



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA METILACIÓN (N6-METILADENOSINA) DEL  
RNA EN EL CICLO REPLICATIVO DE ROTAVIRUS”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

**ANAID ALETHIA CÁNDIDO LÓPEZ**



Ciudad Universitaria, CDMX.

Mayo, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**      **Profesor: Sobeida Sánchez Nieto**

**VOCAL:**              **Profesor: Rocío Tirado Mendoza**

**SECRETARIO:**      **Profesor: Susana López Charretón**

**1er. SUPLENTE:**    **Profesor: Sara Margarita Garza Aguilar**

**2° SUPLENTE:**      **Profesor: Alberto Ortega Vázquez**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 5, DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL DESARROLLO Y  
FISIOLOGÍA MOLECULAR, EDIFICIO SUR, INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA,  
UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**DRA. SUSANA LÓPEZ CHARRETÓN**

**SUSTENTANTE:**

---

**ANAID ALETHIA CÁNDIDO LÓPEZ**

## Agradecimientos

---

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la tutoría de la Dra. Susana López Charretón y se contó con el apoyo del donativo IG200317 de la DGAPA/UNAM y 153639 del CONACyT. A Cándido recibió apoyo de la Red Mexicana de Virología para asistir al X Congreso Nacional de Virología en Octubre del 2017.

---

## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Susana López Charretón**, por aceptarme en su laboratorio, por brindarme su ayuda más allá de lo académico, por ser una excelente tutora y una brillante investigadora. ¡Por más mujeres en la ciencia!

A todo el grupo Arias-López del IBt: A **Rafita**, por enseñarme de su experiencia; a **Lili** por ser mi maestra y aguantar todas mis preguntas. A **Naye** y **Óscar** por hacerme sentir bienvenida desde antes de llegar; a **Marco O.** por ser más que un excelente amigo y por nuestras pláticas de mesa; a **Lety, Ari** y **Carlos B.**, por cada jueves de algo tranquilo y a Poncho, por ser tan paciente conmigo. Al **Dr. Carlos Sandoval** por resolver cada duda y al **Dr. Carlos Arias** por sus comentarios y compartir su conocimiento en cada seminario.

A mi mejor amigo, **Eduardo Luján**: coincidimos en el camino y sé que sin ti, nada hubiera sido lo mismo. Gracias infinitas por nunca soltarme y compartir esos buenos, malos, pésimos y excelentes momentos.

A mis mejores amigos de la carrera: **Nicole, Williams y Hernán**; con ustedes juntos hasta siempre, esto fue sólo el principio. ¡Por fin lo logramos, Squad!

A **Paco A.** y la **Dra. Paola Moreno** del 101-ote, mi primer laboratorio, juntos aprendimos el significado de estar en la ciencia. A **Cynthia G.**, por demostrarme el valor que una sola persona puede tener en mi vida. Al **Dr. Francisco Torres**, por permitirme estar en su grupo, enseñarme a trabajar, apoyarme y darme la libertad para decidir.

A **Ale Badillo**, mi mejor amiga, que desde donde estemos nos mandamos siempre los mejores ánimos.

## Agradecimientos

---

Al **Dr. Jorge González**, no hubiera estudiado QFB de no ser por ti. Te admiro hoy y siempre.

A **Jorge Ramírez**, porque sin buscarnos nos encontramos y de repente, fijaste una sonrisa en mi rostro.

A la **UNAM**, por formarme académica y personalmente. Mi Universidad es el parteaguas de una trayectoria exitosa; siempre estaré orgullosa de ser egresada de La Universidad de la Nación.

Dedicado a quienes logran inspirarme cada día,  
Siendo inagotable mi amor hacia ustedes.

Para **Grecia**, mi hermana.

Para **Araceli**, mi mamá

Para **Pedro**, mi papá.

---

## SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario (complementary DNA)
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico (Ribonucleic acid)
<b>dsRNA</b>	Ácido ribonucleico de doble cadena (double-stranded Ribonucleic Acid)
<b>tRNA</b>	Ácido ribonucleico de transferencia (transfer Ribonucleic Acid)
<b>lnRNA</b>	Ácido ribonucleico largo no codificante (long non-coding Ribonucleic Acid)
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero (messenger Ribonucleic Acid)
<b>RRE</b>	Elemento de respuesta a Rev (Rev Response Element)
<b>YTHDF</b>	Familia de dominios homólogos a YT521 (YT521-B Homology Domain Family)
<b>FTO</b>	Gen asociado a la grasa corporal y obesidad (Fat mass and obesity-associated gene)
<b>ALKBH5</b>	Homólogo reparador de alquilaciones 5 (Alkylation Repair Homolog 5)
<b>hpt</b>	Horas post-infección
<b>hpi</b>	Horas post-transfección
<b>ORF</b>	Marco de lectura abierto (Open Reading Frame)
<b>DMEM-RS</b>	Medio Eagle modificado por Dulbecco y reducido en suero (Dulbecco's Modified Eagle Medium Reduced Serum)
<b>MEM</b>	Medio Mínimo Esencial (Minimal Essential Medium)
<b>METTL14</b>	Metiltransferasa tipo 14 (Methyltransferase-like 14)
<b>METTL3</b>	Metiltransferasa tipo 3 (Methyltransferase-like 3)
<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección (Multiplicity Of Infection)
<b>m<sup>6</sup>A</b>	N6-metiladenosina
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>DLPs</b>	Partículas de doble capa (Double Layered Particles)
<b>TLPs</b>	Partículas de triple capa (Triple Layered Particles)
<b>siRNAs</b>	Pequeños RNAs interferentes (small interferent RNA)
<b>WTAP</b>	Proteína asociada al tumor 1 de Wilms (Wilms' Tumor 1 Associated Protein)
<b>NSP1-6</b>	Proteína no estructural 1-6 (Non Structural Protein 1-6)
<b>VP1-6</b>	Proteína viral 1-6 (Viral Protein 1-6)
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>RV</b>	Rotavirus
<b>RRV</b>	Rotavirus de simio (Rhesus Rotavirus)
<b>MIRES</b>	Sitios de compromiso ribosomal inducidos por N6-metiladenosina (m <sup>6</sup> A Induced Ribosomal Engagement Site)
<b>TNC</b>	Solución de Tris-HCl, NaCl y CaCl <sub>2</sub>
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>UFFs</b>	Unidades Formadoras de Focos infecciosos
<b>HIV</b>	Virus de Inmunodeficiencia Humana (Human Immunodeficiency Virus)
<b>YFV</b>	Virus de la fiebre amarilla (Yellow Fever Virus)
<b>HCV</b>	Virus de la hepatitis c (Hepatitis C Virus)
<b>DENV</b>	Virus del dengue (Dengue Virus)
<b>WNV</b>	Virus del Nilo Occidental (West Nile Virus)
<b>ZIKV</b>	Virus del zika (Zika Virus)

---

## ÍNDICE

	III
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	V
<b>DEDICATORIA</b>	V
<b>SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b>	VI
<b>ÍNDICE</b>	VII
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	IX
<b>RESUMEN</b>	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	3
1.1 Rotavirus	3
1.1.1 Epidemiología	3
1.1.2 Clasificación	4
1.1.3 Genoma	5
1.1.4 Estructura	6
1.1.5 Ciclo replicativo	7
1.2 Modificaciones post-transcripcionales que influyen en la expresión de genes	11
1.2.1 N6-metiladenosina (m <sup>6</sup> A)	11
1.2.1.1 Proteínas involucradas en la metilación m <sup>6</sup> A	12
1.2.1.2 Procesos moleculares y celulares regulados por N6-metiladenosina	14 14
<b>2. ANTECEDENTES</b>	17
2.1 N6-metiladenosina en infecciones virales	17
<b>3. HIPÓTESIS</b>	22
<b>4. OBJETIVOS</b>	22
4.1 General	22
4.2 Particulares	22
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	23
5.1 Líneas celulares y cepas virales	23
5.2 Título viral	23
5.3 Purificación de partículas virales por colchón de sacarosa	24

5.4	Silenciamiento por transfección reversa de siRNAs	25
5.5	Determinación de progenie viral por rendimiento viral	26
5.6	Western blot	26
5.7	Extracción de RNA	27
5.8	Dot blot	27
5.9	RT-PCR cuantitativa en tiempo real	28
5.10	Tinción de plata para electroforesis de RNA	29
5.11	Análisis estadístico	29
5.12	Análisis densitométrico	29
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>30</b>
6.1	La producción de la progenie viral de RRV es regulada por METTL3, METTL14 y FTO	30
6.2	Contrario a la interferencia de METTL14, METTL3 y FTO; la expresión de la maquinaria de m <sup>6</sup> A no se afecta por la infección con RRV.	33
6.3	El RNA viral aumenta con el silenciamiento de METTL3, METTL14 y FTO	36
6.4	La infectividad de las partículas virales aisladas de células transfectadas con siFTO disminuye	38
6.5	N <sup>6</sup> -metiladenosina disminuye en una infección con RRV, aunque el RNA de los viriones de RRV no contiene m <sup>6</sup> A -	40
<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>42</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>45</b>
<b>9.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>46</b>
	<b>REFERENCIAS</b>	<b>47</b>

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estructura del rotavirus	5
<b>Figura 2</b>	Estructura genómica del rotavirus	7
<b>Figura 3</b>	Ciclo replicativo del rotavirus	8
<b>Figura 4</b>	Maquinaria de N6-metiladenosina en el RNA	12
<b>Figura 5</b>	Estructura de los dominios de las proteínas escritoras y borradoras de N6-metiladenosina en el RNA	14
<b>Figura 6</b>	La m <sup>6</sup> A influye en el metabolismo del RNA y la traducción del mRNA	16
<b>Figura 7</b>	La m <sup>6</sup> A en las infecciones virales	19
<b>Figura 8</b>	La maquinaria de m <sup>6</sup> A modula la producción de progenie viral infecciosa de RRV	31
<b>Figura 9</b>	Las metiltransferasas y la desmetilasa FTO incrementan la expresión de m <sup>6</sup> A en células infectadas	32
<b>Figura 10</b>	Expresión de la maquinaria de m <sup>6</sup> A y proteínas estructurales de RRV durante el silenciamiento de METTL14, METTL3 y FTO	35
<b>Figura 11</b>	RNA de RRV aumenta con el silenciamiento de la maquinaria de m <sup>6</sup> A	37
<b>Figura 12</b>	FTO regula negativamente la producción de partículas virales infecciosas de RRV	39
<b>Figura 13</b>	N6-metiladenosina no está presente en el RNA de los viriones de RRV y disminuye durante la infección	41



## RESUMEN

Una de las modificaciones químicas más abundantes e importantes en la regulación post-transcripcional de RNA es la N6-metiladenosina ( $m^6A$ ). La maquinaria de la  $m^6A$  incluye a las metiltransferasas (o proteínas escritoras), demetilasas (borradoras) y a las proteínas lectoras que se unen a  $m^6A$ .

Este tipo de modificación juega un papel muy importante en la estabilidad de los mRNAs, ya sea promoviendo su traducción, favoreciendo su degradación o alterando el splicing. En el caso de las infecciones virales, se ha encontrado que N6-metiladenosina está presente en el RNA de virus con replicación nuclear como HIV-1, teniendo un papel tanto proviral como antiviral; y algunos de replicación citoplásmica como HCV, en donde suprime la infección.

La falta de estudios sobre la N6-metilación de las adenosinas en el contexto de una infección por virus de RNA de doble cadena con replicación citoplásmica nos llevó a proponer que  $m^6A$  podría estar regulando negativamente la infección con rotavirus.

En este trabajo se caracterizó que, al silenciar a la proteína escritora METTL14 la progenie viral de rotavirus aumenta; por otro lado, al reducir la expresión de la proteína borradora FTO, los viriones producidos disminuye, indicando una modulación negativa o positiva en la producción de partículas virales infecciosas, respectivamente. Interesantemente, tanto las metiltransferasas METTL3 y METTL14, como la desmetilasa FTO aumentan la expresión del RNA viral de cadena sencilla cuando son interferidas, lo cual nos refiere a una regulación negativa del ciclo replicativo de RRV. Dado lo anterior, se plantea que la participación de la desmetilasa FTO podría ser necesaria para el correcto ensamblado de las partículas virales.

Por último, se encontró que N6-metiladenosina disminuye durante el ciclo replicativo de RRV y que el genoma de las partículas virales de rotavirus no contiene N6-metiladenosina. Esto nos da las bases para sugerir que la presencia de m<sup>6</sup>A podría tener un papel antiviral durante la infección con RRV.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Rotavirus.

#### 1.1.1 Epidemiología

En 2015, más de 1.3 millones de muertes a nivel mundial fueron causadas por diarrea, afectando especialmente a niños menores de 5 años. Con 199 000 defunciones reportadas, los rotavirus son el principal agente etiológico de la diarrea severa y deshidratante <sup>1</sup>. Aproximadamente el 90% de los decesos ocasionados por rotavirus se presentan en países en vías de desarrollo, principalmente en Asia y África, debido a deficiencias en asistencia médica <sup>2</sup>.

Los rotavirus, nombre derivado del latín *rota* por su similitud morfológica con una rueda (Figura 1a), son transmitidos esencialmente por la ruta fecal-oral e infectan a los enterocitos maduros en las vellosidades del intestino delgado, disminuyendo su capacidad de absorción y produciendo diarrea <sup>3</sup>. Son virus muy estables, ya que al requerir el paso por el estómago, resisten las condiciones de bajo pH y la actividad de enzimas digestivas. El tratamiento recomendado para la gastroenteritis causada por rotavirus es la administración de electrolitos y fluidos para prevenir la deshidratación <sup>4</sup>.

Actualmente, hay dos vacunas disponibles en el mercado internacional, RV1 (monovalente) y RV5 (pentavalente), cuya seguridad y eficacia han sido probadas ampliamente <sup>2</sup>. En México, se ha detectado una amplia disminución de muertes relacionadas con rotavirus gracias a la implementación de la vacuna en la cartilla nacional de inmunizaciones en el 2007, habiendo reducido un 46% la mortalidad asociada a diarrea en niños menores de 5 años durante el periodo 2008-2010 <sup>5</sup>.

