



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE APOBEC3B EN
LÍNEAS CELULARES DE LINFOMA Y SU RELACIÓN CON EL VIRUS
DE EPSTEIN-BARR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

AXEL MENDOZA ORTIZ

DIRECTORA: DRA. ABIGAIL MORALES SÁNCHEZ

ASESOR: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA

CIUDAD DE MÉXICO

Septiembre 2021





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.

Investigación realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT IA204820. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, de la cual formo parte desde nivel preparatoria, y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza en donde me formé como estudiante de licenciatura.

Al Hospital Infantil de México Federico Gómez, específicamente a la Unidad de Investigación en Virología y Cáncer, en donde realicé el servicio social y la tesis.

A mi tutora, la Dra. Abigail Morales Sánchez, por aceptarme en su proyecto y por toda su atención al elaborar este trabajo.

A mi comité de sinodales conformado por el Dr. Benny Weiss Steider, el Dr. Alberto Monroy García, el Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón y a la Dra. María de Lourdes Mora García por su disponibilidad y por todo el apoyo.

Al Dr. Ezequiel Moisés Fuentes Pananá, por sus aportaciones y por recibirme en el laboratorio.

Al Dr. Ulises Martínez Ruiz por su trabajo y apoyo.

Agradecimientos personales

A mi papá, Carlos Mendoza Galeana, por ser la persona más bondadosa y cortés que he conocido y por siempre poner a tu familia antes que cualquier cosa. Por darme el ejemplo de nunca dejarse caer sin importar la circunstancia. Y no podía dejar de agradecerte por todas las clases de música que me das y por siempre presumirme tus pasos de baile.

A mi mamá, Marisela Ortiz Castañeda, por ser un increíble ejemplo de trabajo, dedicación y fortaleza. No sé si conozca a una persona con tu energía y con tus ganas de superarte día con día. Agradezco todas las veces que me llevaste a entrenar desde pequeño y los chismes que contamos.

A mi hermana, Aranza Mendoza Ortiz (o como te gusta que te llame: Maní, McKenzie, Maniac Manu, Patubers, Kent, Brensington, Baby Brent, Fitis, Marciano, etc.). Gracias por ser mi roomie y por todas las risas y pláticas que hemos tenido. Por ser mi compañera de carreras de Fórmula 1 y de ver trailers, películas y series. A pesar de que siempre me viste como un dios, también me has enseñado mucho y eres la mejor hermanita que alguien pudiera tener. Recuerda, mystery bros forever.

A los tres: el padre, la madre y fichis. Agradezco infinitamente todo su amor y apoyo incondicional. No pude haber tenido mejor familia en esta vida.

A mi abuelito Rafael, gracias por inculcarme el amor al deporte y por todas esas pláticas que compartimos desde que estaba chiquito sentado a tu lado, ya sea en la mesa, en la sala o donde fuera. A mi abuelita Lucha, por todas las comidas tan ricas y por consentirme cada sábado que te veía. A mi abuelita Tere, por ser tan cariñosa y por todas las historias que me cuentas, siempre me gusta escucharte. A mi abuelito Rodolfo, por las llamadas que tenemos para discutir los partidos y por pensar en mi cada que comemos juntos y hacerme papas.

A Huguito y mi carnal, por toda la ayuda que siempre me brindaron y por los costales de papa. Gracias también a mi tía Sandra y a mis primos Michelle y Leo.

A toda mi familia en Estados Unidos: a mi tía Norma, tía Sandra, tía Blanca, tío Ernesto, tío Martín y tío Rodolfo. Gracias por todo su amor, apoyo y por siempre recibirme con las puertas abiertas. Y mis primos: Allan, Giovanna, Etu, Chini, Carlitos y Samantha por haber hecho mi niñez sumamente divertida y por seguir haciéndolo cada que tenemos la oportunidad de vernos.

A mis padrinos, Javier y Lourdes, por estar conmigo siempre que los necesité. Yo igual estaré para ustedes.

A la Dra. Abigail Morales Sánchez, por todo su trabajo y paciencia. No conozco a persona más dedicada que usted, y fue un honor el poder haber trabajado bajo su tutoría.

A Liss, por estar en los momentos más felices pero también en los más difíciles. Gracias por todo tu amor y cariño, te quiero mucho 5.

A mis amigos de laboratorio: Moy, Ceci, Yessi, David, Nacho, Eric, Angie, Raúl, Frida, Itha, Miriel, Melissa y Evelia. Por ayudarme y guiarme dentro del laboratorio y por las salidas y risas fuera de él. Y al señor Miguel, por la gran amistad que formé con usted, arriba los falcons.

A mis mejores amigos desde la prepa: Meño, Cako, Chepes, Merengues y Chips. Por todas las anécdotas y hashtags que hemos vivido, y las que nos faltan por vivir.

"If you can dream it, you can do it"

- Jimmy MacElroy

Índice

Resumen	1
Introducción	3
APOBEC3B	3
Linfoma.....	5
El virus de Epstein-Barr	6
Planteamiento del problema	9
Justificación	10
Hipótesis	10
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
Materiales y métodos	11
Cultivo celular	12
Purificación de DNA.....	12
Cuantificación de la carga viral de EBV	13
Purificación de RNA.....	15
RT-qPCR.....	15
Preparación de laminillas para Hibridación <i>in situ</i> (ISH).....	16
Hibridación <i>in situ</i> de EBERs	17
Purificación de proteínas, electroforesis en gel SDS-poliacrilamida y western blot	18
Inducción de ciclo lítico	20
3D-PCR	20
Resultados	23
Discusión	29
Referencias	33
Anexos	35

Resumen

La familia de proteínas APOBEC es conocida por su participación en la inmunidad innata antiviral. Estas proteínas generan mutaciones en el genoma viral que conducen a la inactivación del virus. Las mutaciones son producidas principalmente por la deaminación de citidinas en DNA de cadena simple. De forma interesante, recientemente se ha demostrado que APOBEC3B (A3B), un miembro de la familia con expresión nuclear, es capaz de inducir mutaciones fuera de blanco, es decir en el genoma celular. Debido a lo anterior, A3B es ahora reconocida como una proteína con actividad oncogénica en varios tipos de cáncer que incluyen cáncer de mama, cabeza/cuello, cérvix, vejiga y pulmón.

En este trabajo nos preguntamos si A3B podría estar relacionada a la generación de mutaciones en líneas celulares de linfomas infectadas por el virus de Epstein-Barr (EBV). Realizamos ensayos de RT-PCR y western blot en contextos basales y post-inducción del ciclo lítico de EBV para medir la expresión de A3B en líneas celulares de linfoma a nivel de mensajero y de proteína. También realizamos ensayos de 3D-PCR para evaluar indirectamente posibles mutaciones de C/G a T/A en *cMyc*, un gen altamente relacionado a linfomagénesis.

