perjudicial en la infección con rotavirus. También se ha descrito que dicha respuesta es dependiente de la cepa así como de la célula hospedera, por ejemplo, la replicación de la cepa bovina UK en fibroblastos murinos está restringida por la respuesta de los IFNs, mientras que la cepa de simio RRV es insensible a tal respuesta.^[29]

De manera general, los rotavirus pueden contender hasta cierto punto con la respuesta mediada por los interferones tipo I, para ello han desarrollado diversas estrategias que bloquean dicho sistema a diferentes niveles.^[30,31] Hasta el momento, se han reportado al menos cuatro mecanismos por los cuales los rotavirus son capaces de evadir la respuesta a los interferones:

- 1) Degradación vía proteosoma de los IRF3, IRF5, IRF7 mediada por la proteína viral NSP1.
- 2) Degradación vía proteosoma del factor β -TrCP mediado por la proteína viral NSP1.
- 3) Secuestro de NF- κ B en los viroplasmos.
- 4) Inhibición de la traslocación hacia al núcleo de los dímeros STAT.^[29,32]

Recientemente, Hung y colaboradores reportaron un nuevo mecanismo de RV para contender con la respuesta de los IFNs, en donde NSP1 promueve la degradación de RIG-I.^[39]

Greenberg y colaboradores propusieron un nuevo modelo para describir los eventos que ocurren durante las primeras etapas en la infección con rotavirus y que podrían conducir o no a la secreción de IFN- β (ver Figura 2.1). Ellos proponen que los rotavirus de las cepas UK y RRV regulan la respuesta de los IFNs desde las etapas

del reconocimiento de los virus, en donde las helicasas MDA-5 y RIG-I, más no los TLR3, tienen un papel importante. También señalaron que las proteínas adaptadoras MAVS/IPS-1 son esenciales, ya que al ser silenciadas mediante siRNAs se depleta casi por completo la producción del IFN- β . De acuerdo con este modelo, la cepa UK desencadena la secreción de IFN y la amplificación de la respuesta de los IFNs es dependiente de PKR, quien promueve la síntesis de los IFNs a nivel postranscripcional. Estos autores sugieren que la función de PKR puede ser directa o indirecta, sin embargo su papel exacto es poco conocido.^[32]

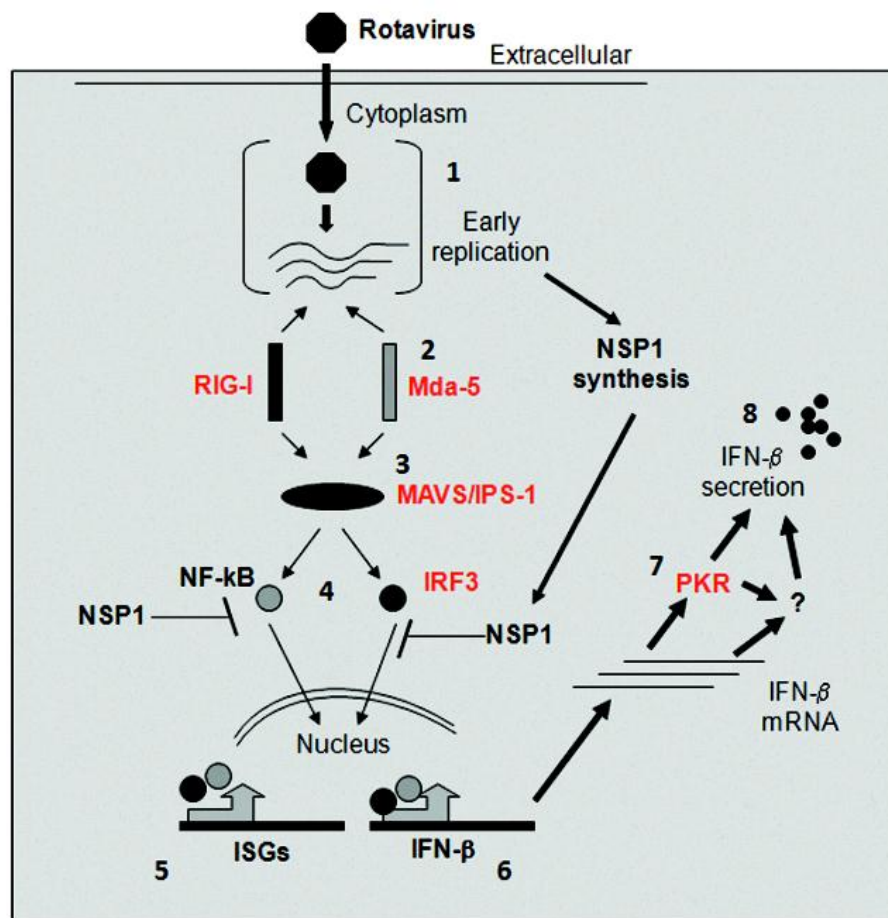


Figura 2.1: Eventos que ocurren durante las etapas tempranas del reconocimiento de los rotavirus para la inducción de los IFNs. Una vez que la partícula viral de rotavirus se encuentra dentro de la célula hospedera (1) y se inicia la síntesis de los transcritos virales, se activan las helicasas RIG-I y MDA-5 (2) con el subsecuente reclutamiento de los adaptadores MAVS/IPS-1(3) para activar a IRF-3 y NF- κ B (4). Estos factores de transcripción inducen la expresión de los ISGs, incluyendo ISG54, ISG56, ISG15, IRF-7, IRF-5 e IRF-4 y de los genes del IFN- β (5 y 6). Para el caso de los IFNs- β estos son producidos en el citoplasma celular (7) y posteriormente secretados al medio extracelular (8) con el fin de amplificar la respuesta antiviral en las células vecinas. Tomado de 32.

2.2 Los rotavirus y la vía 2'5'-Oligoadenilato sintetasa/RNasa L

En la infección por rotavirus aún no se ha estudiado la participación de la vía 2'5'-OAS/RNasa L para contender con la infección viral, en estudios previos de nuestro grupo de trabajo, se detectó la presencia de RNAdc en el citoplasma de células infectadas con rotavirus de la cepa RRV, pero no en células sin infectar, mediante inmunofluorescencia empleando un anticuerpo monoclonal anti-RNAdc.^[35] Además al tratar a las células infectadas con una ribonucleasa que degrada específicamente el RNA de doble cadena (RNasa III) o una ribonucleasa que degrada RNA de cadena sencilla (RNasa A), se encontró que el RNAdc detectado en el citoplasma de dichas células es sensible únicamente a la acción de la RNasa III. Estos resultados sugieren la presencia de RNAdc viral en el citoplasma de células infectadas, el cual parece no estar asociado a viroplasmos ni a partículas virales y que probablemente es el responsable de inducir la activación de la PKR.^[6]

Con base en estos resultados, se esperaría que otros mecanismos de la respuesta celular dependientes del interferón, inducidos por la presencia de RNAdc como el complejo 2'5'-OAS/RNasa L, se encontrara activo durante la infección por rotavirus. No obstante, estudios preliminares de nuestro grupo, en donde la activación del complejo 2'5'-OAS/RNasa L fue medida indirectamente, determinando la integridad de los rRNAs mediante electroforesis capilar, se encontró que en lisados de células transfectadas con RNAdc los rRNAs 18s y 28s, que corresponden a las subunidades pequeña y grande del ribosoma, aparecen degradados, lo que indica la activación del complejo 2'5'-OAS/RNasa L. En contraste, se encontró que en células infectadas con rotavirus, la integridad de los rRNAs se asemeja a la observada en los controles de células no infectadas, lo que sugiere que dicha vía está inactiva.

En ensayos preliminares en donde las células fueron transfectadas a diferentes tiempos con RNAdc antes de ser infectadas con RRV se encontró que el RNAdc induce la activación de la RNasa L, con la consecuente degradación de los rRNAs. Sin embargo, en las células que fueron además infectadas, se observó que la degradación de los rRNAs es menor con respecto a las células que únicamente fueron transfectadas con RNAdc (datos no publicados). En conjunto, estos resultados

sugieren que en la infección por rotavirus la vía 2´5-OAS/RNasa L podría activarse, pero es posible que en algún momento los rotavirus sean capaces de suprimirla.

Cómo se mencionó anteriormente, la vía 2´5-OAS/RNasa L representa una potente respuesta celular antiviral, para la cual varios tipos de virus han desarrollado diferentes mecanismos de evasión a la acción de dicho complejo, algunos ejemplos son mostrados en la tabla 2.1.

VIRUS	NIVEL DE ACCIÓN	MECANISMO
Herpes simple tipo 1 y 2	Síntesis de análogos de 2´5-oligoadenilatos	Se sintetizan análogos de 2´5-oligoadenilatos, que se unen a los monómeros de la RNasa L inhibiendo así su activación.
Virus de Simio 40 (SV40)		
Hepatitis C (VHC)	Selección de variantes	Los mRNA del VHC-1 expuestos al IFN acumulan mutaciones silenciosas que disminuyen los sitios de corte de la RNasa L.
Vaccinia	Inhibición de la activación de la OAS	Las proteínas virales E3L (vaccinia) y NS1A (influenza) se unen al RNAdc, impidiendo la activación de las OAS.
Influenza A		
Inmunodeficiencia humana. (HIV)	Reclutamiento del inhibidor endógeno de la RNasaL (RLI)	El HIV aumenta la expresión del RLI, que al unirse a su sitio alostérico en el monómero de la RNasa L impide que los oligoadenilatos se unan a la RNasa L.

Tabla 2.1: Mecanismos involucrados en la inhibición de la vía 2´5-OAS/RNasaL en infecciones virales. Adaptada de 25 y 28.

III. HIPÓTESIS

Los rotavirus modulan la vía antiviral 2'5-Oligoadenilato sintetasa/RNasa L empleando diferentes mecanismos.

IV. OBJETIVOS

General:

Determinar si la vía 2´5-OAS/RNasa L se activa durante la infección por rotavirus. De ser así, caracterizar como se modula esta vía durante la infección.

Particulares:

- A. Determinar si la vía 2´5-OAS/RNasa L es activada durante la infección por rotavirus.
- B. Determinar si los rotavirus inhiben la activación de la 2´5-oligoadenilato sintetasa o de la RNasa L.
- C. Estudiar la participación de cada una de las proteínas virales en la modulación de la vía 2´5-OAS/RNasa L.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Líneas celulares y cepas virales

Se empleó la línea celular MA104 derivada del epitelio renal del mono Rhesus (*Macaca mulatta*) obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Para su mantenimiento, la línea celular fue cultivada en medio Advanced Dulbecco Modified Eagle de alta glucosa reducido en suero (DMEM-RS) (*Thermo Scientific Hyclone, South Logan, Utah*) suplementado con 4% de suero fetal bovino (SFB) inactivado (*Biowest, México*). Los cultivos celulares fueron incubados en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C. Después de formar una monocapa a confluencia, las células se trataron con EDTA 0.02%, tripsina 0.01% y agitación mecánica para favorecer su desprendimiento. De la suspensión celular obtenida se procedió a cultivar en: I) portaobjetos de 10 mm de diámetro, II) placas de 48 y 96 pozos y c) frascos de diferentes formatos.