A pesar de las medidas implementadas por la OMS, las infecciones con rotavirus siguen siendo un gran problema de salud pública a nivel mundial; destacando el hecho de que la tasa de infección con rotavirus es similar en todo el mundo, no siendo así la mortalidad. Dado lo anterior, más estudios son necesarios para definir las estrategias adecuadas que lleven a enfrentar este reto en las enfermedades causadas por rotavirus.

### **1.1.2 Clasificación**

Pertencientes a la familia *Reoviridae*, los rotavirus son virus no envueltos que miden aproximadamente 100 nm en diámetro y poseen una cápside con estructura icosaédrica conformada por tres capas de proteínas que rodean al genoma y a las proteínas necesarias para su propagación, como la RNA polimerasa dependiente de RNA (Figura 1a, b). Su genoma está compuesto por 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) y su replicación ocurre en el citoplasma de las células infectadas <sup>4</sup>.

Basándose en su antigenicidad y diversidad genómica, los rotavirus se han clasificado en diez diferentes especies (A-J), las cuales infectan tanto a mamíferos como a aves; siendo RVA el agente de mayor importancia médica <sup>3</sup>. De acuerdo a la variedad en los epítomos neutralizantes y el análisis de las secuencias de las proteínas virales VP7 y VP4, existe una gran lista de serotipos y genotipos de rotavirus grupo A <sup>4</sup>.

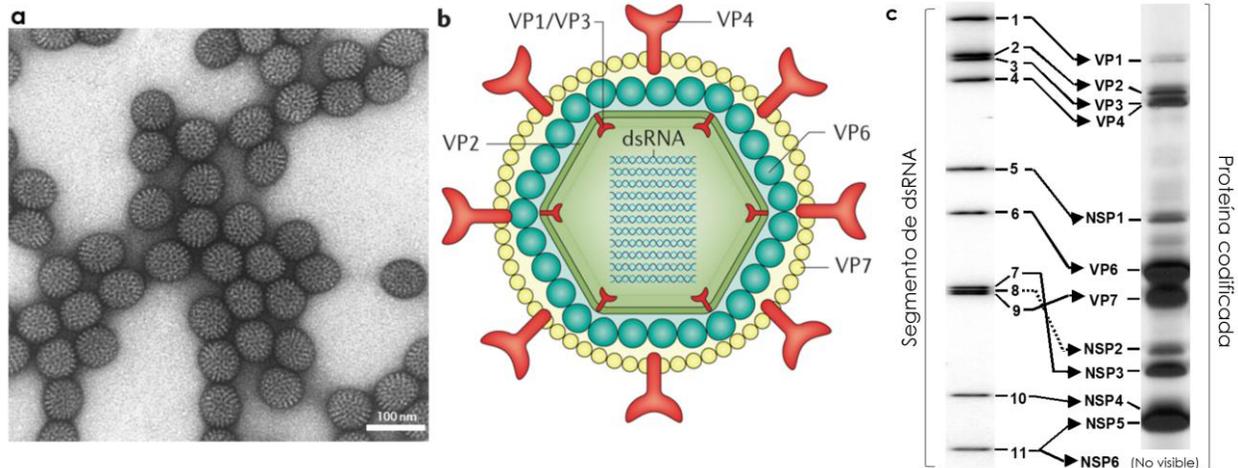


Figura 1| **Estructura del rotavirus.** **a** | Morfología ultraestructural de partículas de rotavirus vistas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) con tinción negativa <sup>6</sup>. **b** | Diagrama de la organización de una partícula viral madura de rotavirus con tres capas (TLP)<sup>3</sup>. **c** | Patrón electroforético de los segmentos de RNA del genoma viral de rotavirus con las respectivas proteínas codificadas vistas por PAGE <sup>3,7</sup>. VP (Proteína viral), NSP (Proteína viral No Estructural).

### 1.1.3 Genoma

El genoma de rotavirus es de aproximadamente 18,500 pares de bases y contiene 11 segmentos de dsRNA que codifican para 6 proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y 6 no estructurales (NSP1-NSP6), como se indica en la figura 1c <sup>8</sup>. El dsRNA está compuesto por una cadena de sentido positivo o (+)RNA, que es equivalente al mRNA porque puede ser traducida, y una cadena complementaria de polaridad negativa o (-)RNA, que para poder traducirse debe de ser copiada primero a mRNA por la RNA polimerasa viral dependiente de RNA (VP1) <sup>9</sup>. Los 11 segmentos de dsRNA están apareados de principio a fin, no contienen señal de poliadenilación, son ricos en adeninas y uracilos, contienen secuencias conservadas que actúan como elementos reguladores en los extremos 5' y 3', poseen al menos un marco de lectura abierto (ORF) y son

monocistrónicos, con excepción del segmento 11. Únicamente la cadena de (+) RNA es la que cuenta con la secuencia 5' cap m<sup>7</sup>GpppG<sup>(m)</sup>GC <sup>4</sup>.

El RNA de rotavirus tiene un patrón electroforético muy característico (Figura 1c); en el caso de RVA se observan cuatro regiones específicas en las que hay cuatro segmentos de dsRNA con alto peso molecular, dos segmentos con peso medio seguidos de un triplete que comprende los segmentos 7, 8 y 9, y, por último, dos segmentos de bajo peso molecular <sup>4</sup>.

Las actividades de las proteínas codificadas por los segmentos de dsRNA viral se enlistan en la Figura 2, aunque más funciones se siguen encontrando.

#### **1.1.4 Estructura**

La partícula viral infecciosa o virión consiste en el arreglo de tres capas concéntricas con estructura icosaédrica (Figura 1b). La capa más interna, que forma el núcleo de la partícula, está compuesta por la proteína VP2 y engloba a los 11 segmentos de dsRNA, la RNA polimerasa dependiente de RNA o VP1 y la enzima que añade el cap, VP3 <sup>8</sup>. Las partículas con doble capa (DLPs) se han descrito como partículas rugosas en las que trímeros de la proteína VP6 se asocian con trímeros que se proyectan desde la capa interna <sup>4</sup>. La tercera capa, la más externa, contiene trímeros de VP7 y proyecciones o protuberancias de VP4 para formar las partículas de triple capa (TLPs), las cuales son infecciosas <sup>8</sup>. Asimismo, se han encontrado diversos tipos de canales que atraviesan las dos capas más externas para vincularlas con el núcleo interno y de esta manera participar en el transporte del mRNA.

## Efecto de N6-metiladenosina en la replicación de rotavirus

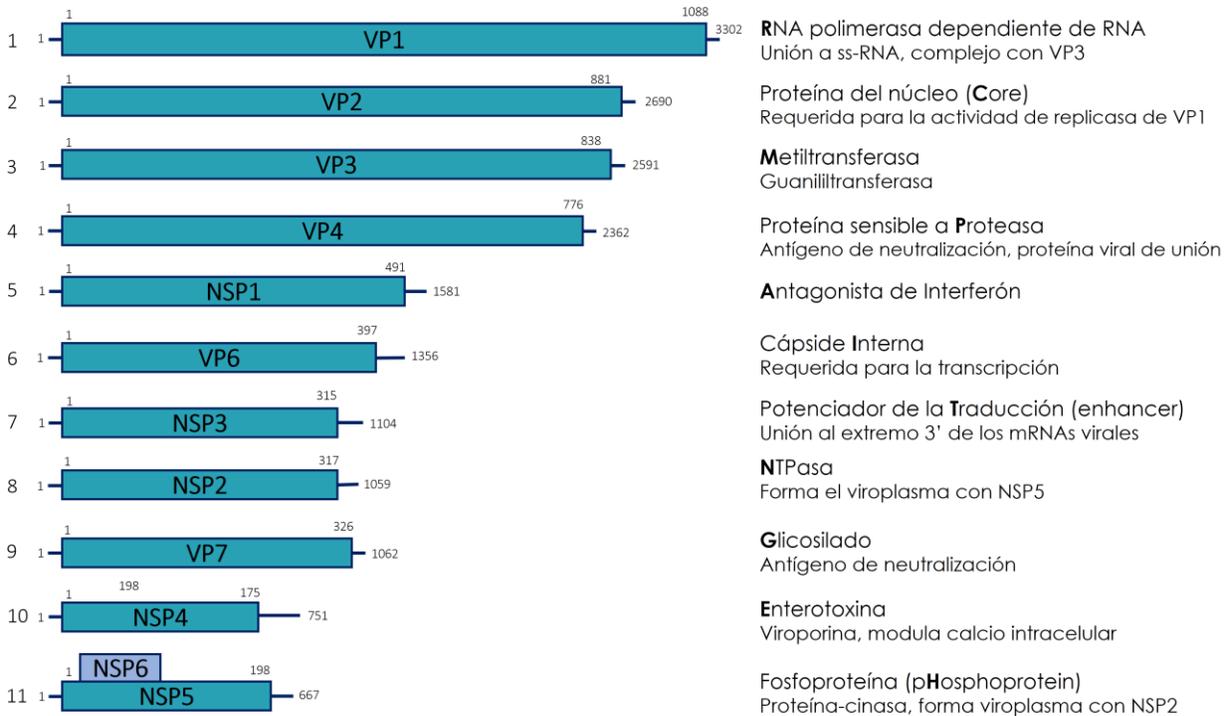


Figura 2 | **Estructura genómica del rotavirus.** Los once segmentos de RNA (numerados en nucleótidos) mostrados en el sentido positivo y relacionados con las respectivas proteínas que codifican (numerados en aminoácidos). Las líneas en los extremos 5' y 3' representan las regiones no codificadas. A la derecha, se presentan las funciones descritas de éstas para el rotavirus de simio SA11 y en negrita se indica la letra con la que se identifica a la proteína en el nuevo sistema de clasificación de genotipos<sup>4</sup>.

### 1.1.5 Ciclo replicativo

Rotavirus se replica exclusivamente en el citoplasma, incluyendo los siguientes pasos (Figura 3):

#### a. Unión de la partícula viral.

En general, la unión de RV a la superficie celular es un proceso promiscuo, pues una amplia variedad de células contiene receptores que reconocen a las partículas virales; no obstante, co-receptores específicos son necesarios para la internalización del virus a la célula. La unión depende de las proteínas de superficie VP4 (y sus productos

proteolíticos) y de la glicoproteína VP7. En este primer paso, están involucrados receptores con ácido siálico o con antígenos de grupos histo-sanguíneos (HBGAs) y como co-receptores participan moléculas de la superficie celular, tales como integrinas, Hsc70 o moléculas asociadas a balsas lipídicas <sup>8</sup>.

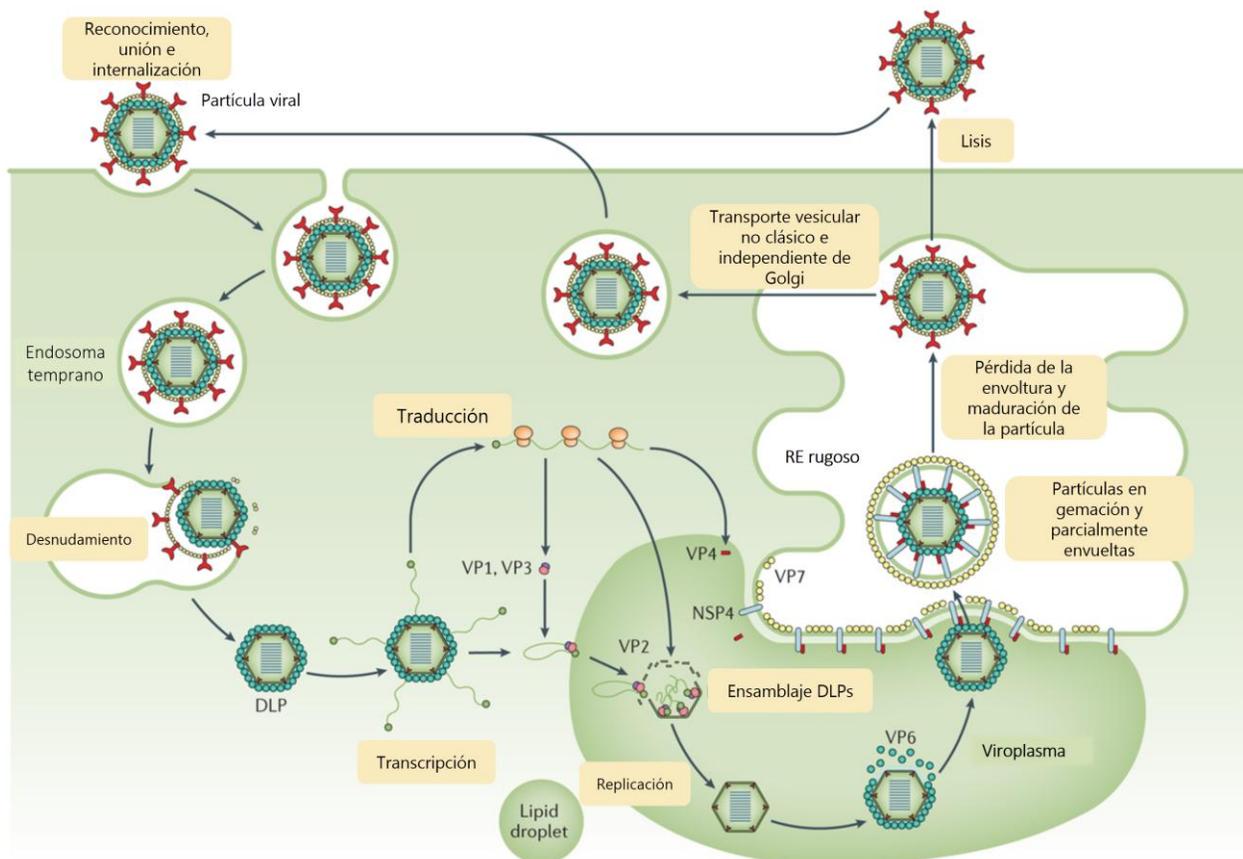


Figura 3 | **Ciclo replicativo de rotavirus.** Principales pasos involucrados en la replicación de rotavirus. La entrada es mediada por la proteólisis de VP4 en VP5\* y VP8\*. Al endocitarse, la baja concentración de Ca<sup>2+</sup> remueve la capa externa y libera DLPs, que son transcripcionalmente activos. Los mRNAs virales son usados para producir proteínas virales o como plantillas para sintetizar el genoma que será empaquetado en viroplasmos, los cuales requieren componentes de cuerpos lipídicos (lipid droplets). La asociación de DLPs con NSP4 ensambla a las TLPs que gemarán hacia el Retículo Endoplasmático Rugoso, adquiriendo transitoriamente una envoltura. Una vez que las partículas maduran, éstas salen de la célula por lisis o transporte vesicular no clásico <sup>3</sup>.