Encontramos que A3B fue expresada a nivel de mensajero y proteína en las líneas celulares Raji, Daudi, Hs 445, P3HR1 y Namalwa, las cuales son EBV+. Hubo una alta expresión de A3B a nivel de mensajero en Ramos, una línea celular EBV-, pero una baja expresión a nivel de proteína. En las muestras de células mononucleares de sangre periférica de donadores sanos, la expresión de A3B fue prácticamente nula. Estos resultados sugirieron que la expresión de A3B ocurre en linfomas con infección del EBV y no en linfocitos normales. En condiciones post-inducción del ciclo lítico del EBV, hubo un aumento en la expresión de mensajero de A3B en las cinco líneas celulares EBV+. Sin embargo, no detectamos cambios entre la expresión a nivel de proteína en la línea celular Raji después de haber inducido el ciclo lítico del EBV. Mediante ensayos de 3D-PCR observamos que un fragmento del gen *cMyc* pudo ser amplificado a temperaturas de desnaturalización más bajas en las líneas de linfoma EBV+ que en muestras de donadores sanos.

Estos resultados sugieren que la presencia del EBV en líneas celulares de linfoma induce la expresión de A3B tanto a nivel de mensajero como de proteína. La inducción del ciclo lítico del EBV resulta en un aumento en el mensajero pero no de proteína de A3B, lo que indica la presencia de probables mecanismos virales que intervienen en la síntesis o la estabilidad de la proteína. Finalmente, nuestros resultados sugieren que la expresión de A3B puede eventualmente inducir mutaciones en genes relacionados con el progreso a linfoma.

Introducción

APOBEC3B

La enzima APOBEC3B (A3B) pertenece a la familia de proteínas APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like), que se compone de una serie de proteínas con dominios conservados de citidina deaminasa (CDAs). Esta familia consta de 11 miembros que incluyen a la deaminasa inducida por la activación (AID), APOBEC1 (A1), A2, A3A, A3B, A3C, A3D, A3F, A3G, A3H y A4 [1].

Su función biológica fue caracterizada por primera vez con el descubrimiento de A1, que es responsable de la edición del mRNA de la apolipoproteína B (apoB) que afecta al metabolismo y transporte de lípidos [2].

Las enzimas de la subfamilia de A3, participan en la inmunidad innata restringiendo infecciones virales. Modelos evolutivos predicen que las proteínas A3 han desempeñado un papel importante en la respuesta antiviral de muchas especies durante millones de años [3]. Esto ocurre, a través de la generación de mutaciones inducidas por deaminación en los genomas de RNA o DNA de los virus, inactivándolos o reduciendo su infectividad [4].

La mutación más frecuentemente inducida por estas enzimas es la transición de citidina a timina, que consiste en la deaminación hidrolítica del grupo amino de una citidina convirtiéndolo en uracilo (Fig. 1A). Este uracilo es reconocido como timina por la maquinaria de replicación en una primera ronda de síntesis de DNA. Por lo tanto, una adenina es adicionada como base complementaria en una segunda ronda de duplicación, causando de esta manera una mutación (Fig. 1B).

Por ejemplo, A3G juega un papel fundamental en la actividad antiviral contra el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1). Esta actividad requiere que la enzima sea transportada a complejos de replicación viral, a través de lo que parece ser un proceso dependiente de RNA [3]. Una vez dentro de las células infectadas, A3G debe unirse al ssDNA para llevar a cabo la mutación de C a U. Sin embargo, aún no se comprenden los mecanismos de la capacidad antiviral A3 en las células y no se

conoce ningún cofactor protéico necesario para la unión de A3 a ssDNA y su posterior actividad de deaminación [5].

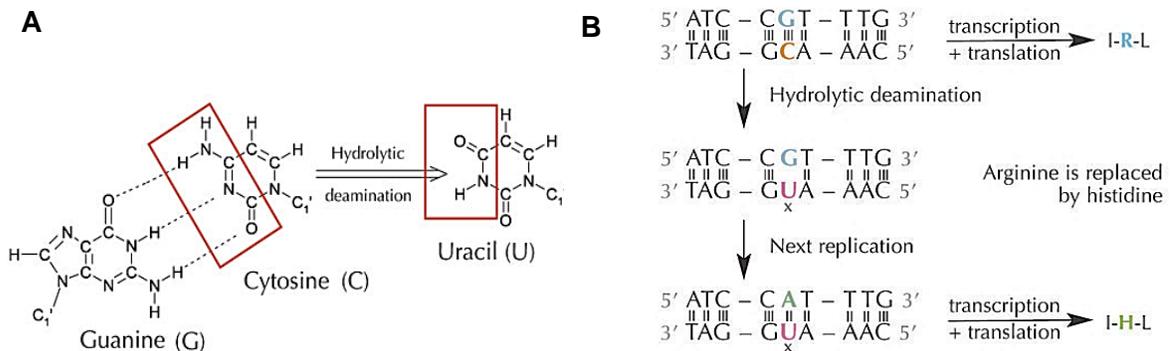


Figura 1. Deaminación causada por la enzima APOBEC3B (A3B). A) Representación esquemática de la deaminación que sufre una citosina a uracilo B) Proceso de transición de C/G a T/A. (Imagen tomada de <https://www.scienceinschool.org/es/2011/issue18/uracil>).

Hasta hace pocos años, AID se había considerado la única proteína capaz de inducir transiciones C/G a T/A en DNA genómico, actuando sobre el gen del receptor de linfocitos B (*BCR*), durante los procesos de hipermutación somática y cambio de isotipo que ocurren en centro germinal [6].

Sin embargo, recientemente Burns *et al.* reportaron por primera vez la actividad oncogénica de A3B en cáncer de mama [7]. Primeramente se mostró que, a diferencia de los otros miembros de la familia (excepto AID), A3B se expresa en el núcleo. Se encontró una alta expresión de A3B tanto en tumores primarios como en líneas celulares de cáncer de mama. Adicionalmente, los niveles de expresión de A3B correlacionaron positivamente con la carga mutacional C por T. Los ensayos de silenciamiento de A3B indujeron una disminución de los niveles de uracilo y del número de transiciones C por T. Este y otros estudios han mostrado, que las mutaciones causadas por A3B están enriquecidas en motivos de DNA específicos, que ahora se conocen como la firma mutacional de A3B. Esta firma se compone de transiciones C a T dentro de motivos de trinucleótidos $T\bar{C}(A/T)$ que dan como resultado mutaciones $T\bar{T}(A/T)$ [8].

Estudios posteriores han encontrado que la firma mutacional de A3B es común en algunos tipos de cáncer, incluyendo mama, cabeza/cuello, cervix, vejiga y pulmón.

Múltiples líneas de evidencia indican que A3B, la única deaminasa de ssDNA constitutivamente nuclear [9], es la fuente primaria de estas mutaciones. Ya que se sobre expresa en tumores primarios en comparación con los tejidos normales, su aumento corresponde positivamente con cargas mutacionales de citosina y su expresión se asocia con peores resultados clínicos, incluida la resistencia a la terapia hormonal [10].