Las cepas de rotavirus empleadas fueron a) cepa de simio RRV; obtenida de H.B. Greenberg de Stanford University, b) cepa bovina UK; proporcionada por el Dr. Hoshino del National Institutes of Health (NIH) y c) la cepa porcina YM; aislada en nuestro laboratorio, todas las cepas fueron propagadas en células MA104, tal como se ha descrito previamente.^[33] Los lisados virales para las cepas RRV y YM fueron activados durante 30 minutos a 37°C con tripsina a una concentración de 100 µg/mL, mientras que la cepa UK fue activada a una concentración de 10 µg/mL. Los lisados fueron titulados como se describe en la siguiente sección.

5.2 Titulación del virus

Para obtener el título viral de los lisados, se determinó el número de focos (UFF/mL) mediante un ensayo de inmunoperoxidasa; para esto, células crecidas en placas de 96 pozos se infectaron con diluciones seriadas de las diferentes cepas de rotavirus a las 14-16 horas post infección (hpi), las células fueron fijadas y permeabilizadas con acetona al 80% en PBS durante 20 minutos, posteriormente fueron lavadas con PBS e incubadas con el anticuerpo policlonal α-TLPs (dirigido contra la partícula viral

completa de rotavirus y producido en conejo en nuestro laboratorio). El α -TLPs se empleó a una concentración 1:2000 diluido en PBS e incubado 1h a 37°C. Después de este lapso, las células fueron lavadas con PBS e incubadas con la proteína A acoplada a peroxidasa, diluida 1:3000 en PBS durante 1h a 37°C. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS y como sistema revelador se utilizó una solución de peróxido de hidrógeno y 3-amino-9-etil carbazol en amortiguador de citratos. El tiempo de revelado fue entre 3 a 5 minutos o hasta observar la presencia de color, finalmente la reacción fue detenida con agua. Las unidades formadoras de focos (FFUs) fueron contadas en un microscopio Invertido (*Nikon Diaphot 300, Japón*) provisto de una cámara a color (*Q Imaging, Canada*) empleando el programa Image-Pro 6.3.

5.3 Purificación de Partículas virales y RNA de doble cadena (RNAdc)

Monocapas confluentes de células MA104 crecidas en frascos, fueron infectadas con RRV a una MOI de 3 y cosechadas 14-16 hpi. Los lisados virales fueron congelados y descongelados tres veces y posteriormente recolectados. Las partículas virales se concentraron por ultracentrifugación durante 2 h a 35,000 rpm a 4° C en un rotor SW40 (*Beckman, Fullerton, CA*). Los botones obtenidos fueron resuspendidos en el mínimo volumen de TNC (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 140 mM NaCl, 10 mM CaCl₂). Posteriormente se realizaron al menos dos extracciones con triclorofluorometano (Freón II), recolectando la fase acuosa, a partir de la cual se obtuvo el RNA genómico o las partículas virales.

Para extraer el RNAdc, la fase acuosa fue recolectada y centrifugada sobre un colchón de sacarosa al 45% durante 1.5 h a 40,000 rpm a 4 °C en un rotor SW50.1 (*Beckman, Fullerton, CA*). Los pellets que contenían a las partículas virales semipurificadas se sometieron a extracciones con fenol/cloroformo para obtener el RNA viral.

Para obtener las partículas de dos y tres capas (DLPs y TLPs), a la solución obtenida con la extracción de freón se le adicionó CsCl para obtener una densidad de 1.36 g/cm³ a continuación la mezcla fue centrifugada durante 18 h a 35,000 rpm en un

rotor SW 50.1 a 4°C. Las bandas opalescentes correspondientes a las TLPs y DLPs fueron colectadas por punción y almacenada a 4°C hasta su empleo.

Las TLPs y DLPs fueron desaladas antes de ser empleadas en los ensayos, previo al desalado, las DLPs fueron tratadas con 10 mM de Tris-HCl pH 7.5 y EGTA 10 mM durante 30 min a 37 °C con el fin de asegurar la completa eliminación de la capa externa de las partículas, después la mezcla fue diluida con el amortiguador TNC y concentrada por ultracentrifugación. Para el desalado, las TLPs y DLPs se diluyeron 1:200 en TNC y concentradas por ultracentrifugación durante 1 h a 40,000 rpm a 4°C. El botón obtenido se resuspendió en TNC y la concentración de las partículas fue cuantificada en el Nano Drop Spectrophotometer ND-100 (*NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, Delaware.*)

5.4 Lipofección

Para la lipofección de los siRNAs, se preparó una mezcla de oligofectamina (*Invitrogen, Carlsbad, CA*) en MEM sin suero a una concentración de 15 µL/mL con 1 µM del siRNA indicado. Esta mezcla se incubó en placas de 48 pozos durante 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se sembraron 8 000 células en cada pozo en un volumen final de 300 µL por pozo.

Las células con la mezcla transfectante se incubaron 72 h y posteriormente recibieron el tratamiento indicado en los pies de figura. Los RNA interferentes utilizados fueron SMARTpool siRNA contra: a) RNAsa L y b) OAS1. Así como un siRNA sin secuencia blanco en el genoma humano (como control irrelevante) todos de *Dharmacon Research (Lafayette, CO)*.

Para la lipofección de las DLPs, las TLPs, el RNAdc y los 2´5-oligoadenilatos (que fueron donados por el Dr. Robert H. Silverman del Department of Cancer Biology, Cleveland Clinic Foundation) las células crecidas a confluencia en placas de 48 pozos fueron incubadas con 100 µL de una mezcla de RNAdc, poly (I:C) de *Sigma, Aldrich Co, St Lois MO* o los oligoadenilatos a diferentes concentraciones, empleando como agente transfectante Lipofectamina 2000 a una concentración de 20 µL/mL (*Invitrogen, Carlsbad, CA*). Las células fueron incubadas a 37 °C por diferentes tiempos, según el ensayo requerido.

5.5 Marca Metabólica

Para analizar la síntesis de proteínas, monocapas de células crecidas en placas de 48 pozos, tratadas bajo diferentes condiciones, se les adicionó media hora antes de cosecharlas, medio sin metionina suplementado con 25 $\mu\text{Ci/mL}$ de Easy Tag Express (^{35}S) (*Perkin Elmer, Boston, USA*). Las células se lisaron con el buffer de Laemmli, como se indica en la sección de Western blot, las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se analizaron por autorradiografía en Storage phospho- autoradiography empleando el Typhoon Trio de *Amersham Biosciences*.

5.6 Ensayos de inmunofluorescencia

Células sembradas en portaobjetos de 10 mm de diámetro con una confluencia entre 80-90%, se lavaron con MEM sin suero y posteriormente recibieron el tratamiento indicado en los pies de figura. Terminado el tiempo del tratamiento, las células fueron fijadas con 200 μL de paraformaldehído disuelto en PBS a una concentración del 2% durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente las células fueron lavadas 4 veces con la solución de lavado (50 mM NH_4Cl en PBS). Las células se permeabilizaron con 200 μL de la solución de permeabilización (0.5% Tritón Tx-100, 1% BSA, 50 mM NH_4Cl en PBS) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación, las muestras se lavaron con la solución de lavado.

Se procedió al bloqueo de las muestras con 200 μL de la solución de bloqueo (1% BSA, 50 mM NH_4Cl en PBS) durante 12 h a 4°C o bien 1h a TA. Posteriormente, las muestras se lavaron e incubaron a TA durante 1 h con 50 μL de la mezcla de los anticuerpos primarios: a) anticuerpo monoclonal J2, (hecho en ratón, clona J2-1003 de *Scicons, Hungary*) a una concentración de 1:2000, empleado para detectar el RNAdc, b) el anticuerpo monoclonal anti-RNasa L (hecho en ratón, clona E-9, ABCam) a una concentración de 1:300, c) el anticuerpo anti-OAS1 (hecho en ratón, clona 2E9, ABCam) a una concentración de 1:200 y c) anticuerpo policlonal $\alpha\text{-NSP5}$ (producido en conejo en nuestro laboratorio) a una concentración de 1:500, todos los anticuerpos diluidos en la solución de bloqueo. Después de este lapso, las células se lavaron tres veces con solución de lavado y se incubaron con un coctel de

anticuerpos: anticuerpo α -ratón conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 488, anticuerpo α -conejo conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 568 (ambos obtenidos de *Molecular Probes California, CA, USA*) y para teñir núcleos se usó el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), todos los anticuerpos se emplearon a una concentración 1:1000 y el DAPI a 300 nm, diluidos en solución de bloqueo e incubados 1h en cámara húmeda a TA, protegidos de la luz.

Terminado el periodo de incubación, las muestras fueron lavadas como se describió anteriormente y finalmente los portaobjetos se montaron con Fluokept (*Argene, Verniolle, French*) sobre portaobjetos pulidos (*Lauka, México*) para ser observadas en el microscopio de Epifluorescencia (*Zeiss Axioskop 2 Mot Plus*) acoplado a una cámara digital (*Photometrics Coolsnap HQ*). Las imágenes fueron capturadas digitalmente y editadas en Image J versión 1.44o.

5.7 Detección de la RNasa L y OAS1 por Western blot

Para lisar a las células, se trataron con el buffer de Laemmli (50 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10% glicerol, 1% β -mercaptoetanol en agua) y posteriormente fueron hervidas durante 10 minutos. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y transferidas a una membrana Inmobilon NC (Millipore) durante 1 h a 120 mA, en amortiguador CAPS (10 mM, pH 11) adicionado con 10% de metanol. Posteriormente la membranas fueron bloqueadas con la solución de bloqueo (5% BSA, 0.1% Tween 20 en PBS) durante toda la noche a 4°C.

Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-RNasa L, (hecho en ratón, clona E-9, ABCam) a una concentración 1:1000 o anti-OAS1 (hecho en ratón, clona 2E9, ABCam) a una concentración de 1:2500. Ambos anticuerpos diluidos en la solución de bloqueo durante 48 h a 4°C. Después de ese lapso, las membranas se lavaron tres veces; cada lavado de 10 minutos con la solución de lavados (0.1% Tween 20 en PBS) y posteriormente incubadas con el anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa a una concentración 1:3000 diluido en la solución de bloqueo suplementada con 5% de leche. Al finalizar la incubación, se hicieron 3 lavados, como se describió previamente. Finalmente las proteínas se detectaron con el sustrato para peroxidasa Western Lightning®-ECL, Enhanced Chemiluminescence

Substrate (Perkin-Elmer, *Massachusetts, USA*) de acuerdo a las instrucciones del proveedor, empleando la película hipersensible Kodak® X-Omat.

5.8 Inactivación de partículas virales.

La inactivación de las partículas virales se realizó de acuerdo a lo descrito por Groene (1992). Brevemente, la inactivación consistió en tratar el lisado viral con 100 µg/mL de tripsina durante 30 minutos a 37°C y posteriormente con 40 µg/mL de psoralen (Sigma-Aldrich) durante 20 min a 4°C, mantenido en agitación constante a 4°C y protegido de la luz. Posteriormente el lisado viral fue irradiado durante 2 h con luz UV de longitud de onda larga. La distancia entre la fuente de luz UV y el lisado viral no fue mayor a 5 cm. Durante el tiempo de irradiación los lisados se mantuvieron en hielo.