*b. Internalización*

La entrada depende de la proteólisis de VP4 en las subunidades VP8\* y VP5\* por enzimas tipo tripsina <sup>10</sup>. La inducción de un cambio conformacional de las proteínas de la capa externa al entrar en contacto con sus receptores le permite a la partícula penetrar a la membrana celular<sup>10,4</sup>. La entrada al citoplasma de la célula es por un proceso de endocitosis mediado o no por clatrina e independiente de caveolina <sup>3</sup>, el virión llega a los endosomas haciendo uso de componentes del complejo ESCRT <sup>11</sup>. Esta internalización se lleva a cabo 60-90 minutos después de la unión con los receptores <sup>4</sup>. Una vez que la partícula se encuentra en el interior de los endosomas, la baja concentración de Ca<sup>2+</sup> facilita el desprendimiento de la capa externa y la internalización de las DLPs hacia el citosol <sup>10</sup>.

*c. Transcripción*

Las partículas con doble capa (DLPs) son transcripcionalmente activas. RV contiene su propia maquinaria de replicación de dsRNA, es decir, el complejo de la RNA polimerasa dependiente de RNA que comprende a VP1 y VP3. Este complejo produce mRNAs capeados requeridos para la síntesis de proteínas y templados para la síntesis del genoma, los cuales serán encapsidados en nuevas partículas virales <sup>8</sup>. Cada segmento de mRNA o (+)RNA sintetizado a partir de (-)RNA sale de la partícula por canales tipo I adyacentes al sitio de transcripción para poder ser traducidos en el citoplasma <sup>4</sup>.

*d. Empaquetamiento y replicación.*

La transcripción es un proceso asimétrico y bien coordinado. Una vez que la transcripción y traducción de (+)RNA fue llevada a cabo, comienza el empaquetamiento de los 11

segmentos de ssRNA y la síntesis del (-)RNA debido a un cambio conformacional de VP1 inducido por VP2 <sup>10</sup>. Si bien no se conoce con exactitud el proceso por el cual se ensamblan las partículas virales, se ha propuesto un modelo en el que el empaquetamiento y formación del core VP1/VP3 con VP2 ocurre concomitantemente con la adición de VP6 para obtener DLPs <sup>8</sup>.

Estos dos procesos ocurren en inclusiones citoplásmicas, electrodensas y no membranosas cercanas al núcleo llamadas viroplasmias que son visibles de 2 a 3 horas post-infección. Su formación depende de las proteínas NSP2 y NSP5, las cuales interactúan con otras proteínas virales como VP1-3 y VP6. Los viroplasmias también se encargan de reclutar componentes del autofagosoma, cuerpos lipídicos, proteasoma y de controlar el citoesqueleto <sup>8</sup>.

*e. Maduración de las DLPs y liberación de las TLPs*

Una vez que las DLPs están formadas, se asocian al retículo endoplasmático para poder madurar a TLPs. La entrada al retículo endoplásmico (RE) se da por medio de la interacción entre NSP4 (receptor intracelular) que se encuentra insertado en la membrana del RE y VP6, permitiendo que la partícula gire hacia el lumen del RE y adquiera temporalmente una envoltura. Esta membrana se pierde al darse la asociación entre partícula y proteínas de la capa externa, V4 y VP7<sup>8</sup>. La subsecuente liberación de las partículas virales se da por lisis celular o por un transporte vesicular no dependiente de Golgi en células epiteliales polarizadas <sup>3</sup>.

## **1.2 Modificaciones post-transcripcionales que influyen en la expresión de genes**

El flujo de la información genética sigue las reglas del dogma central. Contando con tres pasos principales (replicación, transcripción y traducción) para la expresión de los genes contenidos en el DNA, estos procesos son altamente regulados por el organismo para controlar y sintetizar lo requerido en determinado momento. En este sentido, se sabe que existen modificaciones químicas que pueden alterar la información codificada no sólo en el DNA, con modificaciones epigenéticas, sino también a nivel de RNA y proteínas <sup>12</sup>.

### **1.2.1 N6-metiladenosina (m<sup>6</sup>A)**

Desde hace más de 50 años se ha descrito que, además de los residuos canónicos A, C, U y G; el RNA puede contener una amplia variedad de nucleótidos modificados. Se ha encontrado que en los tRNAs hay más de 13 modificaciones por molécula, entre las que se encuentran la adición de aminoácidos, isomerización y estructuras cíclicas. Asimismo, el RNA ribosomal contiene más de 210 sitios con modificaciones que abarcan la presencia de pseudouridinas y bases metiladas <sup>13</sup>. En el caso del mRNA, es bien sabido que la presencia del 5' cap y la poliadenilación en el extremo 3' afectan la estabilidad del transcrito, su exportación, splicing y traducción. Como parte de las investigaciones en los cambios químicos internos del mRNA, en 1974 se descubrió que la metilación de las adenosinas, esencialmente N6-metiladenosina o m<sup>6</sup>A, era la modificación química interna más abundante tanto en RNAs codificantes como en RNAs largos no codificantes (lncRNAs) eucariotes y en el genoma de algunos virus <sup>14</sup>.

Al determinar el epitranscriptoma de m<sup>6</sup>A se identificó la secuencia consenso en la que el mRNA es modificado: DRAMCH (D = G/A/U, R = G > A, y H = U/C/A), demostrándose

que hay más de 10,000 sitios metilados en el 25% de los transcritos humanos <sup>15</sup>. Haciendo uso de métodos de inmunoprecipitación y secuenciación masiva se pudo analizar la distribución de m<sup>6</sup>A, teniendo un enriquecimiento en los extremos 5' y 3' del mRNA, así como en regiones cercanas al codón de paro <sup>16</sup>.

### 1.2.1.1 Proteínas involucradas en la metilación m<sup>6</sup>A

Siendo una metilación reversible, la maquinaria encargada de controlar a N6-metiladenosina abarca una serie de proteínas que funcionan como escritoras, borradoras o lectoras (Figura 4). La N6-metilación de adenosinas es llevada a cabo por enzimas tipo metiltransferasas, METTL3 y METTL14; revertida por las desmetilasas, FTO y ALKBH5; y mediada por proteínas de unión a m<sup>6</sup>A, tal como las de la familia YTHDF1-3 y otras ribonucleoproteínas aún no descritas. En conjunto, esta maquinaria ejerce una serie de funciones sobre procesos celulares que son derivadas de la modificación post-transcripcional de los genes (Figura 6) <sup>17</sup>.

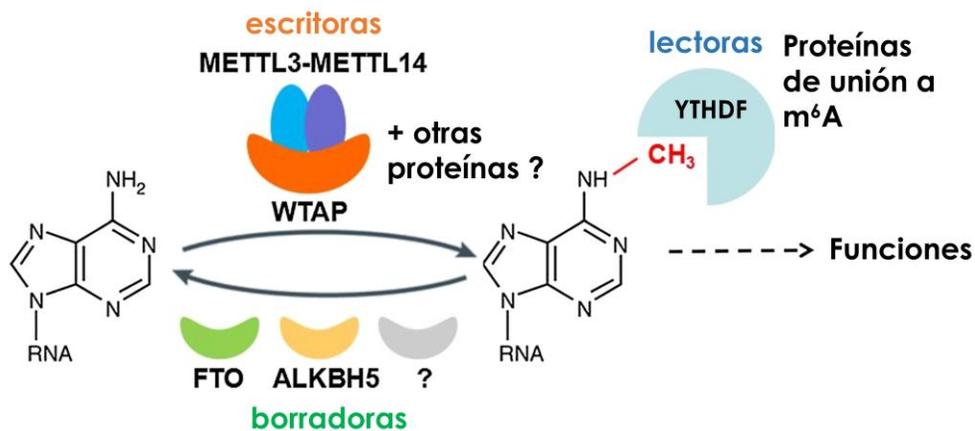


Figura 4| **Maquinaria de N6-metiladenosina en el RNA.** Siendo la incorporación de m<sup>6</sup>A una reacción reversible y dinámica, la maquinaria incluye a METTL3, METTL14 y el factor WTAP como complejo de metilación; a FTO y ALKBH5 que desmetilan al RNA en los residuos de adenosina; y a las proteínas lectoras o de unión a m<sup>6</sup>A como YTHDF1-3 o YTHDC1 que ejecutan varias funciones en procesos fisiológicos <sup>17</sup>.

a) *Escritoras de m<sup>6</sup>A.*

El complejo enzimático que transfiere los grupos metilos provenientes de S-adenosilmetionina (SAM) hacia la posición N6 de las adenosinas del RNA comprende tres subunidades: METTL3, METTL14 y el factor WTAP (Figura 4) <sup>16</sup>.

METTL3 interacciona con METL14 para formar un heterodímero estable de 1 MDa que se localiza en speckles nucleares. En el complejo, METTL3 es una metiltransferasa de 64 kDa que funciona como centro catalítico mientras que METTL14, de 52 kDa, es un tipo andamio que reconoce y se une al sustrato de RNA. Ambas tienen actividad de metiltransferasa, puesto que cuentan con el dominio de unión a SAM (Figura 5). Es posible que una de ellas sea susceptible a modificaciones post-traduccionales que permitan el prendido selectivo de la metilación, mientras que la otra puede estar reconociendo a los mRNAs blanco para que en conjunto actúen sobre una amplia variedad de mRNAs involucrados en varias vías metabólicas <sup>18,19,16</sup>.

De igual manera, se sabe que el factor WTAP se une a METTL14/METTL3 y puede estar involucrado en la localización del complejo en granulos nucleares y en el reclutamiento de mRNAs blanco; aunque éste no cuenta con alguna actividad tipo metiltransferasa <sup>16</sup>.

b) *Borradoras de m<sup>6</sup>A.*

La desmetilación oxidativa del grupo metilo de m<sup>6</sup>A es llevada a cabo, principalmente, por FTO. La Dioxigenasa Dependiente de  $\alpha$ -cetoglutarato y Fe<sup>2+</sup> (FTO) es una proteína de 58 kDa que repara RNA con m<sup>6</sup>A (Figura 5). Curiosamente, los niveles de FTO son afectados por los niveles de aminoácidos esenciales disponibles por lo que es considerado un sensor de nutrientes, estando altamente relacionado con el control de grasa corporal y obesidad <sup>16</sup>.

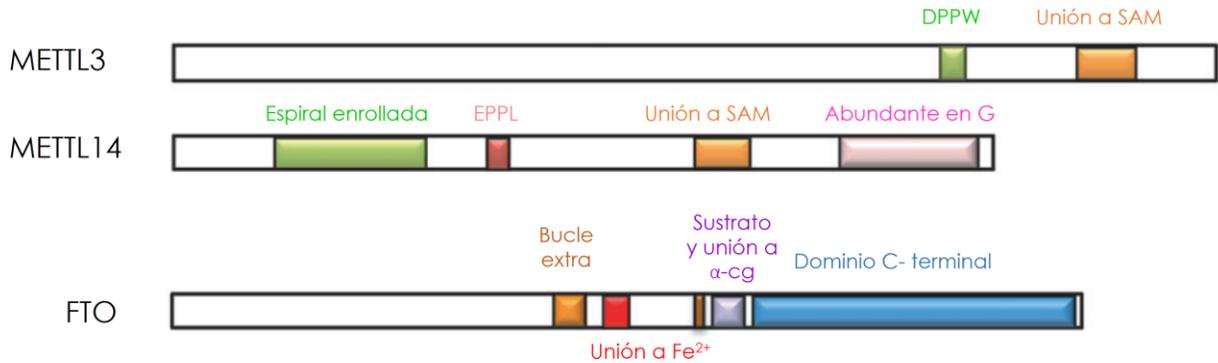


Figura 5| **Estructura de los dominios de las proteínas escritoras y borradoras de N6-metiladenosina en el RNA.** METTL3 y METTL14, las escritoras, comparten el dominio de unión a SAM en el extremo C- terminal, resultando en una actividad de metiltransferasas. Aunadamente, los dominios DPPW y EPPL catalizan la reacción de metilación. METTL14 contiene un dominio rico en Glicinas que le permite interactuar con una amplia variedad de proteínas. Entre los dominios funcionales de FTO, el de unión a Fe<sup>2+</sup> así como al sustrato y α-cetoglutarato, son necesarios para la desmetilación oxidativa de m<sup>6</sup>A. El bucle extra brinda especificidad para unirse al dsRNA o ssRNA <sup>16,20</sup>.

### 1.2.1.2 Procesos moleculares y celulares regulados por N6-metiladenosina

A nivel molecular, la m<sup>6</sup>A afecta la estructura del RNA haciéndola más laxa al no permitir el apareamiento de tripletes (apareamiento tipo Hoogsteen), interrumpiendo la formación de estructuras secundarias o facilitando la unión de proteínas lectoras <sup>16,21</sup>.

La N6-metiladenosina es capaz de inducir la traducción no canónica de transcritos, ya que al ser abundante en el extremo 5', puede inducir la formación de sitios MIREs (m<sup>6</sup>A-Induced Ribosomal Engagement Site) capaces de reclutar la maquinaria de inicio de traducción independiente del 5' cap e incluso puede alterar el splicing al promover la inclusión de exones <sup>22,23</sup>.

Una vez que el RNA fue modificado con m<sup>6</sup>A, esta metilación funciona como una señal que puede derivar tanto en un aumento en la traducción del transcrito como en una inducción de su decaimiento al secuestrarlo en cuerpos P o simplemente en su almacenamiento en gránulos de estrés (Figura 6), afectando la estabilidad del transcrito y la producción de proteína; influyendo de esta forma en distintos procesos celulares como diferenciación celular, obesidad, desordenes neuronales, cáncer y otros relacionados con la respuesta inmune <sup>16,24,25</sup>.