Linfoma

El término linfoma se refiere a los cánceres que se forman en el sistema linfático [11]. Los linfomas representan un grupo heterogéneo de neoplasias malignas linfoides con patrones variados de comportamiento clínico y respuestas al tratamiento [12]. Estos cánceres hematológicos se dividen en dos grupos principales: linfomas de Hodgkin (HL), 13.56%, y no Hodgkin (NHL), 86.44% (fuente: WHO 2020, <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>). El HL se divide además en clásico y no clásico. El NHL comprende una gran cantidad de subtipos entre los que destacan el linfoma de Burkitt, tipo Burkitt, difuso de células B grandes, anaplásico, linfoblástico, entre muchos otros. la clasificación actual de la OMS incluye más de 80 tipos de linfoma [11].

Se han identificado una serie de factores ambientales, infecciosos y genéticos que predisponen al linfoma. Herbicidas y pesticidas específicos, como los herbicidas fenoxi, se han relacionado con un mayor riesgo de linfoma. Un claro ejemplo es el herbicida ácido 2,4-diclorophenoxyacético, que se ha asociado con un 50-200% en el aumento en el riesgo de linfoma [13].

Las frutas y verduras son ricas en antioxidantes e inhibidores de la nitrosación, lo que puede explicar la disminución del riesgo de linfoma asociado con el consumo de estos productos, ya que antioxidantes como luteína y zinc a su vez han sido asociados con la disminución de dicha enfermedad. Por lo contrario, ha sido

reportado que la alta ingesta de grasas y proteínas animales aumenta del riesgo de NHL [14].

Por otro lado, medicamentos, como los bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), estatinas, bloqueadores H2 y los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), pueden producir reacciones que ocasionalmente progresan a NHL. Sin embargo, los factores que afectan el desarrollo de estas reacciones y su progresión a linfoma aún son desconocidos [15].

Entre los factores infecciosos se encuentran las bacterias *Helicobacter pylori* y *Chlamydia psittaci* relacionadas con linfomas de tejido linfático asociado a mucosas (MALT) del estómago y linfomas MALT de anexos oculares, respectivamente [16]. El virus de la hepatitis C se ha asociado con linfomas linfoplasmacíticos y de zona marginal, y el herpesvirus humano-8 con linfoma de efusión primaria. La exposición crónica a estos antígenos ocurre en infecciones persistentes [11].

También hay una mayor incidencia de linfomas en la mayoría de los estados de inmunodeficiencia [11]. El papel de la inmunosupresión en la linfomagénesis se ilustra en parte por el aumento de la incidencia de linfoma en pacientes con inmunodeficiencias hereditarias. Por ejemplo, aproximadamente el 15% de los pacientes con síndrome de Wiskott-Aldrich desarrollan linfoma difuso de células B grandes, cuyos tumores usualmente son positivos al EBV [17].

El aumento del riesgo de linfoma asociado a la inmunosupresión se ha relacionado con tres factores del hospedero: la presencia del EBV, defectos en la regulación inmune y la producción de citocinas, y defectos genéticos que provocan eventos de recombinación genética anormal en el receptor de antígeno de células B (BCR) y de células T (TCR) [18].

El virus de Epstein-Barr

El virus de Epstein-Barr (EBV), también conocido como herpesvirus humano 4, es un herpesvirus de DNA lineal de cadena doble. Tiene tropismo por linfocitos B

principalmente, aunque también puede infectar otros tipos celulares. Se estima que se encuentra presente en el 90% de la población mundial [19].

La infección primaria es comúnmente asintomática y ocurre típicamente en la etapa de la niñez, entre los 3 y 4 años de edad en países subdesarrollados. Esta infección se retarda en países desarrollados, donde frecuentemente ocurre en la etapa adolescente [20]. En adolescentes y adultos jóvenes, la primo-infección puede ocasionar mononucleosis infecciosa [19]. Por otro lado, el EBV se ha relacionado con varias neoplasias malignas, tales como enfermedades linfoproliferativas post-trasplante, carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin y carcinoma gástrico [21].

La partícula viral del EBV está compuesta por varias estructuras como se describe a continuación: el core, el cual contiene el genoma viral. La cápside, que es una cubierta proteica que empaqueta los ácidos nucleicos del virus. Está compuesta por 162 capsómeros. [22]. La cápside está rodeada por una sustancia amorfa de contenido proteico llamada tegumento, el cual a su vez está cubierto por una envoltura lipídica que contiene glicoproteínas y que proviene de la membrana del aparato de Golgi de la célula hospedero (Fig. 2).

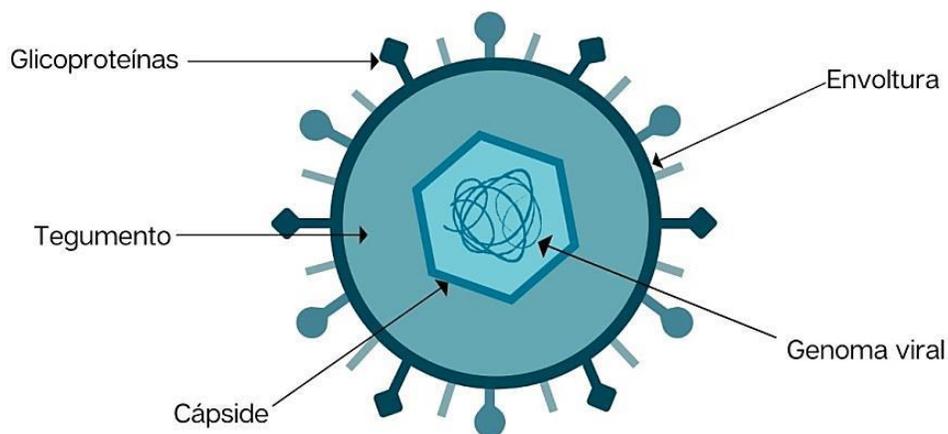


Figura 2. Morfología de la partícula viral de Epstein-Barr (EBV) (Modificado de Chen, et al., 2012).

El EBV, como otros herpesvirus, tiene un ciclo de vida bifásico compuesto por una fase latente y una fase lítica (Fig. 3). En el estado latente se expresan pocas proteínas virales con diferentes patrones, conformando los distintos tipos de latencia (latencia 0, I, II y III), pero no hay formación de partículas virales. La fase lítica se caracteriza por la expresión de una gran cantidad de proteínas virales, la formación de progenie viral y su diseminación a través de la lisis celular [23].

La principal estrategia de persistencia del EBV es la permanencia en estado de latencia. Sin embargo, mediante determinados estímulos puede pasar a un estado lítico, lo que le permite propagarse a otras células. Al cambio de la fase latente a la fase lítica se le conoce como reactivación viral [24].