5.9 Integridad de los RNA ribosomales (rRNA)

Para determinar la activación del complejo 2´5-OAS/RNasa L se evaluó la integridad de los rRNAs después de cada uno de los tratamientos, para esto se aisló el RNA total con el Kit PureLink RNA Mini Kit (*Invitrogen, Carlsbad, Ca*) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se empleó el kit Agilent RNA 6000 Nano Complete Kit with Reagents and Chips (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA*), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. En cada uno de los carriles del chip, cargados previamente con la matriz de corrida y los marcadores correspondientes, se depositó 1 µL del RNA aislado y previamente calentado a 72°C durante 2 minutos, enseguida el chip se agitó a 2400 rpm durante 1 minuto y se analizó en el Bionalizador *2100 Bioanalyzer* de Agilent Technology (Santa Clara, CA), empleando el programa Eukaryote Total RNA Nano, Version 2.6. Los resultados se presentan como imágenes parecidos a geles.

Para cuantificar la actividad de la RNasa L, se determinó el porcentaje del RNA total que representaba la suma de cada uno de los productos de corte de la RNasa L, empleando el mismo programa Eukaryote Total RNA Nano.

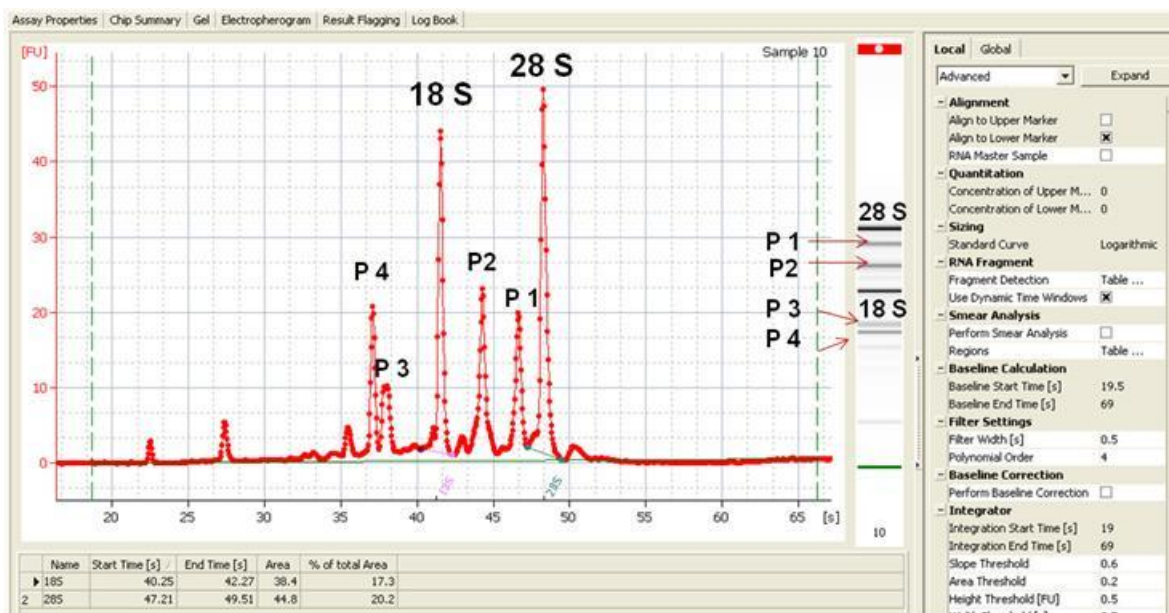


Figura 5.1: Análisis representativo de la cuantificación de los productos de corte de la RNasa L: Para cada una de las muestras analizadas en el Bioanalizador se obtuvo un electroferograma, en donde se identificaron los picos correspondientes a los rRNAs de las subunidades 18S y 28S, así como los productos de corte de la RNasa L (P1, P2, P3 y P4), con ayuda del programa del equipo se determinó el área bajo la curva para cada uno de los picos y se relacionó con la cantidad total del RNA para determinar el porcentaje que cada uno de los picos representa con respecto a la cantidad total de RNA de la muestra en estudio.

VI. RESULTADOS

6.1 El RNAdc se encuentra presente en el citoplasma de las células infectadas con las cepas RRV, UK y YM desde las 3 hpi.

De acuerdo al paradigma actual, durante la replicación de los rotavirus, el RNAdc siempre se encuentra confinado en estructuras celulares o virales, lo cual impide que se active la respuesta mediada por los IFNs. Sin embargo, en nuestro grupo de trabajo se encontró que en células infectadas con el rotavirus de simio RRV, hay RNAdc en el citoplasma de las células y se propone que éste es el responsable de activar a la PKR.^[6] En este trabajo inicialmente estudiamos que tan general era la expresión del RNAdc en el citoplasma celular entre diferentes cepas de rotavirus. Para ello empleamos la cepa bovina UK, que en fibroblastos murinos es sensible a la respuesta de los IFNs^[29] y a la cepa porcina YM, que en comparación con la cepa RRV, induce un menor grado de fosforilación de eIF2 α , pero disminuye severamente la síntesis de proteínas celular en células MA104.^[6] Para determinar los tiempos a los cuales el RNAdc viral aparece en el citoplasma de las células infectadas, se realizaron inmunofluorescencias a diferentes tiempos post infección con las 3 cepas virales, empleando una MOI de 10. En todos los casos encontramos que desde las 3 hpi, el anticuerpo monoclonal J2 (anti-RNAdc), detectó la presencia de RNAdc en el citoplasma de las células infectadas con un alto grado de colocalización de éste con los viroplasmos. Sin embargo, también observamos que al avanzar la infección, la cantidad de RNAdc que se encuentra fuera de los viroplasmos va en aumento (ver Figuras 6.1-6.3).

Estos resultados indican que la exposición del RNAdc al citoplasma de las células infectadas por rotavirus no es una particularidad de la cepa RRV, y que desde las 3 hpi ya se encuentra este material en el citoplasma de las células infectadas.

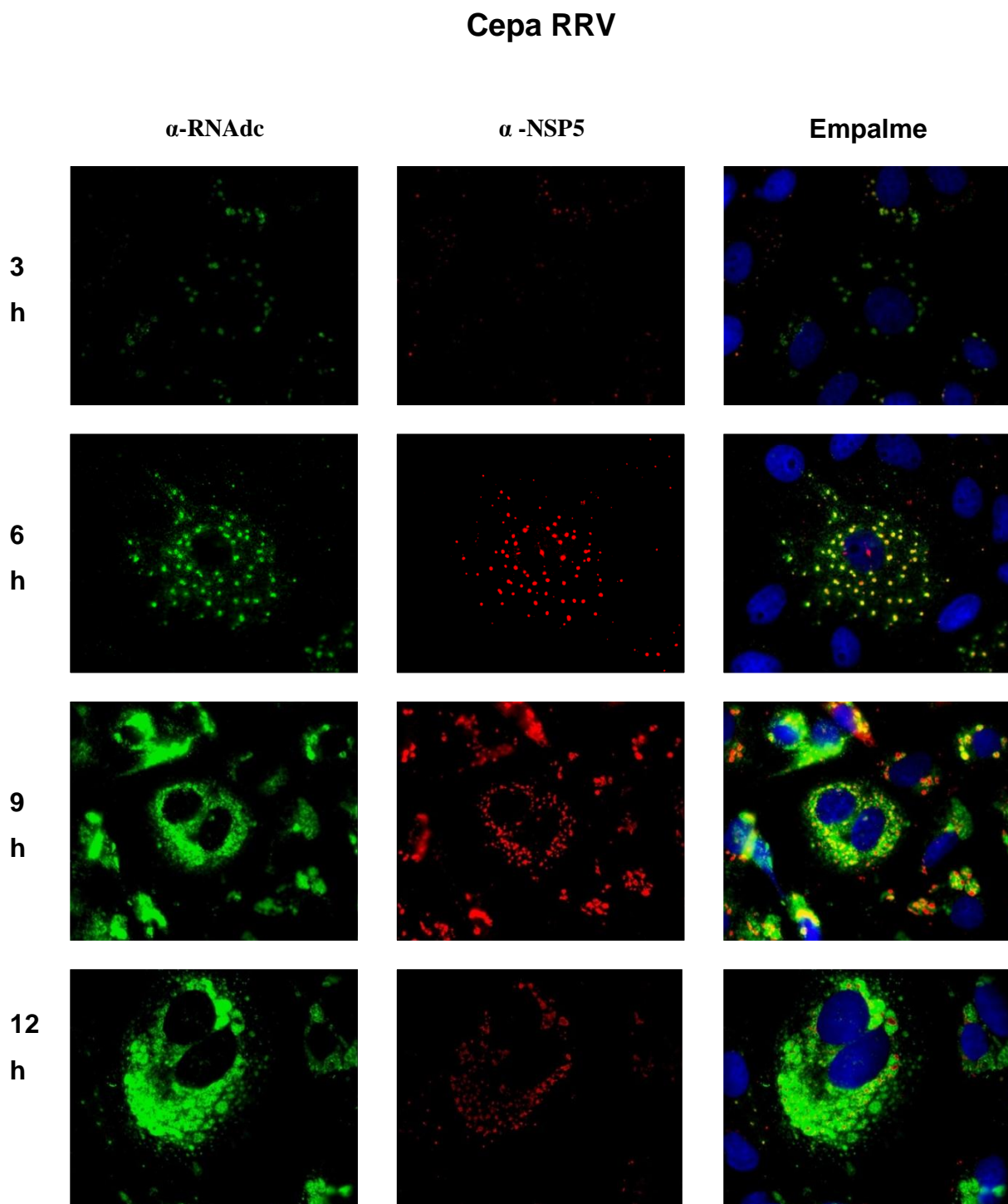


Figura 6.1: Cinética de la exposición del RNAdc en células MA104 infectadas con RRV. Inmunofluorescencias contra RNAdc y NSP5. El RNAdc (señal en verde) fue detectado utilizando el anticuerpo J2, que específicamente reconoce al RNAdc. La distribución de NSP5 (marcador de viroplasmas con señal en rojo) en células infectadas fue analizada utilizando el anticuerpo policlonal anti-NSP5. Los núcleos fueron detectados con DAPI (señal en azul). Amplificación 100X.