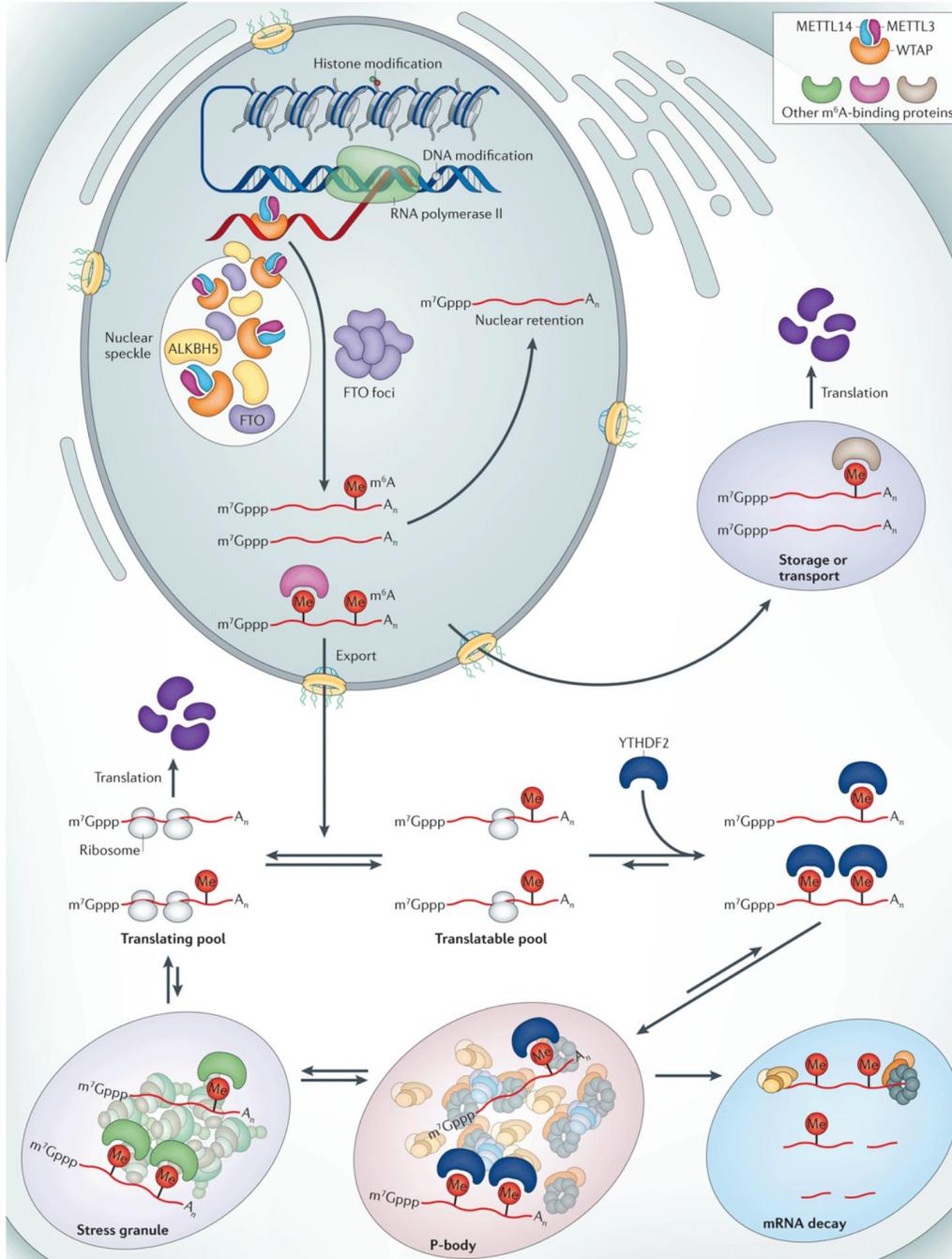


Figura 6| **La m<sup>6</sup>A influye en el metabolismo del RNA y la traducción del mRNA.** Mientras la maquinaria de metilación o desmetilación afecta directamente al RNA, las proteínas lectoras son las encargadas de modular varios procesos celulares. En el núcleo, m<sup>6</sup>A puede intervenir en la exportación del RNA, su retención en el núcleo o el splicing al ser reconocido por proteínas de unión a m<sup>6</sup>A. Una vez en el citoplasma, YTHDF u otras ribonucleoproteínas pueden unirse a los RNAs con m<sup>6</sup>A y llevarlo a cuerpos de procesamiento (P-bodies) para su degradación. Los P-bodies pueden formar dinámicamente gránulos de estrés que pueden almacenar transcritos y eventualmente liberarlos para favorecer su traducción. De esta manera las proteínas lectoras favorecen la degradación, almacenamiento y traducción del mRNA<sup>12</sup> Adicionalmente, m<sup>6</sup>A puede promover la traducción cap-independiente<sup>22</sup>.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 N6-metiladenosina en infecciones virales

Como se ha visto a lo largo de la historia, el estudio de los virus ha permitido el hallazgo de muchos procesos fundamentales de las células. La caracterización del ciclo de replicación de varios virus ha permitido descubrir procesos como el capping del mRNA, el splicing, la interferencia del RNA y algunos mecanismos alternos de traducción, entre otros.

Habiendo sido descubierta en RNAs virales, la N6-metiladenosina fue identificada cuando se estudiaba la metilación en el extremo 5' (cap) del mRNA. En estos experimentos se observó que había un alto grado de metilación en las bases internas del RNA celular y de virus de DNA como SV40, adenovirus-2 y herpes simple tipo 1<sup>26</sup>. Al poco tiempo, también se encontró a m<sup>6</sup>A en el genoma de retrovirus y de diferentes virus con genomas de RNA de cadena negativa y positiva, como indica la Tabla 1.

A pesar de que la m<sup>6</sup>A se definió como la modificación post-transcripcional más abundante en mRNAs eucariontes y virales, ocurriendo a una frecuencia de aproximadamente 3-5 sitios por mRNA de mamífero y 15 sitios por mRNA viral, durante mucho tiempo se consideró que esta modificación era estática e inalterable hasta que se descubrió la maquinaria de metilación m<sup>6</sup>A y se empezó determinar la función que podría tener en las infecciones virales (Tabla 1) <sup>16,25</sup>.

VIRUS	MECANISMO
<b>Virus de DNA</b>	
SV40	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transcritos virales tardíos contienen ~3 residuos internos de m<sup>6</sup>A.</li> <li>• El procesamiento nuclear y la exportación de mRNAs virales tardíos se ve afectada cuando se bloquea m<sup>6</sup>A con cicloleucina.</li> </ul>
Adenovirus-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RNAs virales contienen m<sup>6</sup>A.</li> <li>• Previo al splicing, el RNA es modificado con m<sup>6</sup>A.</li> <li>• m<sup>6</sup>A es conservado en los mRNAs virales después de su exportación.</li> </ul>
Herpes simple	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mRNAs virales contienen m<sup>6</sup>A.</li> </ul>
<b>Retrovirus</b>	
HIV-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El mRNA viral y el RNA genómico contienen m<sup>6</sup>A, siendo abundante en el extremo 3'.</li> <li>• Los sitios m<sup>6</sup>A en la región del Elemento de Respuesta a Rev (RRE) en el RNA impactan en la exportación nuclear de RNA viral.</li> <li>• Proteínas de unión a m<sup>6</sup>A como YTHDF se unen al RNA viral, promueven su replicación viral y pueden suprimir la transcripción reversa del RNA genómico.</li> </ul>
Rous sarcoma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RNA genómico tiene aproximadamente de 10-15 residuos m<sup>6</sup>A por molécula, principalmente en el extremo 3'.</li> <li>• Al bloquear m<sup>6</sup>A con cicloleucina, se reduce la formación del mRNA <i>Env</i> maduro y procesado por splicing.</li> </ul>
Virus de Leucemia Felina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RNA genómico contiene modificaciones internas de m<sup>6</sup>A.</li> </ul>
Virus de Leucemia Murina de Moloney	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RNA genómico contiene modificaciones internas de m<sup>6</sup>A.</li> </ul>
<b>Virus de (+) RNA</b>	
HCV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El RNA genómico viral contiene múltiples sitios m<sup>6</sup>A.</li> <li>• m<sup>6</sup>A suprime la producción de partículas virales, pero no altera la replicación del RNA viral.</li> <li>• Las proteínas YTHDF bloquean la producción de partículas virales y se relocalizan en sitios de ensamblaje viral alrededor de cuerpos lipídicos.</li> <li>• La mutación de un cluster de sitios m<sup>6</sup>A incrementa la producción de partículas virales.</li> </ul>
ZIKV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El RNA genómico viral contiene múltiples sitios m<sup>6</sup>A cuyos patrones varían en tres cepas.</li> <li>• m<sup>6</sup>A y las proteínas YTHDF suprimen la infección viral.</li> </ul>
Virus de Dengue, Fiebre amarilla y West Nile	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El RNA genómico viral contiene múltiples sitios m<sup>6</sup>A.</li> </ul>
<b>Virus de (-) RNA</b>	
Influenza A	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mRNAs virales y los segmentos de RNA genómico contienen sitios internos de m<sup>6</sup>A.</li> <li>• m<sup>6</sup>A es desigualmente distribuida en mRNAs virales</li> </ul>

Tabla 1| Lista de virus que contienen m<sup>6</sup>A en su RNA y sus funciones descritas <sup>26</sup>.

Con lo anterior, en 2016 se publicaron tres artículos en los que se evidenciaba el papel proviral de la m<sup>6</sup>A en una infección con VIH tipo 1 (Figura 7a). Además de encontrar los sitios específicos de m<sup>6</sup>A en el genoma de HIV-1, se reportó que la metilación de las adenosinas en la región de RRE (Rev Response Element), sitio de unión de la proteína Rev, promueve el transporte de núcleo a citoplasma de los transcritos virales; resultando en un aumento en la replicación de HIV-1 <sup>13,27</sup>. Por otro lado, se demostró que las proteínas de unión a m<sup>6</sup>A de la familia YTHDF reconocen el RNA de HIV-1 modificado con m<sup>6</sup>A, inhibiendo la infección al bloquear la transcripción reversa llevada a cabo antes de la entrada del RNA genómico viral al núcleo; sugiriendo que la metilación de las adenosinas es un importante regulador en las infecciones virales por HIV-1 <sup>28</sup>.

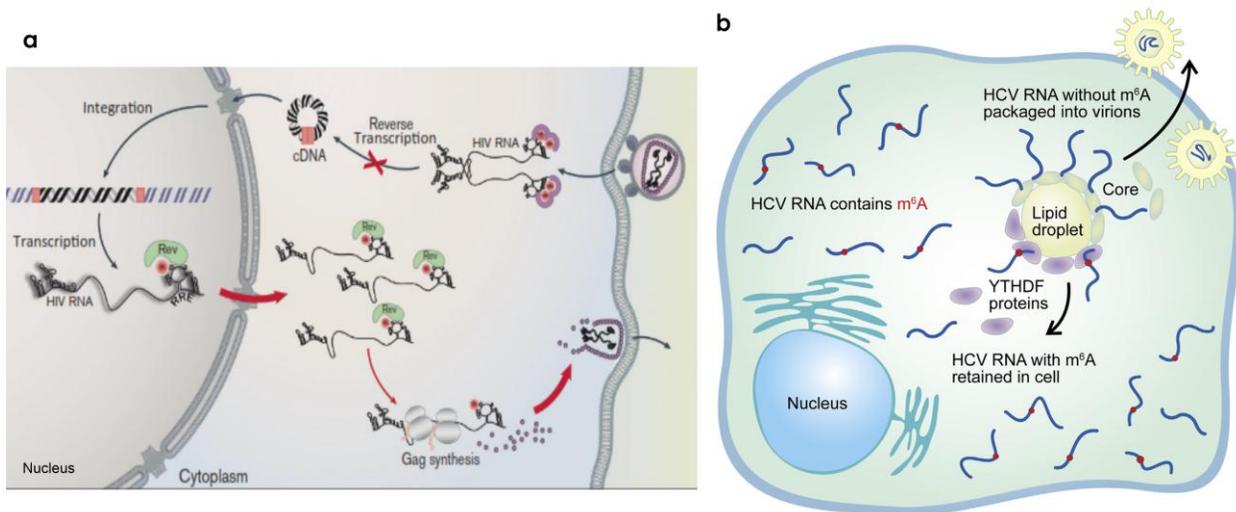


Figura 7 | **La m<sup>6</sup>A en las infecciones virales.** a) HIV-1 contiene m<sup>6</sup>A en su genoma de RNA. Posterior a la entrada, algunas proteínas de unión a m<sup>6</sup>A bloquean la transcripción reversa; sin embargo, los transcritos que son modificados con m<sup>6</sup>A en el núcleo son exportados más fácilmente por la proteína Rev resultando en un aumento de partículas virales <sup>14</sup>. b) En el citoplasma, el RNA de HCV con m<sup>6</sup>A es reconocido por las proteínas YTHDF que impiden la unión de las proteínas Core y bloquean el ensamblaje de los viriones, reteniendo el RNA viral con m<sup>6</sup>A en la célula <sup>29</sup>.

Si bien se sabía que la actividad de la maquinaria de m<sup>6</sup>A era exclusiva del núcleo, *Gokhale et al.* (2016) realizaron un gran aporte al presentar evidencias sobre la modulación que la m<sup>6</sup>A tiene en el ciclo replicativo del virus de Hepatitis C (HCV), un virus de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva cuya replicación es exclusivamente citoplásmica (Figura 7b). Por una parte, se comprobó que el silenciamiento de las metiltransferasas METTL3 y METTL14 aumenta la producción de HCV, mientras que el silenciamiento de las desmetilasas FTO y ALKBH5 la disminuyen (Figura 4). Adicionalmente, observaron que las proteínas YTHDF se relocalizan en sitios de ensamblaje de partículas virales y prevenían la producción de virus infeccioso. Finalmente, después de mapear los sitios m<sup>6</sup>A en el genoma de HCV e inactivar un cluster de m<sup>6</sup>A, se obtuvo un aumento en el título viral sin que se alterara la replicación del RNA viral. Así, los autores de este trabajo propusieron un modelo en el que las proteínas YTHDF se unían a los sitios de N6-metiladenosina en el RNA genómico de HCV y prevenían la unión de las proteínas del Core, las cuales permiten el adecuado ensamblaje de partículas virales. Por otra parte, al hacer un análisis global de virus de RNA con replicación citoplásmica pertenecientes a la familia *Flaviviridae*, mapearon y encontraron diversos sitios m<sup>6</sup>A en el genoma del Virus del Zika, Dengue, West Nile y Fiebre Amarilla, demostrando que las m<sup>6</sup>A-metiltransferasas pueden ser funcionales en el citoplasma celular <sup>29</sup>.