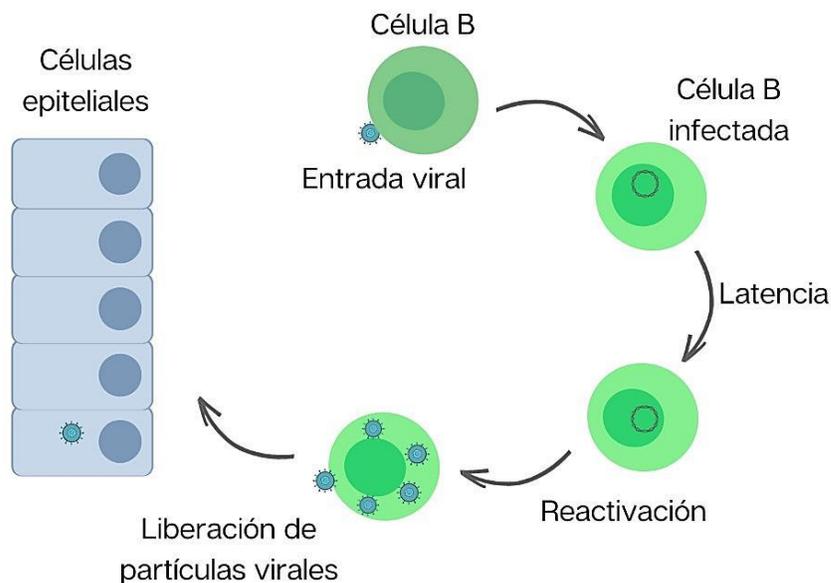


Figura 3. Ciclo de vida bifásico del virus de Epstein-Barr (EBV) (Modificado de Nijland, et al., 2016). La partícula viral del EBV ingresa por la orofaringe e infecta células B naive. Estas son llevadas a centro germinal, en donde emergen como células de memoria. El virus permanece en estas células en un estado latente, pero con la capacidad de reactivarse, infectar células epiteliales y así propagarse.

In vitro, esta reactivación se puede llevar a cabo deprivando al cultivo celular de nutrientes, o utilizando inductores químicos, tales como el acetato de tetradecanoilforbol (TPA), también llamado forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) y el butirato de sodio (NaB) [25, 26]. El PMA, es un activador de la vía PKC, que activa AP1, el cual regula positivamente al gen BZLF1 de EBV. BZLF1 es un factor de transcripción maestro del ciclo lítico de EBV que es expresado durante la fase inmediata temprana [25]. Mientras que el NaB es un inhibidor general de las enzimas deacetilasas de histonas (HDAC). Este agente causa hiperacetilación global de histonas, incluido hiperacetilación en los promotores de BZLF1 y BRLF1 de EBV, genes cuyos productos inician la cascada lítica [26].

Planteamiento del problema

Se ha mostrado que A3B, una proteína asociada a la inmunidad innata antiviral, es capaz de inducir mutaciones fuera de sus blancos virales, es decir en el genoma de la célula hospedero y así contribuir al desarrollo de varios tipos de cáncer.

Ya que A3B es inducida en células infectadas por varios tipos de virus incluyendo los herpesvirus, una posibilidad es que esta enzima participe en el desarrollo de tumores con conocida etiología viral.

Los linfomas, uno de los cánceres más frecuentes en el mundo, están altamente asociados a la infección por el EBV. En este marco biológico consideramos que es importante conocer si en líneas celulares de linfoma positivas al EBV, A3B está presente y activa, y analizar si la replicación viral induce la expresión y actividad de A3B.

Justificación

Este trabajo de tesis servirá para adquirir nuevos conocimientos sobre A3B, linfomas y el EBV. Fungirá como punto de partida para otras preguntas sobre estos temas y ayudará a estandarización de varias técnicas para el laboratorio de Investigación de Virología y Cáncer.

Por lo que mediante este trabajo intentamos contestar las siguientes preguntas:

¿Cuál es la relación entre la presencia de EBV y la expresión de A3B en líneas celulares de linfoma?

¿La expresión de A3B se verá afectada por la reactivación de EBV?

Hipótesis

En líneas celulares de linfoma habrá una correlación entre la presencia del EBV y la expresión y actividad de A3B.

Objetivo general

Analizar la expresión y actividad de A3B en líneas celulares de linfoma positivas a EBV.

Objetivos específicos

1. Evaluar la presencia de EBV en líneas celulares de linfoma mediante la detección de RNA virales pequeños no codificantes y cuantificar la carga viral.
2. Analizar la expresión de A3B a nivel mensajero y proteína, previo y posterior a la inducción al ciclo lítico.
3. Analizar la inducción de mutaciones en presencia de A3B mediante 3D-PCR.

Materiales y métodos

Líneas celulares

Para el desarrollo de este proyecto se utilizaron diferentes líneas celulares comerciales, las cuales se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Líneas celulares utilizadas en este estudio

Línea celular	Referencia	Tipo celular	Tumor de origen	Estatus de EBV
Ramos	ATCC CRL-1596	Linfocito B	LB	Negativo
Raji	ATCC CCL-86		LB	Positivo
Daudi	ATCC CCL-213		LB	
Hs 445	ATCC HTB-146		LH	
P3HR1	ATCC HTB-62		LB	
Namalwa	ATCC CRL-1432		LB	
B95-8	ATCC CRL-1612		LB	
MCF-7	ATCC HTB-22	Epitelial	Cáncer de mama	Negativo
MDA-MB-231	ATCC HTB-26	Epitelial		

LB: Linfoma de Burkitt, LH: Linfoma de Hodgkin.

Muestras de donadores sanos

Se utilizaron muestras de sangre periférica de donadores sanos que acudieron al banco de sangre del Hospital Infantil de México. Dichos donadores fueron sometidos a los exámenes clínicos del hospital, los cuales evaluaron hemoglobina, conteo de plaquetas, serología para VIH, enfermedad de chagas, entre otras enfermedades endémicas de México. Posterior a dichas pruebas se catalogaron como clínicamente sanos. Las células mononucleares de sangre periférica fueron extraídas utilizando el reactivo Ficol (Sigma-Aldrich cat. F4375) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Cultivo celular

Las líneas celulares Ramos, Raji, Daudi, Hs 445, Namalwa, MCF-7 y MDA-MB-231 fueron crecidas en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco cat. 21875091), 10% SFB (Gibco cat. 12483) y 1x ampicilina/estreptomina (Gibco cat. 15240062). La línea celular P3HR1 fue crecida en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco cat. 21875091), 20% SFB (Gibco cat. 12483) y 1x ampicilina/estreptomina (Gibco cat. 15240062). Cada cambio de medio se realizó centrifugando las células 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente en una centrifuga Sigma 3-16KL. En el caso de las células adherentes (MCF-7 y MDA-MB-231), previamente fueron despegadas por incubación con tripsina al 0.05%, durante 5-15 min a 37°C. La actividad de la tripsina fue detenida con SFB. Todas las líneas fueron crecidas a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂.

Purificación de DNA

Se utilizaron 4×10^6 células de las líneas celulares en fase exponencial de crecimiento. Se usó el estuche comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen cat. 51104) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez obtenido el DNA, se cuantificó utilizando el equipo NanoDrop OneC (Thermo Scientific).