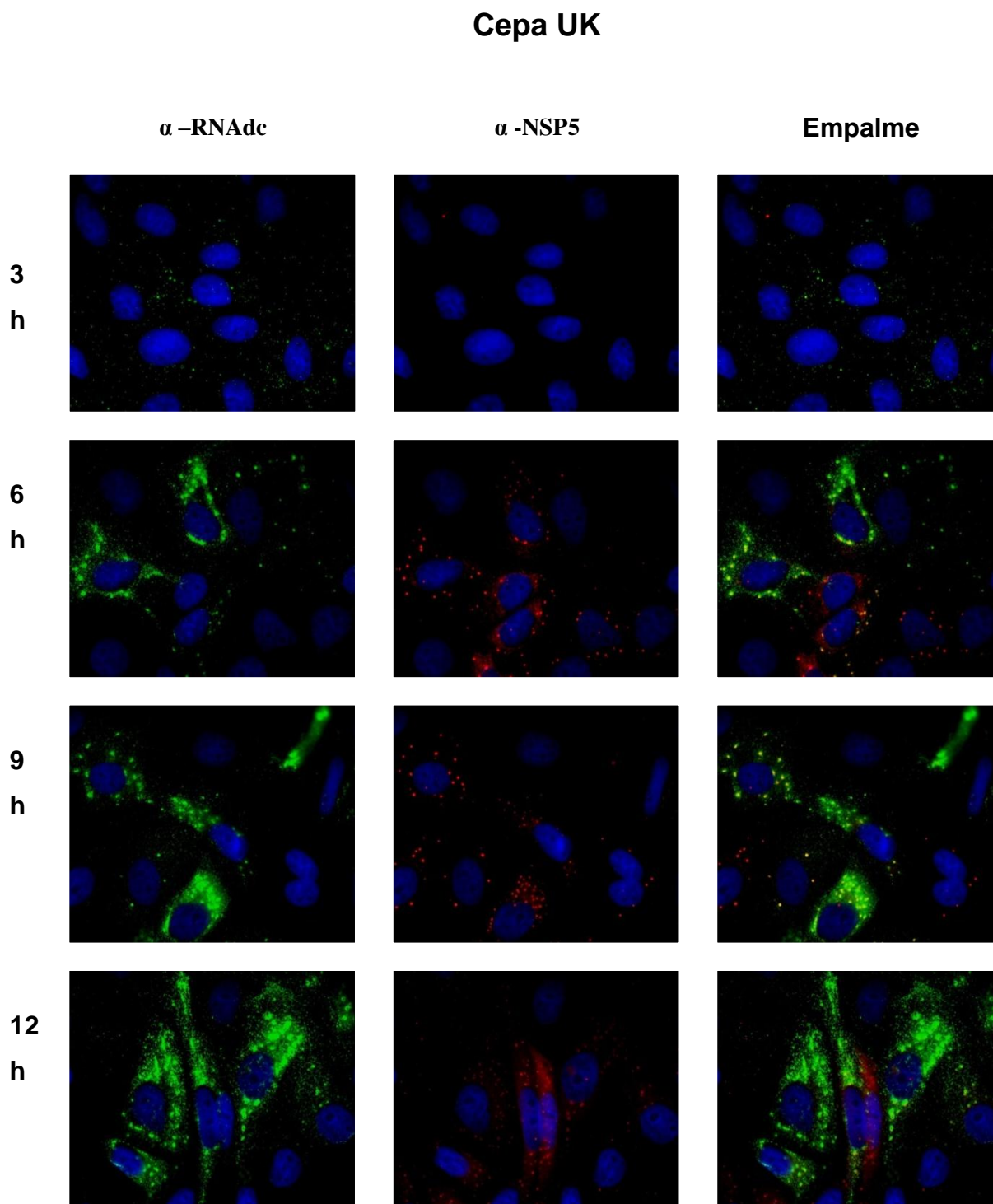


Figura 6.2: Cinética de la exposición del RNAdc en células MA104 infectadas con RV de la cepa UK. Inmunofluorescencias contra RNAdc y NSP5. El RNAdc (señal en verde) fue detectado utilizando el anticuerpo J2, que específicamente reconoce al RNAdc. La distribución de NSP5 (marcador de viroplasmas con señal en rojo) en células infectadas fue analizada utilizando el anticuerpo policlonal anti-NSP5. Los núcleos fueron detectados con DAPI (señal en azul). Amplificación 100X.

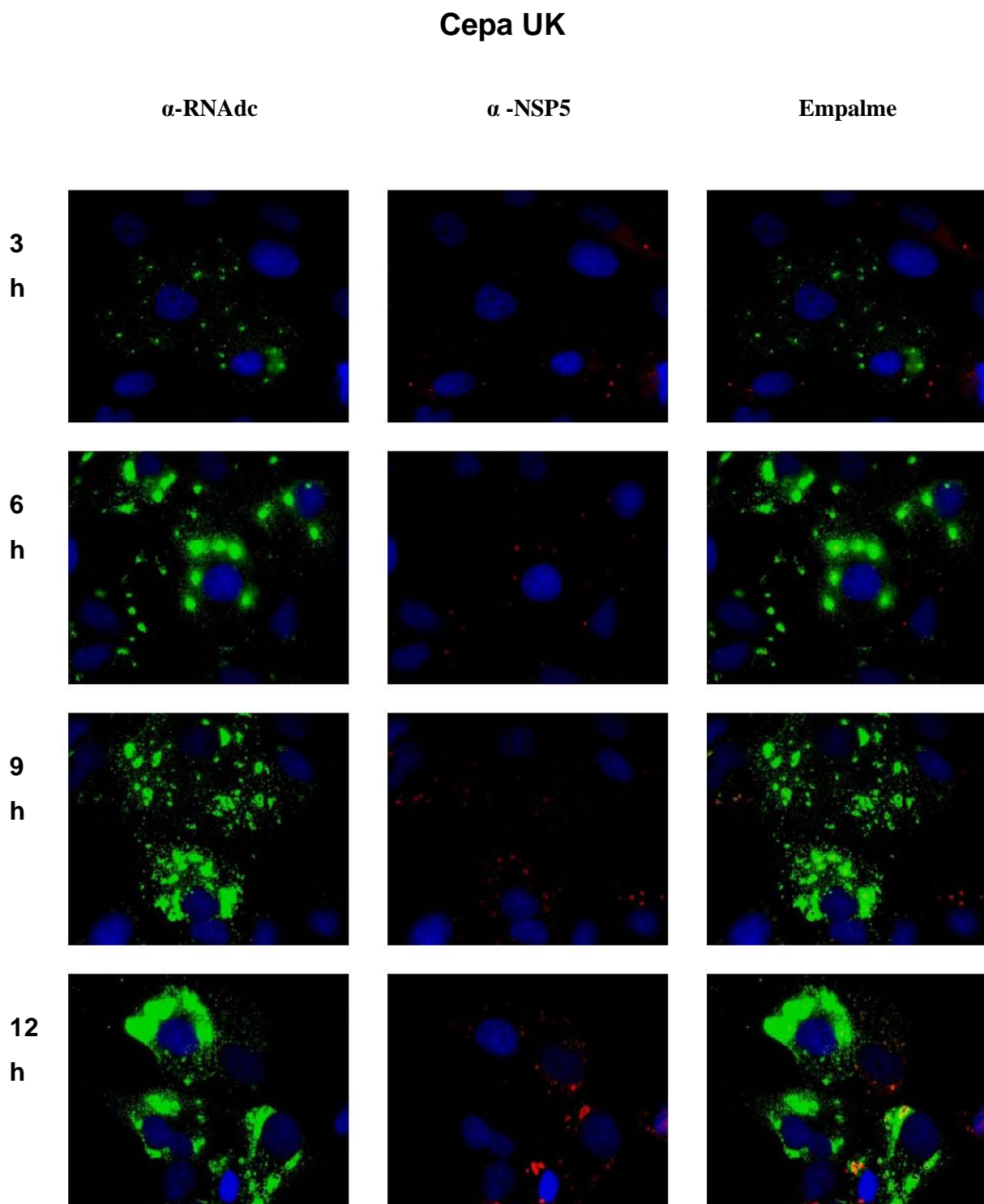


Figura 6.3: Cinética de la exposición del RNAdc en células MA104 infectadas con RV de la cepa YM. Inmunofluorescencias contra RNAdc y NSP5. El RNAdc (señal en verde) fue detectado utilizando el anticuerpo J2, que específicamente reconoce al RNAdc. La distribución de NSP5 (marcador de viroplasmos con señal en rojo) en células infectadas fue analizada utilizando el anticuerpo policlonal anti-NSP5. Los núcleos fueron detectados con DAPI (señal en azul).Amplificación 100X.

6.2 El complejo 2'5-Oligoadenilato sintetasa/RNasa L se encuentra inactivo durante la infección con rotavirus.

Una vez corroborada la presencia del RNAdc en el citoplasma de las células infectadas, evaluamos si este RNAdc era también capaz de activar al complejo OAS/RNasa L.

Para determinar si este complejo se encontraba activo, monocapas de células MA104 se infectaron o no con las diferentes cepas de rotavirus, (a una MOI de 10) y se cosecharon a diferentes tiempos después de la infección. Terminado el tiempo de infección se purificó y aisló el RNA total para ser examinado en el Bioanalizador, que nos permite analizar la integridad de los RNAs. Como control de inducción del complejo, las células se lipofectaron con poly (I:C), que es un potente inductor del complejo OAS/RNasa L^[26,28] a una concentración de 5 µg/mL.

En la Figura 6.4, en el carril correspondiente a las células control (expuestas únicamente con la mezcla transfectante) se observan dos bandas, que corresponden a los RNAs ribosomales 28s y 18s (señalados en la Figura 6.4). En cambio, en el carril de las células tratadas con poly (I:C), se observan además de las 2 bandas de los rRNAs, bandas de menor peso molecular que corresponden a los productos de corte de la RNasa L (señaladas con flechas), las cuales no se observan en ninguna de las condiciones de las células infectadas con rotavirus. Además el RIN* de las muestras infectadas con rotavirus es de 10 o cercano a 10, lo que indica que los rRNAs están íntegros, en cambio para las células tratadas con poly (I:C) el RIN obtenido fue de apenas 6.4, lo que indica que los rRNAs fueron degradados. En conjunto, estos resultados indican que durante la infección con rotavirus el complejo OAS/RNasa L no está activo.

*RIN: RNA Integrity Number, es un parámetro designado por el programa del Bioanalizador para evaluar la calidad e integridad de los RNAs cuya escala es de 1-10, siendo 10 el número asignado a los RNAs de excelente calidad e integridad, en cambio 1 es para los RNAs completamente degradados.

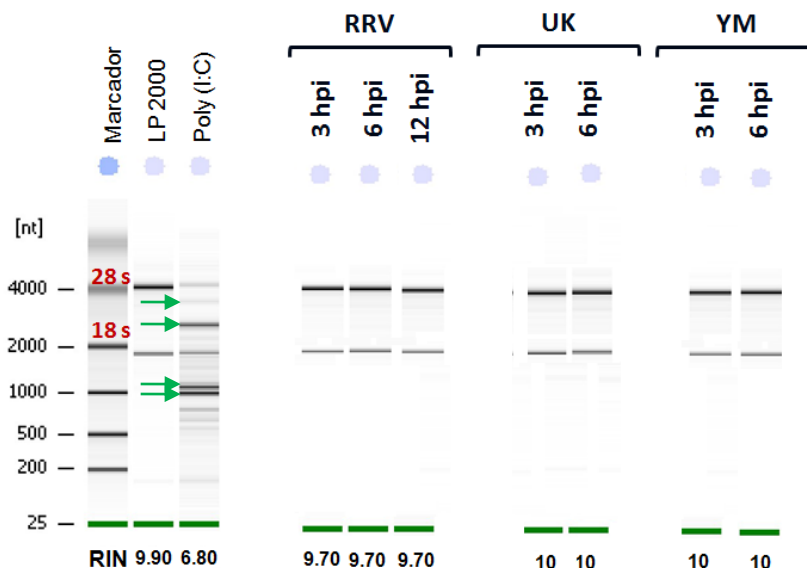


Figura 6.4: Estado de los rRNAs durante la infección con rotavirus. Células MA104 fueron infectadas con las diferentes cepas de rotavirus durante los tiempos indicados. Después de extraer el RNA total de las células, la integridad de los rRNAs fue evaluada en el Bioanalizador para evidenciar la activación del complejo OAS/RNasa L.

6.3 El RNAdc de rotavirus de la cepa RRV es capaz de activar el complejo OAS/RNasa L

Como se encontró que el complejo OAS/RNasa L no está activo durante la infección con RV, procedimos a determinar si el genoma viral era capaz de activar por sí mismo el complejo. Para ello, lipofectamos el RNAdc viral aislado y purificado de células infectadas con RRV. Encontramos que el RNAdc induce la degradación de los rRNAs, lo cual nos indica que el RNA genómico viral de RRV es capaz de activar dicho complejo (ver Figura 6.5).