No obstante, en estos estudios no se examinó la función de la m<sup>6</sup>A en los genes involucrados en la respuesta inmune innata antiviral. Por lo cual, *Lichinchi et al.* (2016) describieron que bajo un esquema de infección con ZIKV los patrones de metilación m<sup>6</sup>A cambian en los transcritos celulares, ya sea con la adición de nuevos sitios de metilación

o la eliminación de otros, sucediendo particularmente en genes relacionados con la respuesta inmune para evitar su activación. Pese a los recientes avances en el análisis del impacto de la m<sup>6</sup>A en infecciones virales, se desconoce la relevancia de esta modificación post-transcripcional en la replicación de virus de RNA de doble cadena y de replicación citoplásmica, como lo es el rotavirus. La falta de investigaciones sobre las modificaciones epigenéticas que puede sufrir el RNA genómico de rotavirus, un virus de RNA de doble cadena, y su posible función en una infección nos llevó a plantear este proyecto, en el cual proponemos caracterizar la participación de la maquinaria de m<sup>6</sup>A en el ciclo replicativo de rotavirus.

---

## 2. HIPÓTESIS

La N6-metilación de adenosinas puede regular negativamente el ciclo replicativo de rotavirus.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 General

Determinar el efecto que podría tener la N6-metiladenosina en el ciclo replicativo de rotavirus.

### 3.2 Particulares

- Silenciar la expresión de los genes de metilación (METTL3 y METTL14) y desmetilación (FTO) mediante siRNAs en células MA104 y estudiar el efecto de este silenciamiento sobre la progenie viral producida, la expresión de proteínas virales y en la cantidad de RNA viral.
- Observar si el patrón de la N6-metilación de adenosinas es modificado por el silenciamiento de la maquinaria de m<sup>6</sup>A durante una infección por RRV.
- Determinar si el genoma de rotavirus contiene N6-metiladenosina.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Líneas celulares y cepas virales

Se empleó la línea celular MA104 derivada de células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) mantenidas en medio DMEM-RS con 4% de suero fetal bovino (SFB) en una atmósfera a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Para poder hacer el pase de células a distintos formatos de frascos o placas, las células se lavaron con EDTA 0.02% y se trataron con tripsina 0.01% para propiciar su desprendimiento <sup>30</sup>.

RRV (Rhesus rotavirus) fue la cepa de rotavirus de simio utilizada, donada por H. Greenberg (Stanford University, EUA). El virus fue amplificado en células MA104 y los lisados virales se activaron con tripsina 100µg/mL por 30 minutos a 37°C. El título viral fue determinado por un ensayo de focos de peroxidasa, como se describe posteriormente <sup>30</sup>.

### 4.2 Título viral

Para poder contar el número de Unidades Formadoras de Focos (UFF/mL) se utilizó un ensayo de inmunoperoxidasa. Este ensayo consiste en crecer a confluencia células MA104 en placas de 96 pozos e infectarlas con diluciones seriadas de lisados virales para después fijarlas y permeabilizarlas a las 14-16 horas post-infección (hpi) con 80% acetona en PBS por 20 minutos. Una vez que la monocapa se lavó con PBS, se incubó con el anticuerpo primario policlonal  $\alpha$ -TLPs que reconoce la mayor parte de las proteínas estructurales del virus (obtenido de conejo, producido en nuestro laboratorio) diluido 1:2000 en PBS por 1h a 37°C para enseguida incubar con la proteína A conjugada con peroxidasa a una concentración 1:2500 en PBS. Como sustrato de peroxidasa se ocupó

peróxido de hidrógeno con 3-amino-9-etil carbazol (revelador), diluidos en un buffer de acetatos con una incubación de 5 minutos. En presencia del antígeno reconocido por el anticuerpo primario, la reacción de la peroxidasa genera un producto colorido que se precipita en el lugar de la reacción. Las células así teñidas fueron contadas en un microscopio invertido Nikon TMS y el título viral calculado y expresado en unidades formadoras de focos peroxidados (UFFs) <sup>30</sup>.

### **4.3 Purificación de partículas virales por colchón de sacarosa**

Monocapas confluentes de MA104 en frascos fueron infectadas con RRV a una multiplicidad de infección (MOI) de 3. Pasadas 12 hpi, se sometieron a tres ciclos de congelamiento y descongelamiento, se raspó la monocapa y se diluyó en buffer TNC (Tris 10 mM pH=7.5, NaCl 140 mM y CaCl<sub>2</sub> 10 mM). Después de sonicar el lisado, se ultracentrifugó a 30 000 rpm, 1h a 4°C. El pellet se resuspendió en TNC y se le agregó un volumen de Freón, que se utilizó para extraer las membranas celulares, agitando fuertemente hasta formar una emulsión. Las fases se separaron nuevamente por centrifugación a 600 rpm, 5 minutos a 4°C.

La fase de freón se lavó por lo menos 3 veces con TNC. La fases acuosas se combinaron y se colocaron sobre un volumen igual de sacarosa 40% diluida en TNC y se ultracentrifugó a 40 000 rpm, 2h a 4°C y sin freno. Finalmente, el pellet se resuspendió en TNC y se guardó a 4°C <sup>30</sup>.

Para aislar partículas virales de células interferidas con siRNAs, la primera ultracentrifugación de 30 000 rpm, 1h a 4°C fue sustituida por una centrifugación de 1000 rpm, 5 min a 4°C para separar el pellet celular y el lisado resultante se extrajo con Freón.

#### 4.4 Silenciamiento por transfección reversa de siRNAs

Se preparó una dilución de oligofectamina (Invitrogen) 15  $\mu\text{L}/\text{mL}$  en medio MEM libre de suero, los siRNAs a ocupar se diluyeron en MEM a distintas concentraciones (Tabla 2) para a continuación, añadir a una placa de 48 pozos 15  $\mu\text{l}$  de siRNA y 90  $\mu\text{l}$  oligofectamina. Luego de una incubación de 20 minutos a 37°C, 200  $\mu\text{l}$  de una suspensión celular de  $1.3 \times 10^5$  células/mL derivadas de una monocapa con confluencia al 80% fueron agregados cuidadosamente. A las 16 horas post-transfección (hpt), se cambió el medio por DMEM-RS, se incubó por 48 hpt para proceder con la infección de RRV a una MOI de 3 y evaluar el tratamiento seleccionado (progenie viral, western blot y extracción de RNA) a las 12 hpi, retirando el medio de incubación. Como control se utilizó un RNA interferente dirigido contra una secuencia sin blanco en el genoma celular (Irre) <sup>30</sup>.

En el caso de la interferencia de células MA104 para aislar partículas virales, se partió de un formato de una placa de 6 pozos y no se retiró el medio de incubación.

siRNA	Proveedor	No. catálogo	Concentración usada
siMETTL3	Dharmacon siGENOME	M-005170-01-0005	2 $\mu\text{M}$
siMETTL14	Dharmacon siGENOME	M-014169-00-0005	1 $\mu\text{M}$
siFTO	Dharmacon siGENOME	M-004159-01-0005	2.5 $\mu\text{M}$
Irre	Dharmacon siGENOME	D-001210-04-50	2.5 $\mu\text{M}$

Tabla 2 | siRNAs utilizados para el silenciamiento por transfección reversa.

#### **4.5 Determinación de progenie viral por rendimiento viral**

Las células silenciadas por transfección reversa, se infectaron con lisado viral activado de RRV a una MOI de 3. A las 12 hpi, las células se lisaron con un Buffer de Lisis compuesto de Tritón 0.1%, NaCl 150 mM, Tris 50 mM pH=8 y tres ciclos de congelado-descongelado. Una vez activado con tripsina, el virus presente en este lisado viral se cuantificó mediante el ensayo de focos peroxidados descrito anteriormente <sup>30</sup>.

#### **4.6 Western blot**

Para verificar la eficiencia de los silenciamientos se hicieron ensayos de Western blot. En esta técnica, la monocapa de células silenciadas se lisó añadiendo Buffer de Carga (SDS 1.6%, Glicerol 0.1%, Tris 0.1 M, Azul de bromofenol 0.008% y  $\beta$ -mercaptoetanol 0.0016%) a los pozos de células. Las proteínas presentes en el lisado se hirvieron 5 min antes de correrlas por PAGE. Las muestras y el marcador de peso molecular preteñido (Thermo Scientific #26616) se cargaron en un gel SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF <sup>30</sup>. La membrana se incubó por 1h en PBS con leche al 5% y se dejó toda una noche a 4°C en el anticuerpo primario deseado (Tabla 3). Posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario  $\alpha$ -conejo acoplado a peroxidasa 1:5000 por 1h a temperatura ambiente o bien, con el anticuerpo de cabra  $\alpha$ -conejo acoplado a Alexa Fluor® 647. Se utilizó el sistema de detección Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent *Plus* (Perkin Elmer #NEL103E001EA) como sustrato de peroxidasa basado en luminol y se reveló con placas Carestream por autoradiografía o con el scanner LI-COR C-Digit por quimioluminiscencia. Al utilizar Alexa Fluor® 647 se usó el scanner de fluorescencia Typhoon (GE Healthare) <sup>30</sup>.

Anticuerpo	Proveedor	No. catálogo	Dilución utilizada
$\alpha$ -METTL3	Novus Biologicals	NB100-77310	1:2000
$\alpha$ -METTL14	Novus Biologicals	NBP1-79389	1:2000
$\alpha$ -FTO	Novus Biologicals	NB110-60935	1:2000

Tabla 3 | **Anticuerpos contra proteínas celulares utilizados en western blot.**

#### 4.7 Extracción de RNA

Monocapas de células confluentes en un formato de placa de 48 pozos, se extrajeron agregando 100  $\mu$ L de Trizol (Invitrogen #15596026). Posteriormente, se añadieron 60  $\mu$ L de cloroformo y se centrifugó a 13, 500 rpm por 15 minutos a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregó un volumen de isopropanol para centrifugar a 13, 500 rpm por 15 minutos a 4°C. El botón se lavó con 100  $\mu$ L de etanol 75% y se centrifugó con las condiciones ya mencionadas. El precipitado se dejó secar y se resuspendió en agua libre de RNAsas para ser cuantificado en el NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) <sup>31</sup>. Las muestras de RNA transcrito *in vitro*, RNA de células MA104 infectadas con RRV y dsRNA fueron proporcionadas por M. en C. Joaquín Moreno Contreras.

#### 4.8 Dot blot

Habiéndose extraído el RNA por el método descrito, las muestras se calientan por 10 minutos a 65°C y se colocan en hielo por 5 minutos. Una vez puesta la membrana de Nylon (Amersham Hybond-N, GE Healthcare) en el aparato BioDot (BioRad), se colocan 5  $\mu$ L de la muestra, se sella la cámara con parafilm y se genera vacío durante 30 minutos o hasta que se seque la gota. Posteriormente, se entrecruza la membrana con luz UV (12x100  $\mu$ Joules, 10 segundos) tres veces por ambos lados y se incuba con leche 5%

en PBS toda la noche. Utilizando el anticuerpo primario  $\alpha$ -m<sup>6</sup>A (BioVision, #6653-100) 1:1000 en PBS con leche al 5% se incubó durante toda la noche. Por último, a la membrana se le añade  $\alpha$ -conejo acoplado a peroxidasa 1:7500 en PBS con leche al 5% 1h a temperatura ambiente y se revela por quimioluminiscencia con Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer #NEL103E001EA) en el scanner LI-COR C-Digit <sup>32</sup>.

#### 4.9 RT-PCR cuantitativa en tiempo real

A partir del RNA previamente extraído, se sintetizó el cDNA utilizando el kit de la transcriptasa reversa del Virus de Leucemia Murina de Moloney (Invitrogen #28025-013) con el oligonucleótido reverso de NSP4 (Tabla 4) <sup>33</sup>. El producto obtenido se amplificó por PCR cuantitativa en el equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) con el kit RealQ Plus 2x Master Mix Green, without ROX™ (Ampliqon #A323402), siguiendo el protocolo indicado y los oligonucleótidos Fwd y Rev de NSP4 <sup>33</sup>. Para la normalización se utilizaron oligonucleótidos del rRNA 18S (tabla 4) <sup>33</sup>. Los cambios relativos de expresión del gen se calcularon con el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak) <sup>34</sup> y se normalizaron contra la amplificación del gen 18S rRNA <sup>33</sup>.

Gen	Oligonucleótido reverso	Oligonucleótido directo
NSP4	5'- GAGCAATCTTCATGGTTGGAA -3'	5'-TCCTGGAATGGCGTATTTTC-3'
18S rRNA	5'- GCATCGTTTATGGTCGGAAC-3'	5'- CGAAAGCATTGCCAAGAAT-3'

Tabla 4 | **Secuencias de oligonucleótidos utilizados para RT-PCR cuantitativa en tiempo real** <sup>33</sup>.

#### **4.10 Tinción de plata para electroforesis de RNA**

Para visualizar el patrón electroforético del RNA viral, se diluyeron 500 ng de cada muestra de RNA con Buffer de Carga (Tris base 0.26 M, EDTA 0.1 M, SDS 1%, NaCl 0.68 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 1.3 % en agua) y se corrieron en un gel de PAGE. A continuación, se sumergió el gel en solución fijadora (Etanol 9.8% con ácido acético al 0.2% en agua) por 30 minutos en agitación para luego retirarla y agregar  $\text{AgNO}_3$  0.18% por otros 30 minutos. Una vez que se lavó el gel dos veces con agua destilada, se añadió solución reveladora (NaOH 0.7 M y formaldehído 0.304 % diluido en agua), agitándolo hasta que las bandas fueron visibles. Para detener la reacción se adicionó ácido acético 10% y se lavó exhaustivamente el gel con agua <sup>35</sup>.

#### **4.11 Análisis estadístico**

La diferencia significativa se realizó con un análisis distribución de t de student para cada par de datos, usando el programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.).

#### **4.12 Análisis densitométrico**

Se utilizó el programa Image J (NIH) para cuantificar por densitometría óptica las bandas o puntos obtenidos en los ensayos de western blot, electroforesis de RNA o dot blot, respectivamente.