Cuantificación de la carga viral de EBV

La cuantificación de la carga viral de EBV en las líneas celulares se realizó mediante una técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) en formato dúplex que fue previamente estandarizada en nuestro laboratorio [27]. Se elaboró una curva patrón, a partir de un plásmido con un fragmento del gen BALF5 insertado. Se realizaron diluciones seriadas con 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6 copias virales, que representan los 6 puntos de la curva patrón. El gen constitutivo utilizado fue beta-actina (*B-ACTINA*), mientras el gen de interés fue subunidad catalítica de DNA polimerasa de EBV (*BALF5*). Los primers y sondas de ambos genes se presentan en la Tabla 2. Los volúmenes y las concentraciones de cada reactivo utilizado en la mezcla de reacción se muestran en la Tabla 3, el volumen final de reacción fue de 20 μ L. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización y activación de la polimerasa a 95°C durante 15 min, seguido de 50 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y alineamiento/elongación a 60°C durante 1 minuto. Las reacciones se corrieron en el equipo Rotor-Gene Q 5plex Platform (Qiagen cat. 9001570).

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos y sondas de la qPCR de detección de EBV.

Gen	Secuencia 5' → 3'	Ref.
<i>B-ACTINA</i>	Primer F CCAGGCTAACCTCGGAAATCT	[27]
	Primer R CATCGTCATTCTGTGCAACT	
	Sonda Cy5-TGGGGTGCCGGCTCTCTGCT-BHQ3a	
<i>BALF5</i>	Primer F CCCTGTTTATCCGATGGAATG	[28]
	Primer R CGGAAGCCCTCTGGACTTC	
	Sonda FAM-TGTACACGCACGAGAAATGCGCC-BHQ1a	

B-ACTINA: beta-actina, *BALF5*: Subunidad catalítica de DNA polimerasade EBV, BHQ: Black Hole Quencher, Cy5: Cyanine 5, F: Forward, R: Reverse.

Tabla 3. Reactivos utilizados en la mezcla de reacción para la qPCR de detección de EBV.

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen (1x)
H2O	-----	3.125 µL
Primer <i>BALF5</i> F	10 µM	0.5 µL
Primer <i>BALF5</i> R	10 µM	0.5 µL
Primer <i>B-ACTINA</i> F	10 µM	0.25 µL
Primer <i>B-ACTINA</i> R	10 µM	0.25 µL
Sonda <i>BALF5</i>	10 µM	0.25 µL
Sonda <i>B-ACTINA</i>	10 µM	0.125 µL
Mezcla de reacción Quantitec (Qiagen)	—	10 µL
Templado DNA	20 ng/µL	5 µL

Purificación de RNA

El RNA de las líneas celulares o proveniente de leucocitos totales de donadores sanos se extrajo a partir de 2×10^6 células utilizando el estuche comercial AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen cat. 80224) y, con columnas QIAshredder (Qiagen cat. 79654) para la homogenización del lisado, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El RNA se cuantificó con el equipo Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

RT-qPCR

Se sintetizó cDNA a partir de $1 \mu\text{g}$ de RNA con el reactivo Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific cat. K1642) utilizando el equipo Mastercycler nexus GSX1 (Eppendorf). El cDNA fue diluido 1.5 veces en agua libre de nucleasas y tomado como templado en la reacción de PCR tiempo real. Los primers utilizados se encuentran en la Tabla 5. Los reactivos utilizados en la mezcla de reacción se presentan en la Tabla 6, el volumen final de la reacción fue de $12.5 \mu\text{L}$. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización y activación de la polimerasa a 95°C durante 10 min, seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, un paso de alineamiento /elongación a 60°C durante 1 minuto y una melt con rampaje de 55°C a 95°C con un aumento de 1°C entre cada paso.

Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos de la RT-qPCR.

Gen	Secuencia 5' → 3'	Ref.
A3B	Primer F GACCCTTTGGTCCTTCGAC	[7]
	Primer R GCACAGCCCCAGGAGAAG	
TBP	Primer F CCCATGACTCCCATGACC	
	Primer R TTTACAACCAAGATTCAGTGTGG	

A3B: Enzima de edición de mRNA Apolipoproteína B subunidad catalítica 3B, TBP: Proteína de unión a la caja TATA, F: Forward, R: Reverse.

Tabla 6. Reactivos utilizados en la mezcla de reacción de la RT-qPCR.

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (1x)
Syber Green	2x	6.25 µL
Primer F	50 µM	0.075 µL
Primer R	50 µM	0.075 µL
H ₂ O	-----	3.6 µL
cDNA	-----	2.5 µL

Preparación de laminillas para Hibridación *in situ* (ISH)

Se partió de cultivos de líneas celulares frescos, en donde se separó 3×10^4 células en 200 µL de PBS 1x frío. Las células se citocentrifugaron en laminillas a 1300 rpm por 3 minutos y fijadas inmediatamente después en una gota de Paraformaldehído

4%, que cubrió el botón formado, durante 15 minutos. Se guardaron en un vaso coplin a 4°C en PBS 1x, hasta su uso.

Hibridación *in situ* de EBERs

Se delimitó una circunferencia alrededor del botón de células previamente fijadas en un portaobjetos, con un Liquid Blocker Super PAP pen (Daido sangyo). Adicionamos 100 µL de Tritón 0.01%, y se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA). A continuación se realizó una serie de lavados de 3 minutos cada uno, comenzando con TBS 1x, Agua MQ (Mili Q), etanol 95% y etanol 99%, en ese orden. **Hibridación.** Se añadió 20 µL de sonda NCL-EBV (Novocastra Fluorescein-Conjugated Epstein-Barr virus Probe, Leica) o NCL-CONTROL, según fue el caso, un cubreobjetos fue colocado encima y se incubó un par de veces en el equipo ThermoBrite (Leica) en condiciones de humedad. La primera incubación, para desnaturalizar, fue de 15 minutos a 65°C y se continuó con la segunda incubación, para hibridizar, que fue de 2 horas a 37°C. Se les hizo un lavado a las laminillas con TBS-T, previamente calentado a 37°C, de 5 minutos o hasta que el cubreobjetos cayó. Una vez que las laminillas perdieron el cubreobjetos, las lavamos dos veces más durante 2 minutos en TBS-T a TA. **Detección.** Se delimitó nuevamente una circunferencia alrededor del botón utilizando Liquid Blocker Super PAP pen y fueron adicionados 100 µL de solución de bloqueo preparada a base de suero de conejo y albúmina de suero bovino en buffer TBS-T (TBS-T-BSA-SC), se incubó durante 10 minutos a TA dentro de una cámara húmeda, a partir de aquí, todas las incubaciones se realizaron dentro de la cámara húmeda. Se decantó la solución de bloqueo y se prosiguió a añadir 100uL del anticuerpo conjugado (Vial A del Novocastra Fluorescein-conjugated probes for *in situ* hybridization ISH Detection Kit, Leica) diluido 1:200 en TBS-T-BSA y se dejó incubar 30 minutos a TA. Se siguió con 2 lavados de 3 minutos cada uno en TBS 1x y un último lavado en buffer de sustrato de fosfatasa alcalina durante 5 minutos a TA. Se delimitó una última vez una circunferencia alrededor del botón con el Liquid Blocker Super PAP pen y se adicionó 100 µL de solución de revelado preparada al momento, seguido de una incubación

de 14 horas en oscuridad a TA. Finalmente se hizo un lavado en agua MQ de 5 minutos a TA y se tomaron fotos al microscopio en aumentos de 10x y 40x. Las preparaciones de las soluciones utilizadas se encuentran en el Anexo 1.