En conjunto, estos resultados indican que el genoma de los rotavirus *per se* es un potente inductor de la vía antiviral OAS/RNasa L, pero al estar asociado a las proteínas virales no tiene capacidad inductora sobre dicha vía, lo que sugiere que los rotavirus son capaces de modular la activación de dicho complejo.

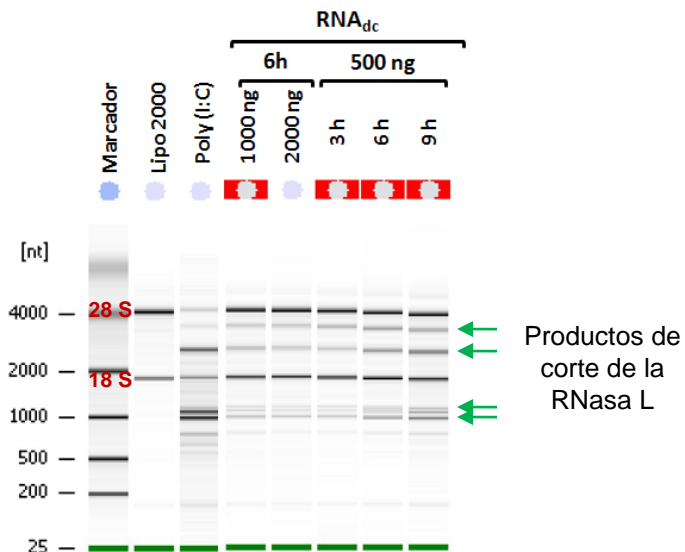


Figura 6.5: Estado de los rRNAs en presencia del RNAdc. Células MA104 fueron lipofectadas con 500, 1000 y 2000 ng de RNAdc viral. A diferentes tiempos después de la lipofección. La integridad de los rRNAs fue evaluada en el Bioanalizador para evidenciar la activación del complejo OAS/RNasa L.

6.4 Los Rotavirus inhiben la activación del complejo 2'5-OAS/RNasa L.

Los resultados obtenidos hasta el momento no permitían definir si el complejo OAS/RNasa L era inhibido o si simplemente no se activaba durante la infección con RRV. Para responder esta pregunta procedimos a infectar monocapas de células MA104 con RRV (a una MOI de 10) y posteriormente introdujimos RNAdc a las células infectadas mediante lipofección.

Como se esperaba, en las células que fueron tratadas con el RNAdc los rRNAs se degradaron, evidenciando que el complejo OAS/RNasa L se activó. En cambio, cuando las células se lipofectaron con RNAdc e infectaron con RRV de manera simultánea, los rRNAs no se degradaron. De modo similar, no hubo degradación de los rRNAs en células en las que se lipofectó el RNAdc 1 ó 3 horas después de la infección (carriles 4 y 5 Figura 6.6 A). Esperábamos que el RNAdc activara al complejo, pero encontramos que en presencia del virus RRV, el complejo ya no se activa, lo que sugiere que RRV es capaz de inhibir dicho complejo en presencia del RNAdc.

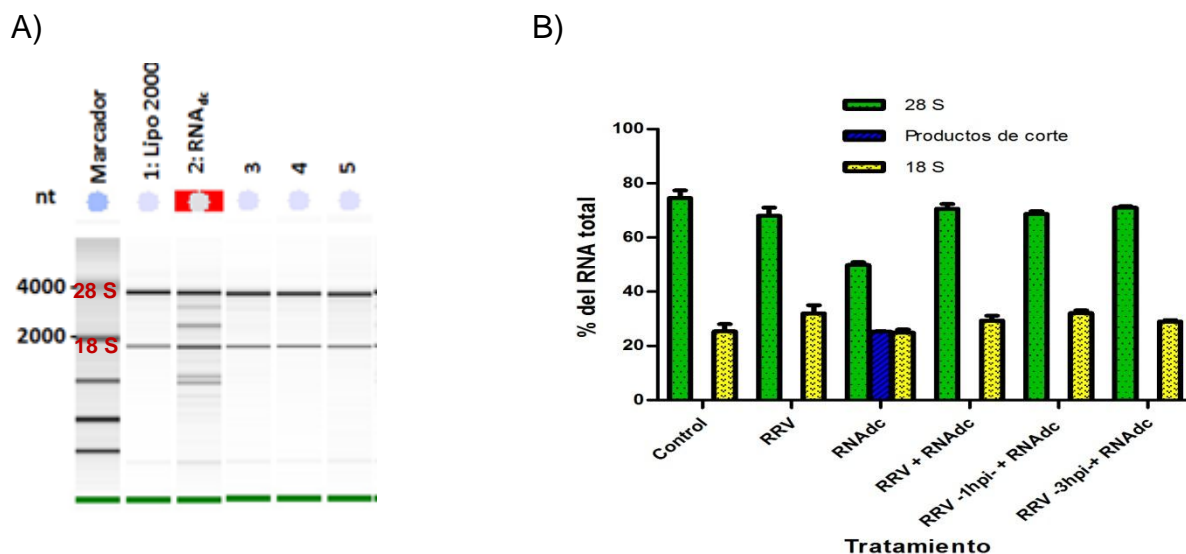


Figura 6.6: Estado de los rRNAs en presencia del RNAdc y RRV. Células MA104 fueron infectadas con RRV y lipofectadas con 500 ng de RNAdc de manera simultánea (A: carril 3) ó 1 ó 3 hpi (A: carriles 4 y 5, respectivamente). La integridad de los rRNAs fue evaluada en el Bioanalizador para evidenciar la activación del complejo OAS/RNasa L. En todos los casos las células fueron cosechadas 6 h después de la infección o lipofección. En A) se muestra el resultado de un ensayo representativo y en B) se muestran los productos de corte de la RNasa L de tres ensayos independientes. Las barras representan la media \pm la desviación estándar.

6.5 Los Rotavirus inhiben la activación de la RNasa L.

Una vez demostrada la capacidad de los rotavirus de inhibir el complejo antiviral, procedimos a determinar el nivel al que se daba este suceso. Para ello, empleamos los inductores endógenos de la RNasa L, los 2'5-oligoadenilatos (2'5-A) y analizamos la activación de la RNasa L en presencia los 2'5-A y RRV.

Evaluamos este fenómeno en condiciones similares a las probadas con el RNAdc y encontramos que la transfección de 1.25 μ M de 2'5-A induce la activación de la RNasa L, pero en presencia de RRV, los oligoadenilatos son incapaces de activar dicha enzima (ver Figura 6.7). Estos resultados sugieren que los rotavirus pueden inhibir el complejo a nivel de la RNasa L, sin embargo, la posibilidad de que rotavirus inhiba también a nivel de la activación de la OAS no se excluye con estos ensayos.

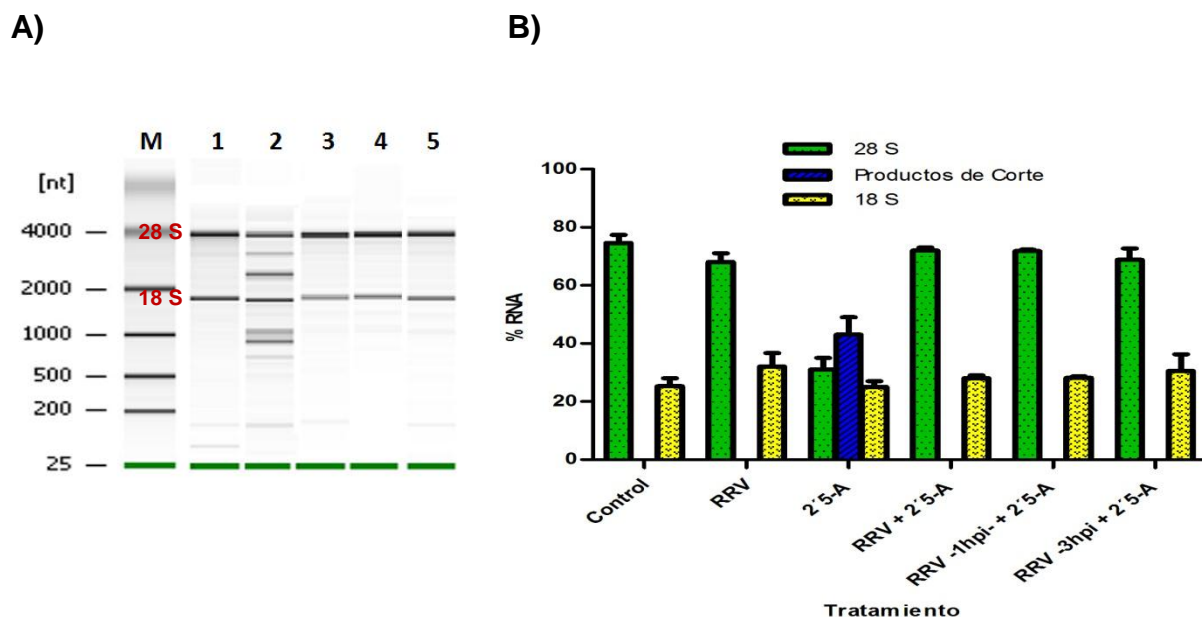


Figura 6.7: Estado de los rRNAs en presencia de 2'5-A y RRV. Células MA104 fueron lipofectadas con 1.25 μ M de 2'5-A (A: carril 2) e infectadas con RRV de manera simultánea (A: carril 3) o infectadas y lipofectadas con 1.25 μ M de 2'5-A 1 ó 3 hpi (A: carriles 4 y 5 respectivamente). La integridad de los rRNAs fue evaluada en el Bioanálisis para evidenciar la activación del complejo OAS/RNasa L. En todos los casos las células fueron cosechadas 6 h después de la infección o lipofección. El carril 1 corresponde a las células tratadas con lipofectamina 2000. En A) se muestra el resultado de un ensayo representativo y en B) se muestran los productos de corte de la RNasa L de tres ensayos independientes. Las barras representan la media \pm la desviación estándar.

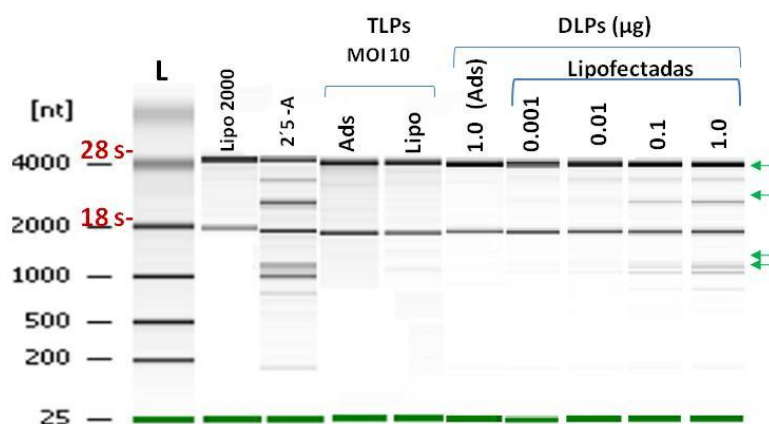
6.6 Las DLPs inducen la activación del complejo OAS/RNasa L

Nuestro siguiente objetivo fue determinar que eventos o componentes virales estaban implicados en modular el complejo OAS/RNasa L, por lo que decidimos estudiar si como consecuencia o durante el proceso de entrada el virus era capaz de modular el complejo, para esto, se adsorbieron o lipofectaron TLPs o DLPs y se evaluó la integridad de los rRNAs.