---

## 6. RESULTADOS

Se sabe que el RNA puede sufrir distintas modificaciones químicas que alteran su estabilidad y para el caso del mRNA, la N6-metiladenosina es la más abundante en cuanto a bases internas del RNA se trata. Hasta ahora, se ha descrito que los mRNAs de virus de DNA, de los retrovirus y de virus de RNA de cadena positiva y negativa son susceptibles a esta modificación (Tabla 1). No obstante, se desconoce algún trabajo que haya planteado la posibilidad de encontrar a N6-metiladenosina ( $m^6A$ ) en el RNA de algún virus de dsRNA. En nuestro laboratorio trabajamos con rotavirus, el cual pertenece a la familia *Reoviridae*, cuenta con once segmentos de dsRNA y su replicación es citoplásmica. Dado lo anterior, quisimos investigar sobre el efecto que N6-metiladenosina pudiera tener en el ciclo replicativo de rotavirus.

### 6.1 La producción de la progenie viral de RRV es regulada por METTL3, METTL14 y FTO

Como primer acercamiento, se determinó si la  $m^6A$  afecta la replicación de rotavirus en células susceptibles y permisibles. Para ello, se silenciaron mediante RNA de interferencia (RNAi) algunas de las proteínas de la maquinaria de metilación: las metiltransferasas, METTL3 y METTL14, y la desmetilasa FTO transfectando RNAs pequeños de interferencia (siRNA) en células MA104 que posteriormente se infectaron con RRV para evaluar la progenie viral producida a las 12 hpi en ausencia de las proteínas mencionadas. En las células en que METTL14 fue silenciada, se observa un aumento de aproximadamente dos veces en el rendimiento viral (Figura 8a); mientras que al interferir a METTL3 hubo una ligera disminución de la progenie viral comparada

con el tratamiento del siRNA Irrelevante (Figura 8a). Interesantemente, el silenciamiento de la desmetilasa FTO disminuyó el rendimiento viral relativo al control en, aproximadamente, 50% (Figura 8a). En todos los tratamientos se realizó un western blot para confirmar que la expresión de las proteínas silenciadas disminuyera respecto al control (Figura 8b). Además, la transfección reversa de siRNAs no afectó la viabilidad celular, ya que se observó que en todos los tratamientos las células crecieron a confluencia a las 48 hpt. Con esto, se puede afirmar que la metiltransferasa de m<sup>6</sup>A, METTL14, modula negativamente la replicación de RV mientras que la desmetilasa de m<sup>6</sup>A, FTO, regula positivamente la infección por RV.

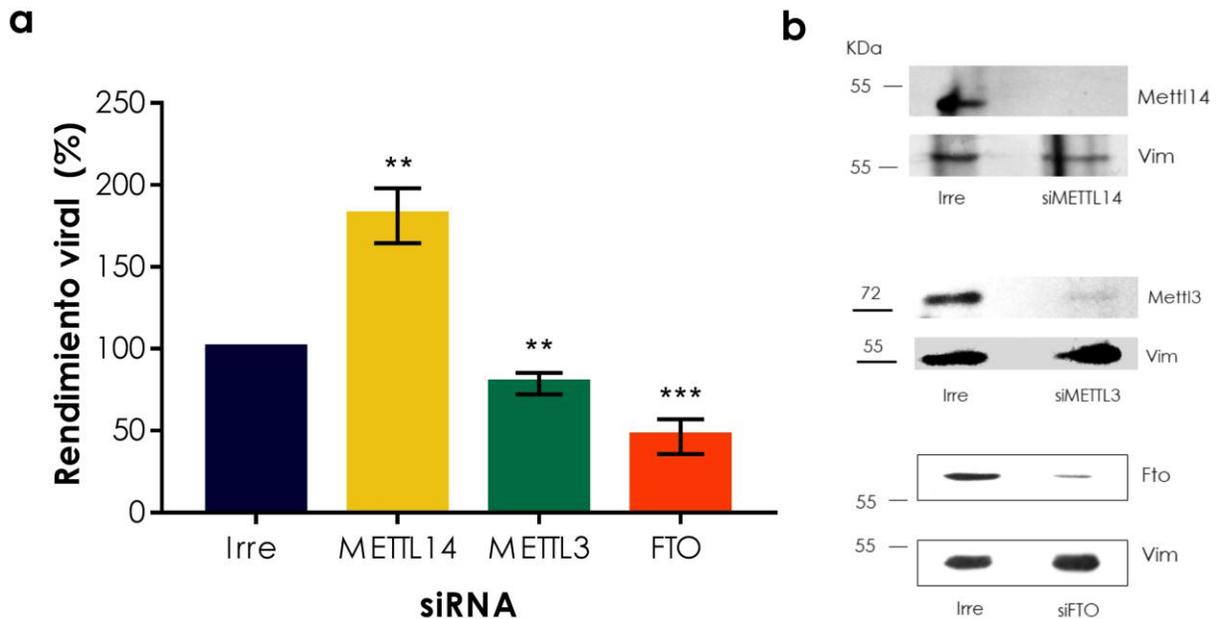


Figura 8 | **La maquinaria de m<sup>6</sup>A modula la producción progenie viral infecciosa de RRV.**

**a** | Progenie viral de RRV producida por células MA104 a las 12 hpi después de un tratamiento con siRNAs. Los datos están presentados como el porcentaje del título viral relativo al tratamiento con el siRNA control (Irre). n=3, \*p<0.05 por t de Student no pareada. **b** | Inmunoblots representativos de extractos de células MA104 infectadas con RRV a las 12 hpi y tratadas con siRNAs. Vimentina se ocupó como control de carga en cada caso.

Posteriormente, evaluamos la presencia de N6-metiladenosina en el RNA total de células infectadas con RRV e interferidas con siMETTL3, siMETTL14 y siFTO por medio de un dot blot usando un anticuerpo anti-N6-metiladenosina, para saber si la variación contemplada en el rendimiento viral (Figura 8a) estaba relacionada con un cambio en la expresión de m<sup>6</sup>A. Como se muestra en la Figura 9, N6-metiladenosina aumenta cuando FTO es reducida, siendo el mismo caso con el silenciamiento de las metiltransferasas. De esta manera, se indica una clara participación de la maquinaria de metilación en la expresión de m<sup>6</sup>A durante una infección con rotavirus.

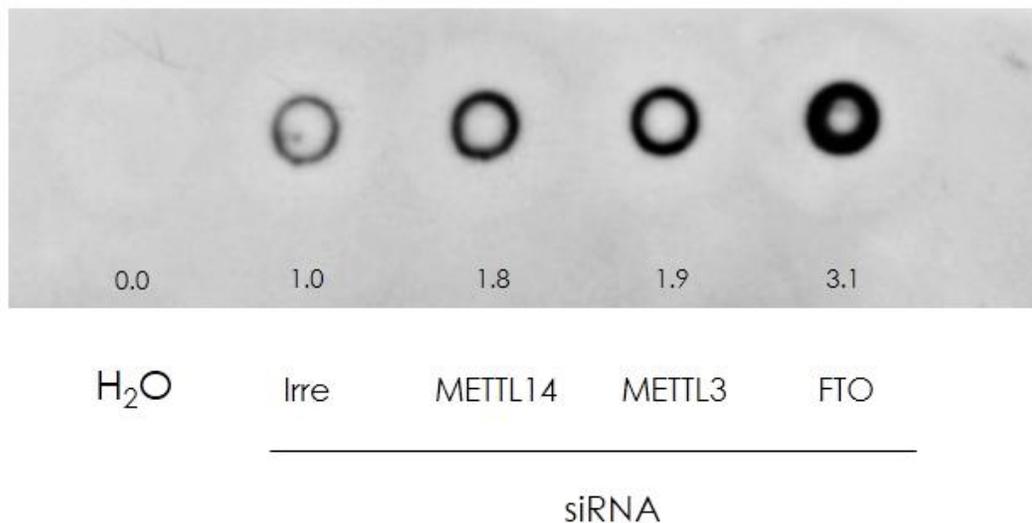


Figura 9 | **Las metiltransferasas y la desmetilasa FTO incrementan la expresión de m<sup>6</sup>A en células infectadas con RRV.** Contenido de m<sup>6</sup>A en el RNA extraído de células MA104 e infectadas con RRV a las 12 hpi, previo tratamiento con siRNAs. La fracción fue cuantificada, diluída, cargada en un dot blot e incubada con anticuerpo anti-m<sup>6</sup>A. En el análisis por densitometría (Image J), se cuantificó la señal relativa al tratamiento control (Irre) indicada con números en la parte inferior del blot. El control negativo utilizado fue H<sub>2</sub>O libre de RNAsas.

## **6.2 Contrario a la interferencia de METTL14, METTL3 y FTO; la expresión de la maquinaria de m<sup>6</sup>A no se afecta por la infección con RRV.**

Considerando que tanto el rendimiento viral de rotavirus como la cantidad de N6-metiladenosina cambian al silenciar a METTL14, METTL3 y FTO (Figura 8 y 9), quisimos investigar si había una diferencia en la expresión de proteínas virales debida al tratamiento con los siRNAs. Como se muestra en la figura 10, en los inmunoblots de extractos de células interferidas con siMETTL14, siMETTL3 o siFTO e infectadas con RRV (paneles a, b y c, carriles 5-6) no se presentó alguna variación significativa en la expresión de proteínas estructurales que reconoce el anticuerpo anti-TLPs (*i.e.* VP4, VP6 y VP7), equiparando los resultados obtenidos con el tratamiento control y normalizando con el control de carga, Vimentina. De esta forma, la regulación del ciclo replicativo de RV por la maquinaria de m<sup>6</sup>A no involucra una alteración importante en la cantidad de proteínas virales estructurales codificadas en los segmentos 4, 6 y 9.

Asimismo, se propuso averiguar si la expresión de la maquinaria de m<sup>6</sup>A cambiaba al haber una infección con RRV o inclusive, al silenciar a las metilasas y la desmetilasa. Durante la infección con RRV se mantuvieron constantes los niveles de METTL3, METTL14 o de FTO (Figura 10, carriles 1 y 2 con 5 y 6), lo que sugiere que la síntesis de la maquinaria de m<sup>6</sup>A no cambia significativamente durante la infección. En contraste con lo ya mencionado, METTL14 disminuyó en todos los silenciamientos probados (Figura 10a) y, análogamente, al interferir METTL14 la expresión de METTL3 se redujo (Figura 10b, carril 3 y 7). Con esto, asumimos una dependencia de METTL14 con la maquinaria de m<sup>6</sup>A y una estrecha relación en la síntesis de ambas metiltransferasas que componen el complejo de N6-metilación de adenosinas, aunque no podemos

descartar el hecho de que los siRNAs usados puedan interferir una secuencia en común de METTL14 y METTL3. Cabe destacar que el silenciamiento de las metiltransferasas no afectó la cantidad de FTO (Figura 10c).

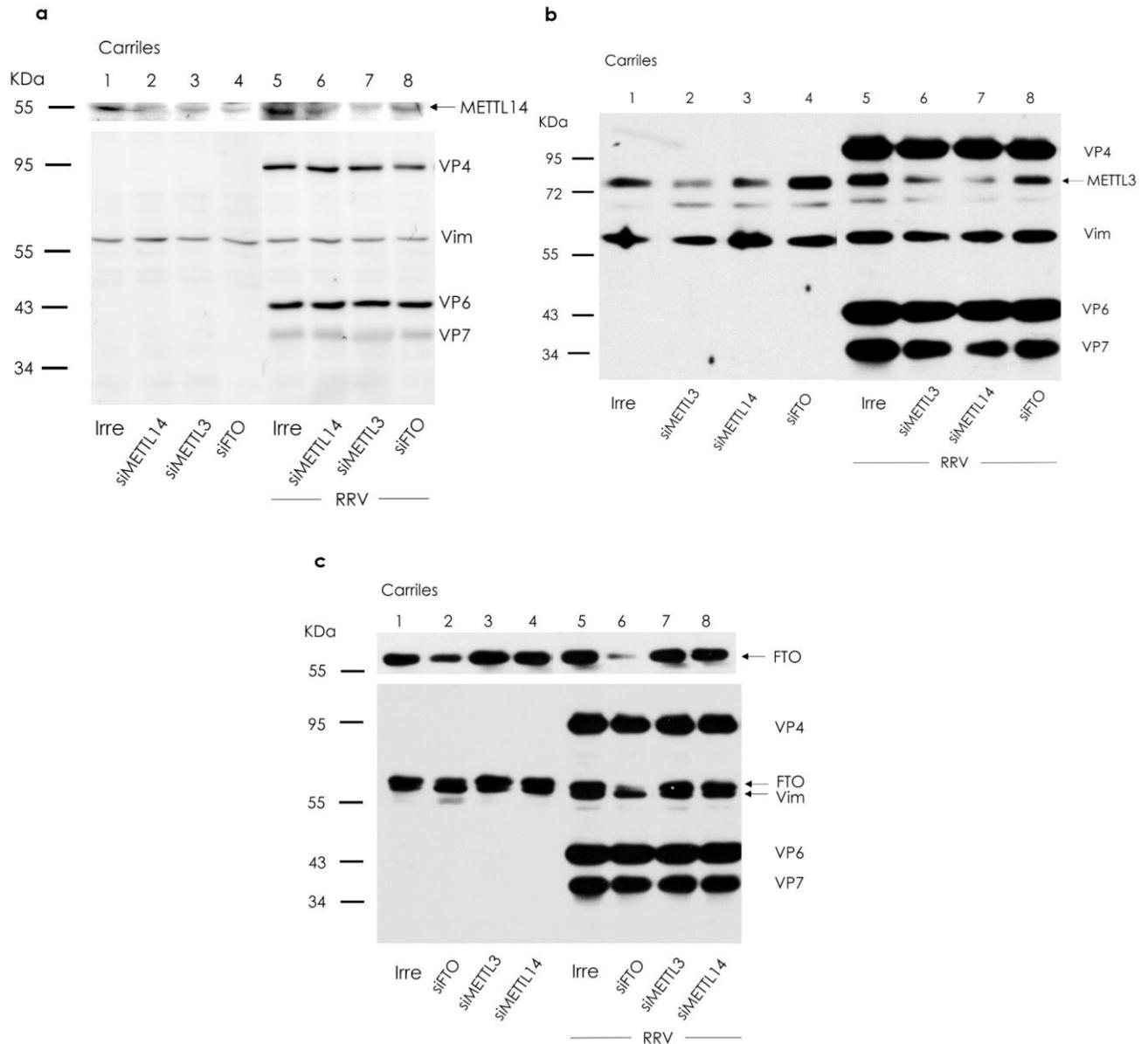


Figura 10 | **Expresión de la maquinaria de m<sup>6</sup>A y proteínas estructurales de RRV durante el silenciamiento de METTL14, METTL3 y FTO.** Extractos de células MA104 infectadas o no con RRV a las 12 hpi y tratadas con siMETTL14, siMETTL3 y siFTO. Irre se utilizó como siRNA control y Vimentina como control de carga. En ninguno de los experimentos se obtuvo una diferencia significativa en la cantidad de proteínas virales VP4, VP6 y VP7. **a** | Inmunoblot de los extractos incubados con anti-Mett14 (52 kDa), anti-TLPs y anti-Vimentina. Se observa una disminución de METTL14 en todos los silenciamientos. **b** | Inmunoblot de los extractos incubados con anti-METTL3 (70 kDa), anti-TLPs y anti-Vimentina. Cuando METTL14 es reducida, METTL3 también lo es. **c** | Inmunoblot de los extractos incubados con anti-FTO (58 kDa), anti-TLPs y anti-Vimentina (57 kDa). FTO únicamente disminuye cuando se interfiere con siFTO.