Purificación de proteínas, electroforesis en gel SDS-poliacrilamida y western blot

Del cultivo de cada línea celular, se separaron 1×10^6 células en tubos de 1.5 mL y se lavaron en PBS 1x frío. Se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante, y el botón fue resuspendido en 50 µL de la mezcla de del buffer de lisis RIPA (Merck Millipore cat. 20-188) y del coctel inhibidor de proteasas (Merck Millipore cat. 20-201) (1:1). Los tubos se incubaron a -80°C durante 3 minutos, inmediatamente después se descongelaron a 37°C por 1 minuto 15 segundos aproximadamente (o hasta que el lisado se descongeló por completo). Este proceso de congelado y descongelado se repitió nuevamente. A continuación los tubos se incubaron 10 minutos en hielo y después se centrifugaron a 4°C a 13,000rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se pasó a un tubo de 0.6mL, con cuidado de no tocar el botón formado, y se guardó a -20 °C.

La proteína se cuantificó utilizando el estuche comercial Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific cat. 23235) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Se prepararon geles de poliacrilamida:bisacrilamida (29:1) de 0.75 mm al 12%. Los geles estuvieron formados por una fase separadora (Tabla 7, volumen final: 5.935 mL.) y una fase concentradora (Tabla 8, volumen final: 2.485 mL.).

Corrida. En cada pozo se cargaron 200 µg de proteína en Laemmli buffer 1x y 3.5% β-mercaptoethanol, esta mezcla fue previamente desnaturalizada 10 minutos a 95°C en Thermomixer confort (Eppendorf). El gel se corrió a 100v durante 1 hora y media dentro de una cámara de corrida (Mini-PROTEAN Tetra system, Bio-Rad) en buffer de corrida 1x (Anexo 2). El gel posteriormente se lavó 2 veces, 15 minutos cada lavado, en buffer de transferencia (Anexo 2).

Transferencia. Se activó una membrana de PVDF (Immobilon-P transfer membranes, cat. IPVH00010 Merck Millipore) con metanol durante 30 segundos, se descartó el metanol y se inactivó con agua MQ. La transferencia se llevó a cabo en una cámara de transferencia semiseca (BioRad) durante 15 minutos a 15v. La membrana se dejó secar completamente y después se remojó de nuevo durante 30 segundos en metanol y posteriormente en agua MQ. Se bloqueó con TBS-T-BSA 3% durante 1 hora, en agitación constante.

Detección La membrana se incubó 16 horas a 4°C con anticuerpo primario anti-GAPDH (Abcam cat. Ab9485) 1:5000 o con anti-A3B (Abcam cat. ab184990) 1:100, cada uno diluido en solución de bloqueo. Después de la incubación, se lavó la membrana durante 1 hora con TBS-T, con cambios de TBS-T cada 10 minutos. La membrana se incubó 1 hora en oscuridad con el anticuerpo secundario IRDye 680RD Donkey anti-Rabbit IgG (Li-cor cat. 926-68073) diluido 1:10,000 en solución de bloqueo para anti-GAPDH, o diluido 1:1,000 en solución de bloqueo para anti-A3B. La membrana finalmente se lavó 4 veces en TBS 1x, 30 minutos cada lavado. Se reveló la membrana en el equipo Li-cor Odyssey CLx. Ver Anexo 2 para revisar la preparación de soluciones.

Tabla 7. Reactivos utilizados en el gel SDS-PAGE (fase separadora).

Reactivos	Volumen
Lower buffer	1.25 mL
Agua MilliQ	1.65 mL
30% Acrylamida/Bisacrylamida	2 mL
10% SDS	50 µL
10 % APS	50 µL
TEMED	3.5 µL

Tabla 8. Reactivos utilizados en el gel SDS-PAGE (fase concentradora).

Reactivos	Volumen
Upper buffer	0.25 mL
Agua MilliQ	1.35 mL
30% Acrilamida/Bisacrilamida	0.35 mL
10% SDS	25 μ L
10 % APS	25 μ L
TEMED	3.5 μ L

Inducción de ciclo lítico

Se partió de los cultivos celulares creciendo a una densidad de 5×10^5 cél/mL. Se adicionó PMA a 120 ng/mL y NaB a 3mM para inducir el ciclo lítico. Se dejó en incubación a 37°C. Los cultivos se cosecharon en 24 horas, centrifugando a 1500 rpm durante 10 min. A temperatura ambiente. Se decantó el SN en un tubo de 50 mL y se filtró usando con un filtro de 0.45 μ m. Se apartó 120 μ L del SN decantado y filtrado para extracción de DNA. El SN restante se congeló a -80°C. Al botón celular se le hizo un lavado con PBS 1x y posteriormente se separaron 2×10^6 para extracción de RNA, 1×10^6 para extracción de DNA, 1×10^6 para generación de lisado celular y 3×10^4 por laminilla para IF.

3D-PCR

Se partió del DNA de las líneas celulares y se diluyeron en una mezcla de agua/AE 3:1. Se realizó una PCR punto final en un Mastercycler nexus GSX1 (Eppendorf) para amplificar CMYC. Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1% a 95v durante 1 hora y media. Se cortó la banda del fragmento de CMYC, se extrajo y se purificó el DNA utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen cat. 28704) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El producto extraído se diluyó

nuevamente en agua/AE 3:1 y se corrió en una PCR anhidada con un gradiente de temperaturas de desnaturalización. Los productos finales se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%. Las condiciones de la PCR fueron: 1' 94° (1x), 30'' 94°; 2' 68° (x30), 3' 68° (1x). Mientras que las condiciones de la PCR anhidada fueron: 5' 95°C (1x), 15'' 89-90.5°C, 1' 62°C, 80'' 72 °C (x35), 10' 72°C (1x). Los volúmenes y las concentraciones de cada reactivo utilizado en la mezcla de reacción de la primera ronda de PCR se muestran en la Tabla 9, con un volumen final de reacción de 50 µL., mientras que para los reactivos utilizados en la segunda ronda de PCR se encuentran en la Tabla 10, teniendo un volumen final de reacción de 50 µL. Los primers utilizados se encuentran en la Tabla 11.

Tabla 9. Reactivos utilizados en la mezcla de reacción para la primera ronda de PCR punto final de detección de *CMYC*.

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen (1x)
H ₂ O	-----	29.5 µL
Buffer (NH ₄) ₂ SO ₄	10x	5 µL
MgCl ₂	25 nM	3 µL
Primer <i>CMYC</i> F	10 µM	0.25 µL
Primer <i>CMYC</i> R	10 µM	0.25 µL
dNTPs	50 µM	1 µL
Taq polimerasa	5 u/µL	1 µL
Templado DNA	10 ng/µL	10 µL

Tabla 10. Reactivos utilizados en la mezcla de reacción de la PCR anidada, para la detección de *CMYC*.