Al adsorber o lipofectar las TLPs con una MOI de 10, el complejo permanece inactivo, pero sorprendentemente encontramos que la transfección de las DLPs induce la degradación de los rRNAs y que este efecto es dependiente de la cantidad de DLPs, a mayor concentración de proteína viral mayor es el efecto en la degradación de los rRNAs (Figura 6.8 A). Con base a este resultado, se seleccionó 500 ng de proteína para cuantificar los productos de corte de la RNasa L activada por

las DLPs; como se muestra en la Figura 6.8 B, la lipofección de las DLPs induce la activación de la RNasa L, evento que no se observa cuando se lipofectan las TLPs. Estos resultados sugieren que la inhibición del complejo OAS/RNasa L podría estar mediada por alguno de los componentes presentes en la capa más externa de la partícula viral, cuya ausencia, como en el caso de las DLPs, permite que el complejo OAS/RNasa L se active. Estos ensayos también sugieren que es durante el proceso de entrada, el cual se elude al transfectar las DLPs, cuando el virus controla al complejo antiviral en estudio.

A)



B)

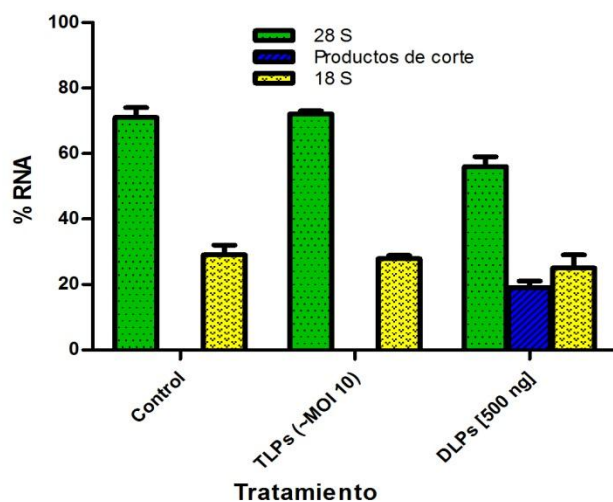


Figura 6.8: Estado de los rRNAs en presencia de TLPs y DLPs. TLPs y DLPs fueron adsorbidas o lipofectadas en monocapas de células MA104. La integridad de los rRNAs fue evaluada en el Bioanalizador para evidenciar la activación del complejo OAS/RNasa L. En A) se muestra el resultado de un ensayo representativo y en B) se muestran los productos de corte de la RNasa L de tres ensayos independientes. Las barras representan la media \pm la desviación estándar.

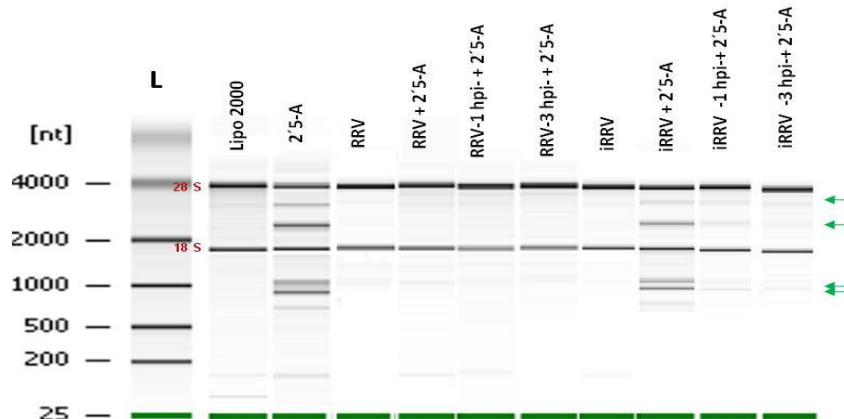
6.7 El componente viral que modula la activación del complejo OAS/RNasa L forma parte de la partícula viral, pero es requerida su síntesis para un control más eficiente.

Para determinar si el o los componentes virales que inhiben la activación del complejo OAS/RNasa L forma parte de la partícula viral o es necesaria su síntesis en la célula infectada, se empleó virus RRV inactivado (iRRV) con psoralen y luz UV. Este tratamiento genera entrecruzamiento del RNA viral y como consecuencia el virus es incapaz de iniciar la transcripción viral, pero conserva la capacidad de unirse a su receptor celular y entrar en la célula hospedera. Para asegurarnos de la efectividad de la inactivación, se verificó que en células infectadas con el iRRV no se sintetizaran las proteínas virales por marca metabólica (mediante la incorporación de ³⁵S) y mediante un ensayo de hemaglutinación se determinó que el tratamiento de inactivación no altera las proteínas involucradas en el proceso de entrada y unión a la célula (datos no mostrados).

Encontramos que en las células infectadas con el virus inactivado, los rRNAs no se degradaron; sin embargo, en presencia de los 2'5-A el virus inactivado iRRV no fue capaz de impedir la degradación de los rRNAs tan eficientemente como en el caso de RRV (ver Figura 6.9 y 6.7).

En conjunto, estos resultados sugieren que la modulación del complejo OAS/RNasa L podría ocurrir en al menos dos etapas; la primera en tiempos tempranos de la infección, donde al parecer la proteína proveniente de la partícula viral entrante es suficiente para inhibir al complejo y la segunda, en tiempos tardíos de la infección en donde aparentemente se requiere de la síntesis de *novo* de alguna proteína viral para mantener inactivo al complejo de forma eficiente, ya que las partículas inactivadas no son capaces de controlar la actividad de RNasa L a tiempos más largos después de la infección, a diferencia de las partículas virales infecciosas.

A)



B)

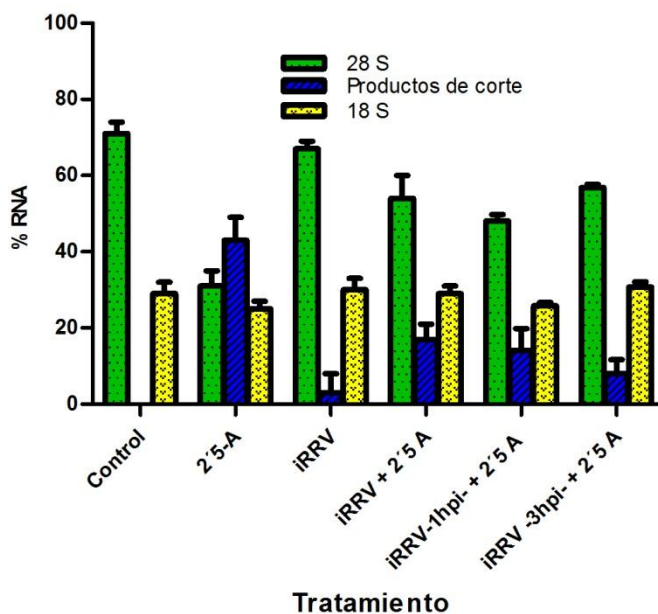


Figura 6.9: Estado de los rRNAs en presencia de 2'5-A y RRVi. La integridad de los rRNAs fue evaluada en el Bioanalizador para evidenciar la activación del complejo OAS/RNasa L. En A) se muestra el resultado de un ensayo representativo y en B) se muestran los productos de corte de la RNasa L de tres ensayos independientes. Las barras representan la media \pm la desviación estándar.

6.8 El silenciamiento de las proteínas RNasa L y OAS1 no tienen efecto sobre el rendimiento viral.

Una vez demostrado que el complejo OAS/RNasa L es inhibido durante la infección con rotavirus y dado el potencial antiviral de este complejo, evaluamos el efecto de silenciar, de manera individual, la expresión de la RNasa L y la OAS1 en la producción de virus infeccioso mediante ensayos de RNA de interferencia, utilizando siRNAs dirigidos contra estas dos proteínas. Para esto, las células fueron lipofectadas con un siRNA contra la RNasa L o OAS1, y posteriormente se infectaron con RRV a una MOI de 10. Doce horas después de la infección, las células se lisaron y se cuantificó la cantidad de partículas virales infecciosas producidas en los lisados por un ensayo de unidades formadoras de foco (UFF/mL). Los resultados se muestran en la Figura 6.10. La eficiencia del silenciamiento de cada una de las proteínas fue verificada mediante ensayos de western blot (Figura 6.10).

Encontramos que la ausencia o disminución de las proteínas RNasa L y OAS1 en las células no modificó la producción de partículas virales infecciosas, comparado con células control en las que se lipofectó un siRNA irrelevante, lo que sugiere que dicho complejo podría ser modulado en etapas tempranas de la infección.

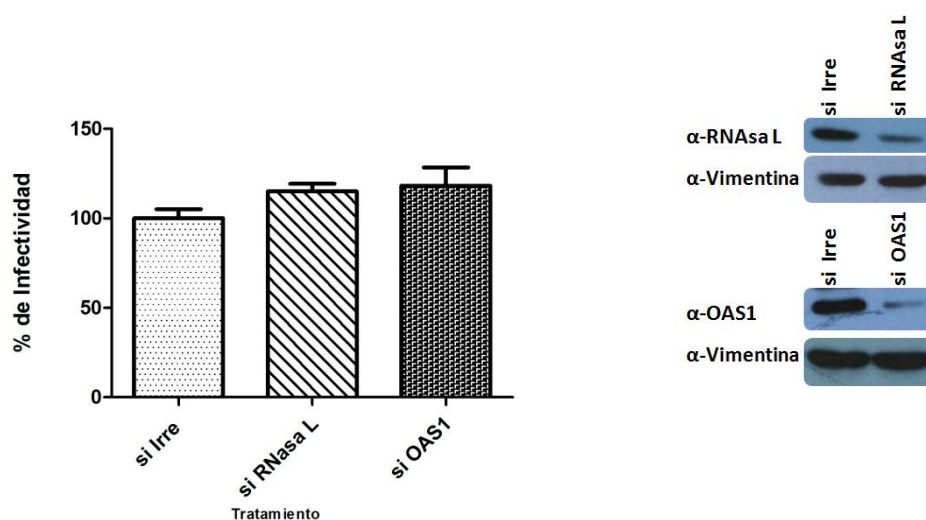


Figura 6.10: Efecto del silenciamiento de RNasa L y OAS1 en la producción de progenie viral. Los resultados están expresados como el porcentaje de UFFs observadas en el control (células lipofectadas con el interferente irrelevante), que representa el 100%. El silenciamiento de las proteínas celulares se verificó por un ensayo de Western blot y se aprecia que se logró disminuir en por lo

menos un 70% la síntesis de las proteínas de interés. El anticuerpo α -vimentina se usó como control de carga.

6.9 Durante la infección con rotavirus la localización y cantidad subcelular de RNasa L y OAS1 no se modifican.

Una vez demostrado que los rotavirus modulan el complejo OAS/RNasa L, decidimos estudiar los mecanismos moleculares que podrían estar involucrados; una estrategia común de diversos virus es inducir la degradación o la relocalización de proteínas celulares que puedan interferir con su ciclo replicativo,^[29] fenómeno que podría explicar la falta de actividad del complejo OAS/RNasa L. Para evaluar si RV cambia la localización de la RNasa L y/o la OAS1, monocapas de células MA104 fueron infectadas o no con RRV durante 6 h y procesadas para inmunofluorescencia o bien para Western blot utilizando anticuerpos monoclonales específicos contra estas dos proteínas celulares.

Como se muestra en las Figuras 6.9 y 6.10, la localización celular y la cantidad de ambas proteínas no se alteran durante la infección con rotavirus.