### **6.3 El RNA viral aumenta con el silenciamiento de METTL3, METTL14 y FTO**

Nuestro siguiente objetivo fue determinar si el incremento o la disminución de la progenie viral producida (Figura 8) se debía a un cambio en la cantidad de mRNA viral producido a las 12 hpi en células interferidas. Así, procedimos a extraer RNA de células en las que METTL3, METTL14 y FTO fueron silenciadas e infectadas con RRV para realizar una cuantificación relativa de la cadena positiva del segmento 10 del genoma de rotavirus, el cual codifica para NSP4, respecto a los transcritos del rRNA 18S (gen tipo housekeeping) por RT-qPCR. En este sentido, la cantidad de mRNA viral del segmento 10 aumentó aproximadamente 2 veces cuando las metiltransferasas fueron silenciadas y sorprendentemente, incrementó 4 veces al interferir FTO (Figura 11a).

Para asegurarnos que lo anterior no sucedía únicamente en la cadena positiva del gen 10, sino en los demás segmentos de dsRNA, se realizó una electroforesis del RNA viral de células interferidas y se procedió a una tinción con nitrato de plata. En la figura 11b se puede apreciar, cualitativamente, que la cantidad de dsRNA viral aumenta durante un silenciamiento con siFTO. Por lo tanto, se sugiere que las metiltransferasas, METTL3 y METTL14, y, principalmente, la desmetilasa FTO podrían actuar negativamente en la producción de RNA viral durante una infección con rotavirus. Es importante señalar la concordancia de este resultado con la modulación negativa de METTL14 en la producción de progenie viral (Figura 8); aunque pareciera contraponerse a la regulación positiva de FTO en la replicación de RV (Figura 8).

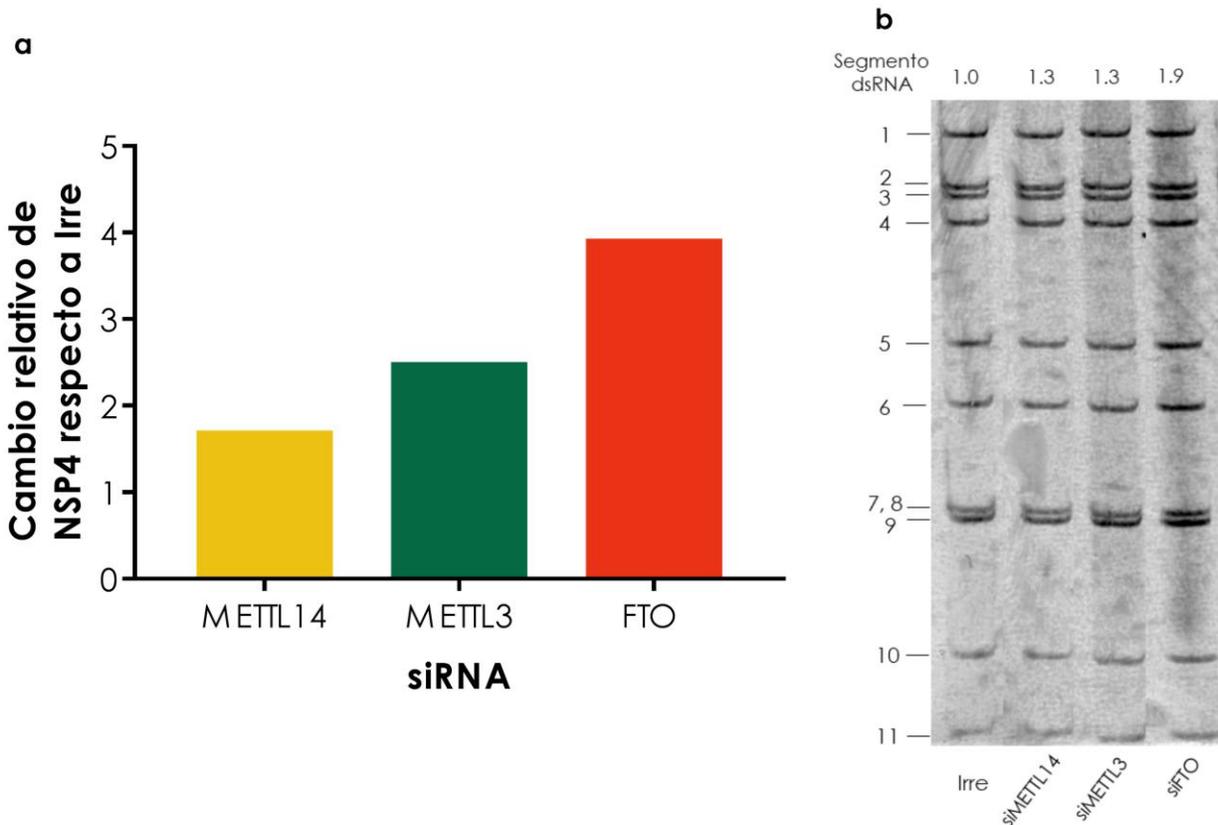


Figura 11 | **El RNA de RRV aumenta con el silenciamiento de la maquinaria de m<sup>6</sup>A.**

**a** | Análisis por RT-qPCR de la cadena positiva del segmento 10 del dsRNA de RRV que codifica para NSP4. El RNA fue extraído de células interferidas con los siRNAs correspondientes e infectadas con RRV (12 hpi). Los datos obtenidos fueron normalizados con la cantidad de rRNA 18S (housekeeping) y expresados como el cambio relativo del segmento 10 respecto al tratamiento con el siRNA control (Irre), que representa 1. **b** | Tinción de plata para la electroforesis de los segmentos de dsRNA de RRV. Al igual que en el panel a, el RNA total fue aislado de células infectadas con RRV a las 12 hpi previo tratamiento con siRNAs. En la parte superior de cada carril se muestra el cambio relativo promedio de las bandas respecto a Irre.

#### **6.4 La infectividad de las partículas virales aisladas de células transfectadas con siFTO disminuye**

Dado que cuando se silencia FTO la cantidad de RNA viral en la célula aumenta, pero la cantidad de partículas virales infecciosas que se producen es aún menor que en las células control, es posible que haya algún mecanismo que impida la formación de partículas virales maduras. Dos posibles eventos podrían estar sucediendo: 1) que se produzcan menos partículas infecciosas o 2) que se produzca la misma (o inclusive una mayor) cantidad de partículas virales, pero que sean menos infectivas. Para probar esta premisa, se silenció FTO y a las 12 hpi se aislaron las partículas virales de RRV por ultracentrifugación con colchón de sacarosa al 40%, previo tratamiento con Freón. Una vez que se separaron las partículas virales, se cuantificó la cantidad de proteína total y por western blot se analizó la cantidad de proteína viral de VP4, VP6 y VP7 para después evaluar la infectividad de las partículas aisladas. La figura 12a indica que la cantidad de VP4 y VP7 disminuye ligeramente en las partículas virales producidas por células tratadas con siFTO y que la infectividad de éstas (Figura 12b) es menor, lo que sugiere que hay una posible disminución en la eficacia del empaquetamiento que esté afectando la infectividad de los viriones de RRV.

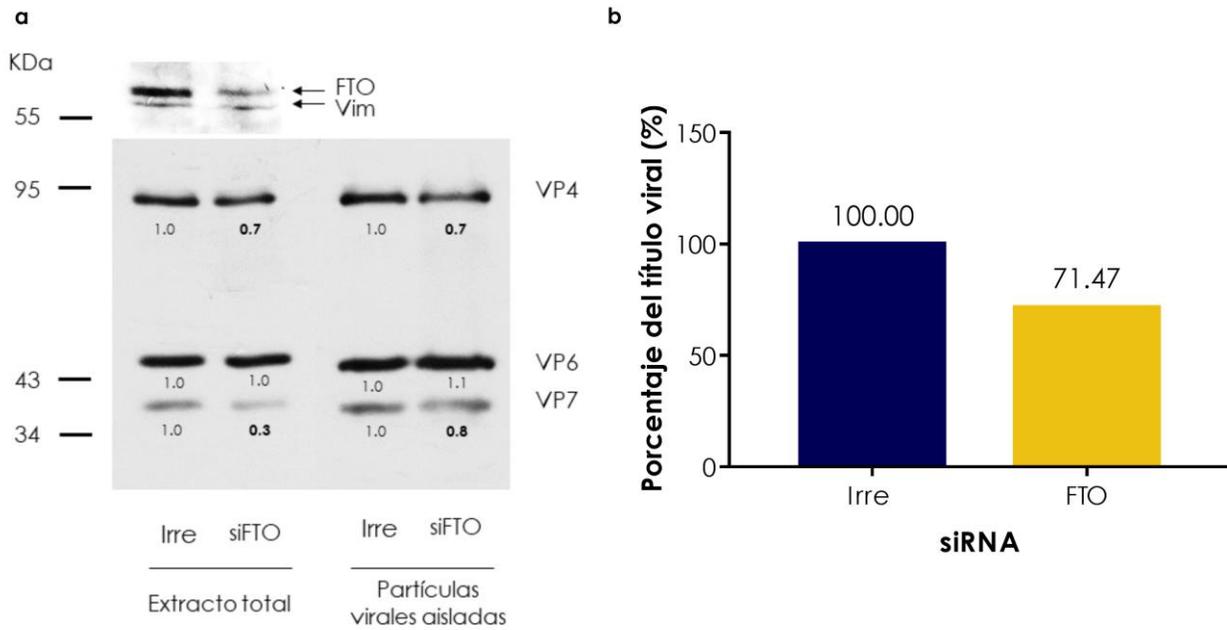


Figura 12 | **FTO actúa negativamente en la producción de partículas virales infecciosas de RRV.** **a** | Análisis del inmunoblot de partículas virales de RRV aisladas de células interferidas con siFTO a las 12 hpi. Del extracto total, se confirmó el silenciamiento de FTO. Al separar las partículas virales por colchón de sacarosa, la proteína del extracto viral se cuantificó y se cargó la misma cantidad de proteína total en cada carril. La cantidad de proteína viral de la capa externa (VP4 y VP7) e intermedia (VP6) se cuantificó por densitometría (Image J) y se normalizó respecto al tratamiento con el siRNA Irrelevante. **b** | Infectividad de las partículas virales de RRV aisladas de células interferidas con siFTO a las 12 hpi. n=1.

#### **6.4 N6-metiladenosina disminuye en una infección con RRV, aunque el RNA de los viriones de RRV no contiene m<sup>6</sup>A**

Teniendo en cuenta que la maquinaria de m<sup>6</sup>A modula la infección por rotavirus de distintas maneras, procedimos a investigar si el RNA viral contenido en partículas de rotavirus estaba modificado con N6-metiladenosina. Para esto, se aislaron partículas virales por colchón de sacarosa 40%, se extrajo el RNA viral y se llevó a cabo un ensayo de dot blot utilizando RNA en diferentes condiciones (Figura 13). En este experimento, si bien se pudo comprobar la especificidad del anticuerpo al reconocer al RNA celular con m<sup>6</sup>A y no al RNA sin modificaciones (RNA sintetizado *in vitro*), no se obtuvo señal de m<sup>6</sup>A en el pozo que contenía el RNA aislado de partículas virales ni con el dsRNA de RRV. Para descartar que esta ausencia en el reconocimiento de m<sup>6</sup>A en el RNA de partículas virales de RRV se debiera a una baja cantidad de RNA viral, se probaron distintas cantidades (50 ng – 4 µg) del RNA de partículas aisladas en un dot blot y en ningún caso se observó señal de m<sup>6</sup>A.

Interesantemente, la cantidad de m<sup>6</sup>A es menor en el RNA de células infectadas con RRV comparado con el RNA de células MA104 (Figura 13), por lo que se podría señalar que la N6-metiladenosina disminuye durante una infección con RRV.

Lo previamente descrito está estrechamente relacionado con la regulación positiva de la desmetilasa FTO en la infección viral, puesto que la m<sup>6</sup>A disminuye durante el ciclo replicativo de RRV y los viriones producidos no contienen m<sup>6</sup>A.