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen (1x)
H ₂ O	-----	29.5 µL
Buffer (NH ₄) ₂ SO ₄	10x	5 µL
MgCl ₂	25 nM	3 µL
Primer <i>cMYC</i> F anidada	10 µM	0.25 µL
Primer <i>cMYC</i> R anidada	10 µM	0.25 µL
dNTPs	50 µM	1 µL
Taq polimerasa	5 u/µL	1 µL
Templado DNA	0.5 ng/µL	10 µL

Tabla 11. Secuencias de oligonucleótidos de las PCR

Gen	Secuencia 5' → 3'
<i>cMYC</i>	Primer FTCGAGAAGGGCAGGGCTTCTCAGAGGCTTG
	Primer RGGCGATATGCGGTCCCTACTCCAAGGAGCT
<i>cMYC</i> anidada	Primer F AGGGAGATCCGGAGCGAATAGGGGGCTTC
	Primer R AACCATTCCCGTTTTCCCTCTGCCTTCTCCI

Resultados

Detección de EBERs en líneas celulares comerciales mediante ISH

Los ensayos de ISH se utilizan para detectar secuencias específicas de DNA o RNA en tejidos o células, mediante el principio de homología entre ácidos nucleicos. En este caso, nuestra secuencia de interés fueron RNA pequeños no codificantes de EBV (EBERs), que nos indican la presencia del virus en la célula. Esto se realizó con las 6 líneas celulares de linfoma reportadas como positivas a el EBV (Fig. 4). Todas las líneas previamente reportadas como positivas al EBV emitieron señal, lo cual nos confirmó la presencia del virus.

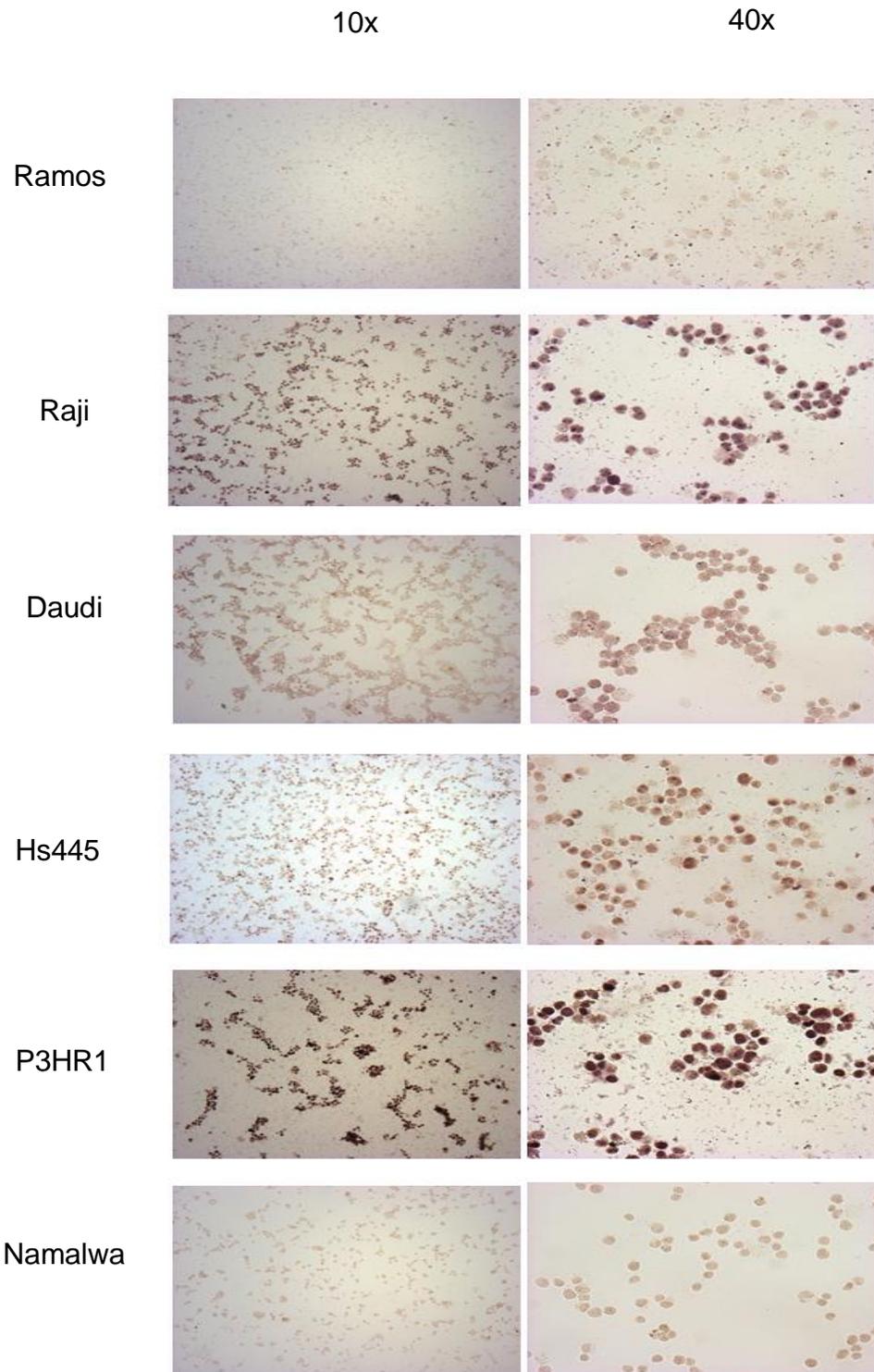


Figura 4. Presencia del virus de Epstein-Barr (EBV) en líneas celulares de linfoma. Hibridación *in situ* (ISH) de 6 líneas celulares de linfoma. La línea Ramos representa un control negativo. Una señal positiva se muestra en tonos cafés y morados.

Cuantificación de carga viral del EBV

Se midió la carga viral en estas mismas líneas celulares mediante qPCR. Raji resultó ser la línea celular con mayor cantidad de episomas virales, mientras que Namalwa fue la línea EBV positiva con menor cantidad de estas (Fig. 5). Estos resultados concordaron con la literatura [29].