Estos resultados sugieren que el mecanismo molecular de RRV para modular el complejo OAS/RNasa L no involucra cambio en la cantidad, ni en la distribución subcelular de las proteínas OAS1 y la RNasa L.

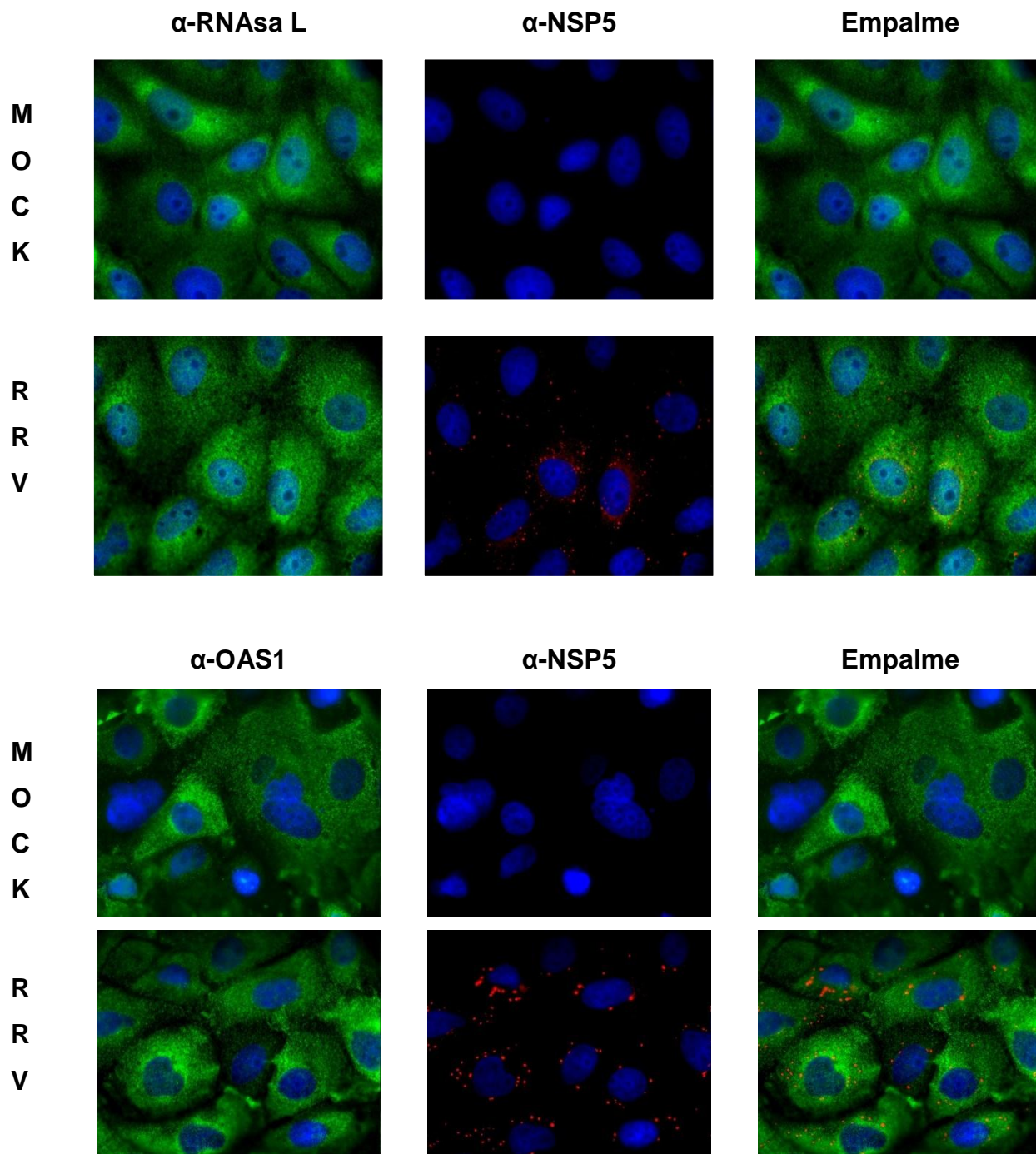


Figura 6.11: Localización de la RNasa L y OAS1. Células MA104 fueron infectadas o no con rotavirus de la cepa RRV y analizadas por inmunofluorescencia. Se emplearon anticuerpos monoclonales para detectar a la RNasa L y a la OAS1 (señales en verde). La distribución de NSP5 (marcador de viroplasmata con señal en rojo) en células infectadas fue analizada utilizando el anticuerpo policlonal anti-NSP5. Los núcleos fueron detectados con DAPI (azul). Amplificación 100X.



Figura 6.12: Cuantificación de la RNasa L y OAS1. Células MA104 fueron infectadas o no con rotavirus de la cepa RRV y procesadas para western blot. Se emplearon anticuerpos monoclonales para detectar a la RNasa L y a la OAS1, como control de carga se empleó el anticuerpo α -vimentina.

VII DISCUSIÓN

El RNA de doble cadena es uno de los inductores más potentes de la respuesta de los interferones tipo I (IFNs), mecanismo que podría por sí mismo, contrarrestar casi cualquier infección viral. Por ello la gran mayoría de los virus han desarrollado diferentes estrategias para inhibir dicha respuesta.^[29,31] En el caso específico de los virus con genoma de RNAdc, una de las estrategias más utilizadas es impedir que la célula hospedera detecte la presencia de su material genético, tal como se ha descrito en los virus de influenza, cuya proteína NS1, se une al RNAdc e impide que los sensores celulares lo detecten^[15].

De acuerdo al paradigma actual, la síntesis del RNA genómico de rotavirus se lleva a cabo al mismo tiempo que éste es empaquetado dentro de las partículas virales, lo cual ocurre en los viroplasmos.^[17] Dicho modelo explica como el virus mantiene “oculto” su genoma con el fin de evitar que la respuesta mediada por los IFNs se active. En este trabajo encontramos que este paradigma no es del todo cierto, ya que en el citoplasma de las células infectadas con los rotavirus hay RNAdc, incluso en aquellas infectadas con la cepa UK. Cabe señalar que decidimos emplear la cepa bovina UK debido a su incapacidad para controlar la respuesta de los IFNs y poder comparar los resultados con la cepa RRV, de la que es bien conocida su capacidad para modular la respuesta a los IFNs.^[29] No obstante, para ambas cepas encontramos RNAdc, aunque fue claro también que la proporción de RNAdc en el citoplasma las células infectadas con la cepa UK fue menor con respecto a las que fueron infectadas con la cepa RRV, fenómeno que podría correlacionarse con el proceso de entrada, del que se ha descrito es más lento para la cepa UK con respecto a RRV.^[7] Seguramente hay varios mecanismos involucrados que impiden que este RNAdc expuesto en el citoplasma induzca la respuesta de los IFNs.

Por otra parte, recientemente encontramos en nuestro laboratorio que una de las principales proteínas inducibles por los IFNs, la PKR se activa durante la infección con rotavirus, ésta se autofosforila y posteriormente fosforila al factor eIF2 α , inhibiendo así la síntesis de proteínas y se ha propuesto que el RNAdc detectado en el citoplasma de las células infectadas podría ser el responsable de activar a la

PKR.^[6] Con base en estos resultados, parecía probable que el complejo OAS/RNasa L se encontrara activo durante la infección con rotavirus ya que el RNAdc es un potente inductor de dicho complejo.^[28] Contrario a lo que esperábamos, durante la infección con rotavirus (empleando diferentes cepas virales, multiplicidades de infección y distintos tiempos de infección), nunca se detectó el complejo OAS/RNasa L activo. Pese a que dicho complejo se activa en presencia del RNAdc, poly (I:C) y los 2'5-oligoadenilatos en la línea celular MA104, esta actividad se pierde durante la infección con rotavirus, lo que sugiere que el virus es capaz de modular dicho complejo.

Como encontramos que en células infectadas con rotavirus el complejo antiviral es inactivo en presencia de los 2'5-oligoadenilatos, concluimos que este virus es capaz de inhibir a nivel de la actividad de la RNasa L, aunque hasta la fecha desconocemos el mecanismo involucrado. Se han reportado virus cuyas proteínas interactúan de manera directa con la RNasa L impidiendo que los oligoadenilatos induzcan la formación del dímero activo o virus como el Virus de la Inmunodeficiencia Humana, que es capaz de actuar sobre el dímero activo a través del inhibidor endógeno de la RNasa L.^[26-28,38] Nuestros datos también sugieren que el virus podría controlar esta respuesta en dos etapas; la primera a tiempos tempranos de la infección, en donde la proteína inhibitoria que forma parte de la partícula viral, es suficiente para inhibir la activación del complejo. Muy probablemente estos componentes son parte de la capa externa de la partícula viral (VP4 o VP7). En la segunda etapa, pensamos que se requiere de la síntesis de estas u otras proteínas virales, para que rotavirus pueda mantener de manera eficiente la inactivación del complejo OAS/RNasa L.

En este trabajo también iniciamos la caracterización de los posibles mecanismos de cómo el virus podría controlar dicho complejo. Hasta la fecha hemos descartado que la degradación o redistribución subcelular de las proteínas RNasa L y OAS1 jueguen algún papel en este control. Se han descrito diversos mecanismos que emplean los virus para modular este complejo que van desde la mera interacción de proteínas virales con la RNasa L o OAS como en el caso del virus Dengue^[47] y el virus vaccinia^[48] hasta la participación de RNAs subgenómicos como se ha descrito para el virus West Nile^[42,44].

Nuestro interés por estudiar el complejo OAS/RNasa L reside en tratar de explicar cómo se mantiene en estado inactivo durante la infección por RV, mientras que otros componentes de respuesta celular como la PKR se activan durante la infección, sin efecto aparente sobre la replicación viral.

Nos resultó sumamente interesante encontrar inactivo este complejo, considerando el importante papel antiviral que tiene en la célula. Hasta la fecha se han descrito diversas funciones antivirales de la RNasa L, la cual además de su actividad catalítica *per se* es capaz de inducir y/o potenciar la apoptosis,^[37,46] amplificar la respuesta antiviral, incrementando la producción de IFNs. Se ha descrito que los productos de corte de la RNasa L son capaces de activar a los sensores MDA-5 y RIG-1 para la producción de IFNs.^[36,49]

La capacidad de la RNasa L de amplificar la respuesta antiviral por diferentes vías, nos sugiere que la versatilidad de dicha enzima podría ser un factor determinante durante la infección con rotavirus, por lo que creemos que estos virus han desarrollado estrategias que impidan la activación de dicho complejo, tal como se ha reportado para varios virus.

Queda aún por resolver cual es el mecanismo por el cual los rotavirus previenen la activación de la RNasa L y si además son capaces de inhibir o modular la actividad de la OAS, en nuestro laboratorio estamos realizando experimentos para entender estos mecanismos. (Ver perspectivas)

VIII CONCLUSIONES

- En el citoplasma de las células infectadas con los rotavirus de las cepas RRV, YM y UK hay RNAdc desde las 3 hpi con una colocación no exclusiva con los viroplasma.
- Durante la infección por rotavirus el complejo antiviral 2'5-OAS/RNasa L no está activo.
- El RNA genómico de los rotavirus activa al complejo 2'5-OAS/RNasa L.
- La infección con rotavirus inhibe la activación del complejo 2'5-OAS/RNasa L inducida por el RNAdc así como la activación de la RNasa L inducida por los 2'5-oligoadenilatos.
- Los rotavirus modulan la vía antiviral 2'5-OAS/RNasa L.
- Las proteínas de la capa más externa de la partícula viral de los rotavirus están involucradas en la modulación de la vía 2'5-OAS/RNasa L.
- En el control de la vía 2'5-OAS/RNasa L por los rotavirus están involucradas proteínas virales que conforman la partícula viral, pero su síntesis en la célula infectada es requerida para mantener una modulación del complejo más eficiente.
- Las proteínas celulares RNasa L y OAS1 no cambian ni su distribución subcelular ni su cantidad durante la infección por rotavirus.