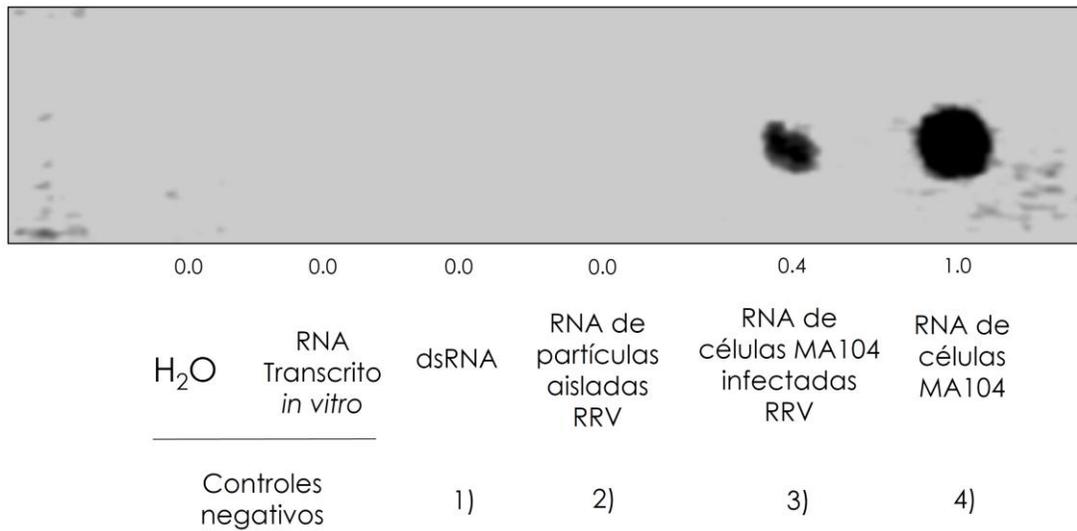


Figura 13 | **N6-metiladenosina no está presente en el RNA de los viriones de RRV y disminuye durante la infección.** Dot blot con 1 µg de 1) dsRNA de RRV, RNA extraído de 2) partículas de RRV aisladas, 3) células MA104 infectadas con RRV a una MOI de 3 y 4) células MA104. Como controles negativos se utilizó el RNA de RRV transcrito *in vitro* y H<sub>2</sub>O libre de RNAsas. Los números en la parte inferior del dot blot hacen referencia a la cuantificación relativa (Image J) de la señal obtenida por el anticuerpo anti-m<sup>6</sup>A, utilizando como referencia el RNA de células sin infectar.

---

## 7. DISCUSIÓN

El papel de la N6-metiladenosina en las relaciones virus-hospedero se empezó a demostrar en años muy recientes con el mapeo de sitios m<sup>6</sup>A en el RNA viral y las posibles interacciones con las proteínas de la maquinaria de m<sup>6</sup>A. Este avance nos brindó información sobre cómo el RNA viral puede estar involucrado en la respuesta de las proteínas celulares, o incluso las virales, que reconocen a m<sup>6</sup>A para favorecer o inhibir la infección <sup>28,29,27,36,37</sup>.

En el caso de virus de RNA y replicación citoplásmica, tenemos el ejemplo de HCV en el cual la presencia de m<sup>6</sup>A en el RNA viral regula negativamente la producción de partículas (Figura 7b). Ya sea viéndolo desde un enfoque en el que, al silenciar metiltransferasas, la tasa de producción de partículas virales infecciosas incrementa o bien, teniendo el efecto opuesto al silenciar a las desmetilasas FTO y ALKBH5, esto sin afectar la replicación del RNA viral <sup>29</sup>.

Así, en nuestro estudio evaluamos la participación de algunas enzimas celulares encargadas de la metilación de adeninas en m<sup>6</sup>A y encontramos que éstas modulan similarmente el ciclo replicativo de RRV como el de HCV. La reducción de la desmetilasa FTO altera la infección de RRV al restringir la producción de partículas virales infecciosas (Figura 12), tal como se describió para HCV <sup>29</sup>. La diferencia con RRV radica en que la cantidad de RNA viral de cadena positiva incrementa hasta 4 veces (Figura 11a). En este caso, podríamos estar hablando de un problema en el ensamblado de las partículas en el que se fabriquen menos TLPs y por consecuencia, las partículas liberadas sean menos infectivas. De hecho, sabemos que la m<sup>6</sup>A disminuye durante la infección con RRV (Figura 13) por lo que es congruente que durante la replicación viral se necesite la

actividad de N6-desmetilación de adenosinas por FTO. En el caso de que la metilación m<sup>6</sup>A actúe directamente sobre el RNA viral durante el ciclo replicativo en la célula y ésta fuese de alguna manera deletérea para la replicación viral, la participación de FTO sería muy clara al revertir la adición de m<sup>6</sup>A y permitir que únicamente el dsRNA sin N6-metiladenosina sea empaquetado adecuadamente; del mismo modo que se describió para la replicación citoplásmica de HCV <sup>29</sup>.

Por otro lado, encontramos que las metiltransferasas METTL3 y METTL14 participan de distintas maneras en la producción de viriones de RRV, pues mientras la disminución de METTL3 causa un ligero decremento en la progenie viral producida por RRV, la interferencia de METTL14 tiene un efecto notoriamente opuesto (Figura 8). A pesar de esta diferencia en su actividad, ambos silenciamientos incrementan la cantidad de RNA viral (Figura 11a). Lo anterior nos da las bases para sugerir que, aunque estas metiltransferasas operan de forma conjunta <sup>19</sup>, las distintas actividades de cada una podrían estar variando el patrón de m<sup>6</sup>A en los transcritos modificados. Sabiendo que METTL3 es la proteína con la actividad catalítica en el complejo <sup>18</sup> y METTL14 la que induce cambios alostéricos en METTL3 y reconoce los mRNAs blancos <sup>19</sup>, podríamos explicar los efectos tan distintos que hay incluso en un co-silenciamiento de METTL14 y METTL3, esto aunado a las modificaciones post-traduccionales a las que se ha sugerido ambas pueden ser susceptibles <sup>18,19</sup>.

Aún no hemos determinado si en algún momento de la infección el RNA de RRV llegue a contener m<sup>6</sup>A, como se ha encontrado en diversos virus de DNA, HIV-1 y de la familia *Flaviviridae* (Tabla 1). En el caso particular de los viriones de HCV, su genoma no está modificado; pero una vez que entra a la célula, las metiltransferasas actúan en 16 sitios

por todo el (+) RNA viral <sup>29</sup>. Igualmente, queda por averiguar si la baja en la cantidad de m<sup>6</sup>A que observamos en una infección con RRV (Figura 13) es debida a un efecto directo sobre el RNA viral o indirecto sobre genes relacionados con la respuesta inmune antiviral; análogamente a lo que sucede en una infección por ZIKV, en la cual se añaden nuevos sitios de m<sup>6</sup>A y otros se pierden, principalmente en genes relacionados con el sistema inmune <sup>36</sup>.

Si bien observamos un aumento en la cantidad de N6-metiladenosina cuando silenciamos la maquinaria de m<sup>6</sup>A (Figura 9), queda por determinar si este cambio se debe a que más genes contienen m<sup>6</sup>A, si es por una baja en la degradación de los transcritos modificados o bien, si los sitios susceptibles a m<sup>6</sup>A aumentan.

Aunque aún no sabemos el mecanismo por el cual la m<sup>6</sup>A está modulando la infección por RRV, nos queda claro que la maquinaria de m<sup>6</sup>A tiene un efecto importante en la replicación citoplásmica de este virus de dsRNA. Sintetizando lo hasta ahora expuesto, entendemos que, haciendo uso de la maquinaria celular para obtener una replicación efectiva, fenómeno que caracteriza a estos parásitos intracelulares obligados, aparentemente la desmetilación inducida por FTO es necesaria para que se produzcan partículas virales infecciosas de RRV; lo cual nos lleva a aceptar la hipótesis planteada en este trabajo de investigación.

## 8. CONCLUSIONES

- FTO regula positivamente la infección por RRV, probablemente al hacer más eficiente la producción de las partículas virales.
- METTL14 afecta negativamente la replicación de RV.
- La participación de METTL3 en la replicación de RRV difiere a la de METTL14, existiendo la posibilidad de que ambas tengan actividades individuales diferentes a las del complejo de m<sup>6</sup>A.
- La maquinaria de N6-metiladenosina (METTL3, METTL14 y FTO) no altera de manera importante la expresión de proteínas virales estructurales VP4, VP6 y VP7.
- METTL14, METTL3 y FTO modulan negativamente a N6-metiladenosina en el contexto de una infección con RRV.
- N6-metiladenosina disminuye durante el ciclo replicativo de RRV.
- El genoma de las partículas virales de rotavirus no contiene N6-metiladenosina.

---

## 9. PERSPECTIVAS

- Determinar si el genoma de RRV es modificado en algún paso del ciclo replicativo. Debido a que no encontramos N6-metiladenosina en el RNA de partículas aisladas, no descartamos la posibilidad de que el RNA viral pueda ser susceptible a la N6-metilación de adenosinas una vez dentro de la célula. Para esto, se puede extraer el RNA de células infectadas o no con RRV y realizar una secuenciación con Me-RIP (Methylated RNA Immunoprecipitation) con un anticuerpo anti- m<sup>6</sup>A<sup>38</sup>.
- Analizar el papel de las proteínas de unión a m<sup>6</sup>A (YTHDF1-3) y la desmetilasa ALKBH5, ya que en este trabajo únicamente se analizaron las metiltransferasas METTL14, METTL3 y la desmetilasa FTO.
- Así como observamos una disminución de m<sup>6</sup>A en el RNA de células infectadas con RRV, se puede estudiar la abundancia y distribución de m<sup>6</sup>A en los transcritos celulares con un análisis metagenómico del epitranscriptoma celular e identificar los genes que ganan o pierden modificaciones de m<sup>6</sup>A<sup>36</sup>.
- Investigar la localización subcelular de la maquinaria de m<sup>6</sup>A y establecer si coincide con alguna estructura viral, como el viroplasma de RV, o con algún elemento viral, como el dsRNA.

---

## REFERENCIAS

1. Troeger, C. *et al.* Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect. Dis.* **3099**, 909–948 (2017).
2. World Health Organization. Rotavirus vaccines WHO position paper - January 2013. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **88**, 49–64 (2013).
3. Crawford, S. E. *et al.* Rotavirus infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 17083 (2017).
4. Estes, M. K. & Greenberg, H. B. Rotaviruses. *Fields Virology* 1247–1395 (2013). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
5. Gastanaduy, P. A. *et al.* Effect of Rotavirus Vaccine on Diarrhea Mortality in Different Socioeconomic Regions of Mexico. *Pediatrics* **131**, e1115–e1120 (2013).
6. CDC & Palmer, E. Ultrastructural morphology of rotavirus particles. *Public Health Image Library(PHIL)* (1978).
7. Mossel, E., Estes, M. & Ramig, F. dsRNA viruses: Coding assignments and virion locations of rotavirus proteins.
8. Desselberger, U. Rotaviruses. *Virus Res.* **190**, 75–96 (2014).
9. Flint, J., Racaniello, V. R., Rall, G. F. & Skalka, A. M. *Principles of Virology*. (ASM PRESS, 2015). doi:10.1128/9781555818951
10. Trask, S. D., McDonald, S. M. & Patton, J. T. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 165–177 (2012).
11. Silva-Ayala, D. *et al.* Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in rotavirus cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2013). doi:10.1073/pnas.1304932110
12. Fu, Y., Dominissini, D., Rechavi, G. & He, C. Gene expression regulation mediated through reversible m6A RNA methylation. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 293–306 (2014).

13. Roundtree, I. A., Evans, M. E., Pan, T. & He, C. Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. *Cell* **169**, 1187–1200 (2017).
14. Brocard, M., Ruggieri, A. & Locker, N. m6A RNA methylation, a new hallmark in virus-host interactions. *J. Gen. Virol.* **98**, 2207–2214 (2017).
15. Zhao, B. S., Roundtree, I. A. & He, C. Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 31–42 (2016).
16. Maity, A. & Das, B. N6-methyladenosine modification in mRNA: Machinery, function and implications for health and diseases. *FEBS J.* **283**, 1607–1630 (2016).
17. Wu, R., Jiang, D., Wang, Y. & Wang, X. N6-Methyladenosine (m6A) Methylation in mRNA with A Dynamic and Reversible Epigenetic Modification. *Mol. Biotechnol.* **58**, 450–459 (2016).
18. Wang, X. *et al.* Structural basis of N6-adenosine methylation by the METTL3–METTL14 complex. *Nature* **534**, 575–578 (2016).
19. Wang, P., Doxtader, K. A. & Nam, Y. Structural Basis for Cooperative Function of Mettl3 and Mettl14 Methyltransferases. *Mol. Cell* **63**, 306–317 (2016).
20. Gerken, T. *et al.* The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* **318**, 1469–72 (2007).
21. Liu, N. *et al.* N6-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein. *Nucleic Acids Res.* **45**, 6051–6063 (2017).
22. Meyer, K. D. *et al.* 5' UTR m6A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell* **163**, 999–1010 (2015).
23. Xiao, W. *et al.* Nuclear m6A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Mol. Cell* **61**, 507–519 (2016).
24. Ma, H. *et al.* N6 -methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. **161**, 1388–1399 (2016).
25. Cao, G., Li, H.-B., Yin, Z. & Flavell, R. A. Recent advances in dynamic m<sup>6</sup>A RNA modification. *Open Biol.* **6**, 160003 (2016).

26. Gokhale, N. S. & Horner, S. M. RNA modifications go viral. *PLoS Pathog.* **13**, 2–7 (2017).
27. Tirumuru, N. *et al.* N6-methyladenosine of HIV-1 RNA regulates viral infection and HIV-1 Gag protein expression. *Elife* **5**, 1–20 (2016).
28. Kennedy, E. M. *et al.* Posttranscriptional m6A Editing of HIV-1 mRNAs Enhances Viral Gene Expression. *Cell Host Microbe* **19**, 675–685 (2016).
29. Gokhale, N. S. *et al.* N6-Methyladenosine in Flaviviridae Viral RNA Genomes Regulates Infection. *Cell Host Microbe* **20**, 654–665 (2016).
30. Sánchez-tacuba, L. & Rojas, M. RNase L Pathway Using at Least Two Distinct Mechanisms. **89**, 12145–12153 (2015).
31. Inc., T. F. S. TRIzol™ Reagent. **15596018**, (2016).
32. Bio-Rad Laboratories, I. Bio-Dot Microfiltration Apparatus Instruction Manual.
33. Ayala-Breton, C. *et al.* Analysis of the Kinetics of Transcription and Replication of the Rotavirus Genome by RNA Interference. *J. Virol.* **83**, 8819–8831 (2009).
34. QrtvPcr, B. Real-Time PCR Applications Guide. *Methods* 2–4 (2006).
35. Carreño-torres, J. J., Gutiérrez, M., Arias, C. F., López, S. & Isa, P. Characterization of viroplasm formation during the early stages of rotavirus infection. *Virol. J.* **7**, 350 (2010).
36. Lichinchi, G. *et al.* Dynamics of Human and Viral RNA Methylation during Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* **20**, 666–673 (2016).
37. Lichinchi, G. *et al.* Dynamics of the human and viral m6A RNA methylomes during HIV-1 infection of T cells. *Nat. Microbiol.* **1**, 16011 (2016).
38. Helm, M. & Motorin, Y. Detecting RNA modifications in the epitranscriptome: Predict and validate. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 275–291 (2017).