IX PERSPECTIVAS

* Determinar el o los componentes virales implicados en la modulación del complejo OAS/RNasa L. Hasta el momento nuestros resultados sugieren como candidatos a las proteínas estructurales componentes de la capa externa VP4 y VP7 como los posibles moduladores del complejo OAS/RNasa L. Para discernir cual de las dos proteínas de la capa externa está involucrada en esta modulación planeamos:

a) Sobreexpresar de manera individual a las proteínas VP4 y VP7 en células MA104 y determinar su efecto en el complejo OAS/RNasa L.

b) Evaluar el efecto de la ausencia de VP4 en la modulación del complejo OAS/RNasa L.

* Para estudiar si existe una interacción directa entre las proteínas VP4 y VP7 y la RNasa L en la modulación del complejo antiviral, planeamos realizar inmunoprecipitaciones (IP) con anticuerpos anti RNasa L. Si esta proteína interactúa con VP4 y VP7, esperamos que los inmunoprecipitados arrastren a estas proteínas virales.

* Determinar si el inhibidor de la RNasa L (IRL) está involucrado en la modulación del complejo antiviral durante la infección con rotavirus. Se ha descrito que el RNAdc es un potente inductor del IRL, el cual es capaz de bloquear la acción de la RNasa L en presencia de los 2´5-Oligoadenilatos.^[38]

REFERENCIAS

1. Monografías de la Organización Mundial de la Salud. Disponibles en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html>. Consultado en mayo de 2011.
2. Monografías de la Organización Panamericana de la Salud. Disponible en http://www.paho.org/Spanish/AD/FCH/IM/Rotavirus_Surveillance.htm. Consultado en mayo de 2011.
3. Bernard N. Fields, David Mahan Knipe, Peter M. Howley. **Field's Virology**. 5 th Edition. Vol II. Lippincott Williams & Wilkins, USA (2007) 1917-1943.
4. Shane D. Trask, Sarah M. McDonald & John T. Patton. **Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication**. *Nature Reviews Microbiology* **10**, 165-177 (2012).
5. Pesavento J, Crawford S, Estes M, Prasad B. **Rotavirus proteins: structure and assembly**. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* **309**, 189-219 (2006).
6. Rojas M. **Caracterización de los mecanismos que utiliza rotavirus para mantener la fosforilación del factor eIF2 α** . Tesis de Doctorado. (2010) Posgrado en Ciencias Bioquímicas. UNAM.
7. Gutiérrez M, Isa P, Sánchez-San Martín C, Pérez-Vargas J, Espinosa R, Arias CF, López S. **Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis**. *J. Virol.* **84(18)**, 9161-9 (2010).
8. López S, Arias C.F. **Early steps in rotavirus cell entry**. *Curr Top Microbiol Immunol.* 309,39-66 (2006).
9. Carreño-Torres JJ, Gutiérrez M, Arias CF, López S, Isa P. **Characterization of viroplasm formation during the early stages of rotavirus infection**. *Virol J.* **7**,350 (2010).
10. McDonald S. y Patton J. **Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome**. *Trends Microbiol* **19(3)**, 136-44 (2011).
11. Patton JT. **Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins**. *Journal of General Virology* **76**, 2633-2644, (1995).
12. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai, S. **Inmunología celular y molecular**. Edit Elsevier 6ª Edición. España 2008 pp:3-17.
13. Sadler AJ, Williams BR. **Interferon-inducible antiviral effectors**. *Nat Rev Immunol.* **8(7)**, 559-68 (2008).
14. Chelbi-Alix MK, Wietzerbin **Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research**. *J. Biochimie.* **89(6-7)**,713-8 (2007).
15. Katze MG, He Y, Gale M Jr. **Viruses and interferon: a fight for supremacy** *Nat Rev Immunol* **9**, 675-87 (2002).
16. Bowie A, Unterholzner L. **Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling**. *Nat Rev Immunol* **12**, 911-22 (2008).
17. Gantier M, Williams B. **The response of mammalian cells to double-stranded RNA**. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* **18**, 363-71 (2007).
18. Takeuchi O, Akira S. **Innate immunity to virus infection. Review**. *Immunol Rev* **227 (1)**, 75-86 (2009).
19. Platanias C. **Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling**. *Nat Rev Immunol* **5**, 375-86 (2005).
20. Shuai K, Liu B. **Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system**. *Nat Rev Immunol.* **3(11)**, 900-11 (2003).
21. Bowie A, Unterholzner L. **Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. Review**. *Nat Rev Immunol* **12**, 911-22 (2008).
22. Søren Jensen and Allan Randrup Thomsen. **Sensing of RNA Viruses: a Review of Innate Immune Receptors Involved in Recognizing RNA Virus Invasion**. *J. Virol.* **86(6)**, 2900-2910 (2012).
23. Shizuo Akira, Satoshi Uematsu, Osamu Takeuchi. **Pathogen Recognition and Innate Immunity**. *Cell* **124(4)**, 783-801 (2006).
24. Randall R, Goodbourn S. **Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures**. *Journal of General Virology* (2008), 89, 1–47.
25. Silverman RH. **Fascination with 2-5A-dependent RNase: a unique enzyme that functions in interferon action**. *J Interferon Res.* **14(3)**, 101-4 (1994).
26. Silverman RH. **A Scientific Journey Through the 2-5A/RNase L System**. *Cytokine Growth Factor Rev.* **18(5-6)**, 381-388 (2007).

27. Bisbal C, Silverman RH. **Diverse functions of RNase L and implications in pathology.** *Biochimie.* **89(6-7)**, 789-98 (2007).
28. Silverman RH. **Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. Minireview.** *J. Virol.* **81(23)**, 12720-12729 (2007).
29. Sherry B. **Rotavirus and reovirus modulation of the interferon response.** *J Interferon Cytokine Res.* **29(9)**, 559-67 (2009).
30. Mario Barro and John T. Patton. **Rotavirus NSP1 Inhibits Expression of Type I Interferon by Antagonizing the Function of Interferon Regulatory Factors IRF3, IRF5, and IRF7.** *J Virol.* **81(9)**, 4473-4481 (2007).
31. Arnold MM, Patton JT. **Diversity of interferon antagonist activities mediated by NSP1 proteins of different rotavirus strains.** *J Virol.* **85(5)**, 1970-9 (2011).
32. Sen A, Pruijssers AJ, Dermody TS, García-Sastre A, Greenberg HB. **The early interferon response to rotavirus is regulated by PKR and depends on MAVS/IPS-1, RIG-I, MDA-5, and IRF3.** *J. Virol.* **85(8)**, 3717-32 (2011).
33. Pando V, Isa P, Arias CF, López S. **Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection.** *Virology.* **295(1)**, 190-200 (2002).
34. Groene WS, Shaw RD. **Psoralen preparation of antigenically intact noninfectious rotavirus particles.** *J Virol Methods.* **38(1)**, 93-102 (1992).
35. Lukacs, N. **Detection of virus infection in plants and differentiation between coexisting viruses by monoclonal antibodies to double-stranded RNA.** *J. Virol. Methods* **47**, 255-272 (1994).
36. Malathi K, Dong B, Gale M Jr, Silverman RH. **Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity.** *Nature* **448(7155)**, 816-9 (2007).
37. Domingo-Gil E, Esteban M. **Role of mitochondria in apoptosis induced by the 2-5A system and mechanisms involved.** *Apoptosis* **11(5)**, 725-38 (2006).
38. Camille Martinand, Céline Montavon,† Tamim Salehzada, Michelle Silhol, Bernard Lebleu, and Catherine Bisbal. **RNase L Inhibitor Is Induced during Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Down Regulates the 2-5A/RNase L Pathway in Human T Cells.** *J Virol.* **73(1)**, 290-296 (1999).
39. Quin Lan, Ren Lili, Zhou Zhoun, Hung Tao. **Rotavirus nonstructural protein 1 antagonizes innate immune response by interacting with retinoic acid inducible gene I.** *Virology Journal* **8**, 522 (2011).
40. Guglielmi K.M., McDonald S.M., Patton J.T. **Mechanism of intraparticle synthesis of the rotavirus double-stranded RNA genome.** *J Biol Chem* **285(24)**, 18123-8 (2010).
41. Broquet AH, Hirata Y, McAllister CS, Kagnoff MF. **RIG-I/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus-infected intestinal epithelium.** *J Immunol.* **186(3)**, 1618-26 (2011).
42. Schuessler A, Funk A, Lazear HM, Cooper DA, Torres S, Daffis S, Jha BK, Kumagai Y, Takeuchi O, Hertzog P, Silverman R, Akira S, Barton DJ, Diamond MS, Khromykh AA. **West Nile virus non-coding subgenomic RNA contributes to viral evasion of type I interferon-mediated antiviral response.** *J. Virol.* (2012).
43. Gupta A, Rath PC. **Expression, purification and characterization of the interferon-inducible, antiviral and tumour-suppressor protein, human RNase L.** *J Biosci.* **37(1)**, 103-13 (2012).
44. Keel AY, Jha BK, Kieft JS **Structural architecture of an RNA that competitively inhibits RNase L.** *RNA* **18(1)**, 88-99 (2012)
45. Jha BK, Polyakova I, Kessler P, Dong B, Dickerman B, Sen GC, Silverman RH. **Inhibition of RNase L and RNA-dependent protein kinase (PKR) by sunitinib impairs antiviral innate immunity.** *J Biol Chem.* **29**, 286-30 (2011).
46. Chakrabarti A, Jha BK, Silverman RH. **New insights into the role of RNase L in innate immunity.** *J Interferon Cytokine Res.* **31(1)**, 49-57 (2011).
47. Elbahesh H, Jha BK, Silverman RH, Scherbik SV, Brinton MA. **The Flvr-encoded murine oligoadenylate synthetase 1b (Oas1b) suppresses 2-5A synthesis in intact cells.** *Virology* **409(2)**, 262-70 (2011).
48. Rice AD, Turner PC, Embury JE, Moldawer LL, Baker HV, Moyer RW. **Roles of vaccinia virus genes E3L and K3L and host genes PKR and RNase L during intratracheal infection of C57BL/6 mice.** *J. Virol.* **85(1)**, 550-67 (2011).

-
49. Kristiansen H, Scherer CA, McVean M, Iadonato SP, Vends S, Thavachelvam K, Steffensen TB, Horan KA, Kuri T, Weber F, Paludan SR, Hartmann R. **Extracellular 2'-5' oligoadenylate synthetase stimulates RNase L-independent antiviral activity: a novel mechanism of virus-induced innate immunity.** J Virol. **84(22)**:11898-904 (2010).
 50. Ye Y, Hauns K, Langland JO, Jacobs BL, Hogue BG. **Mouse hepatitis coronavirus A59 nucleocapsid protein is a type I interferon antagonist.** J Virol. **81(6)**, 2554-63 (2007).