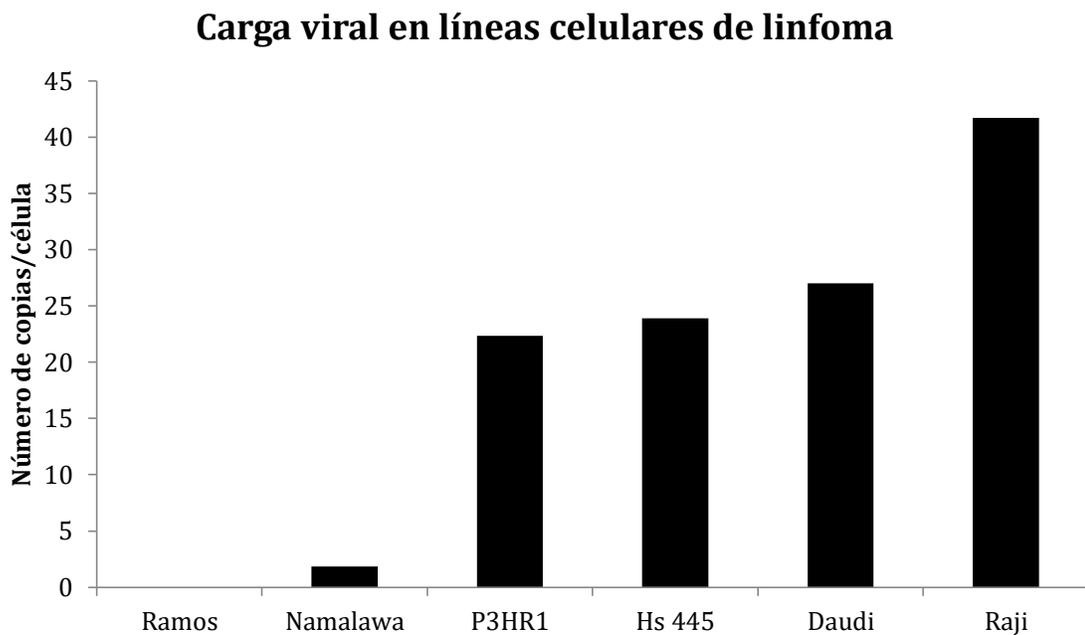


Figura 5. Carga viral en líneas celulares de linfoma. El resultado expresa el promedio del número de copias virales por célula de 3 experimentos independientes.

Expresión de A3B en líneas celulares de linfoma

Mediante RT-qPCR medimos la expresión de A3B a nivel de mRNA en las líneas celulares antes mencionadas, así como en las muestras de donadores sanos (D1-6). Estas últimas fueron incluidas como control de expresión de A3B en linfocitos normales (ver materiales y métodos). En dichas muestras encontramos una expresión de A3B cercana a cero. Ramos, la única línea de linfoma evaluada negativa a el EBV, fue la línea con la mayor expresión de A3B. A su vez, Raji fue la

línea positiva al virus con mayor expresión de nuestro gen de interés. Mientras que las líneas celulares de cáncer de mama las utilizamos como un control positivo, ya que habían sido previamente reportadas con expresión de A3B. (Fig. 6).

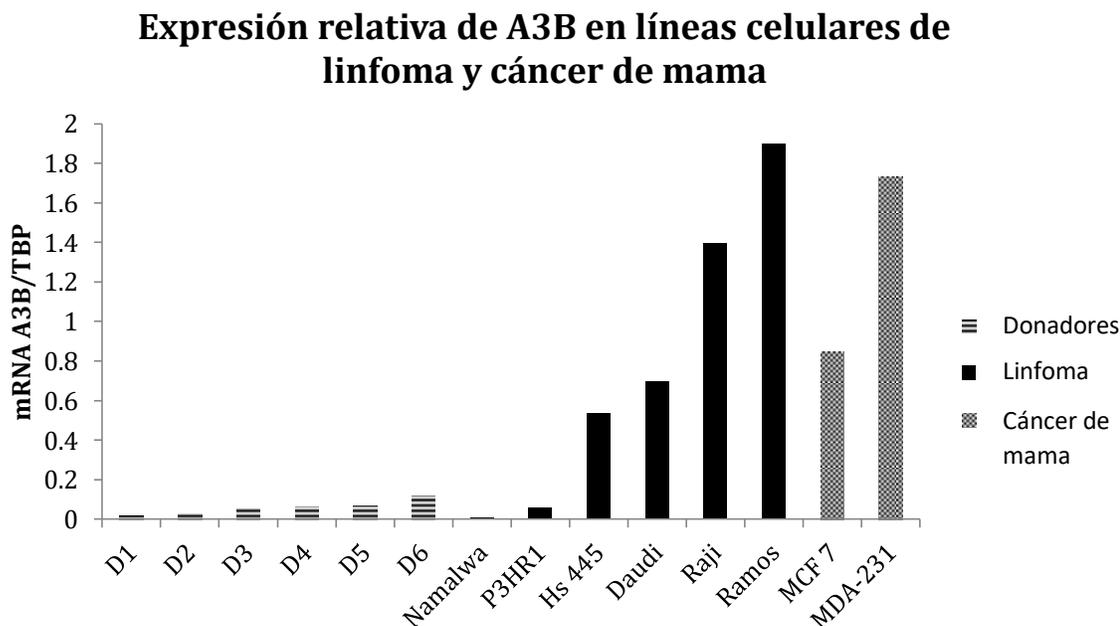


Figura 6. Expresión de mRNA de APOBEC3B (A3B) relativa a TBP. De izquierda a derecha se muestra en la gráfica la expresión de A3B en seis donadores (D1-6), las seis líneas celulares de linfoma y dos líneas celulares de cáncer de mama. Los resultados graficados son el promedio de 3 experimentos independientes. SD=0.68.

Evaluación de nivel proteico de A3B mediante western blot

Realizamos western blot para detectar A3B en las líneas celulares de linfoma (Fig. 7). Ramos, a pesar de expresar mayor cantidad de mensajero de A3B, expresó menor nivel de proteína que Raji y Daudi, ambas con menor expresión a nivel de mensajero.

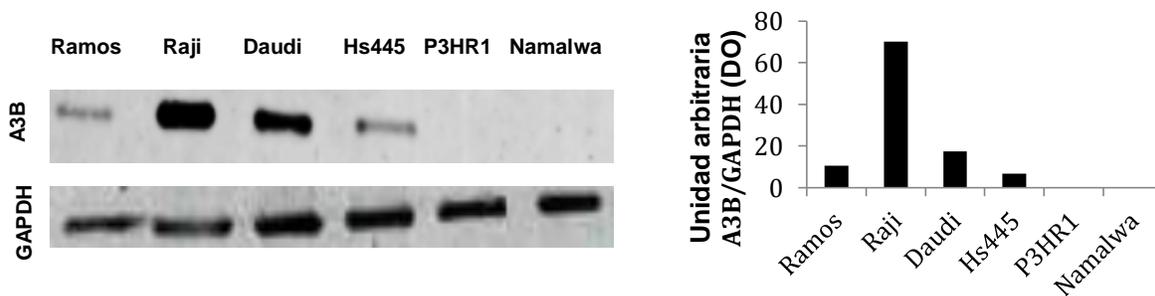


Figura 7. Niveles de proteína de APOBEC3B (A3B) en las líneas celulares de linfoma. Expresión proteica de todas las líneas de linfoma y su densitometría.

Expresión de A3B post-inducción de ciclo lítico de EBV

Posteriormente sometimos a las líneas celulares positivas al EBV a una inducción química del ciclo lítico y medimos nuevamente la expresión de A3B a nivel de mensajero. Comparamos estos resultados con la expresión a nivel basal y observamos un incremento de A3B en todas las líneas celulares (Fig. 8).

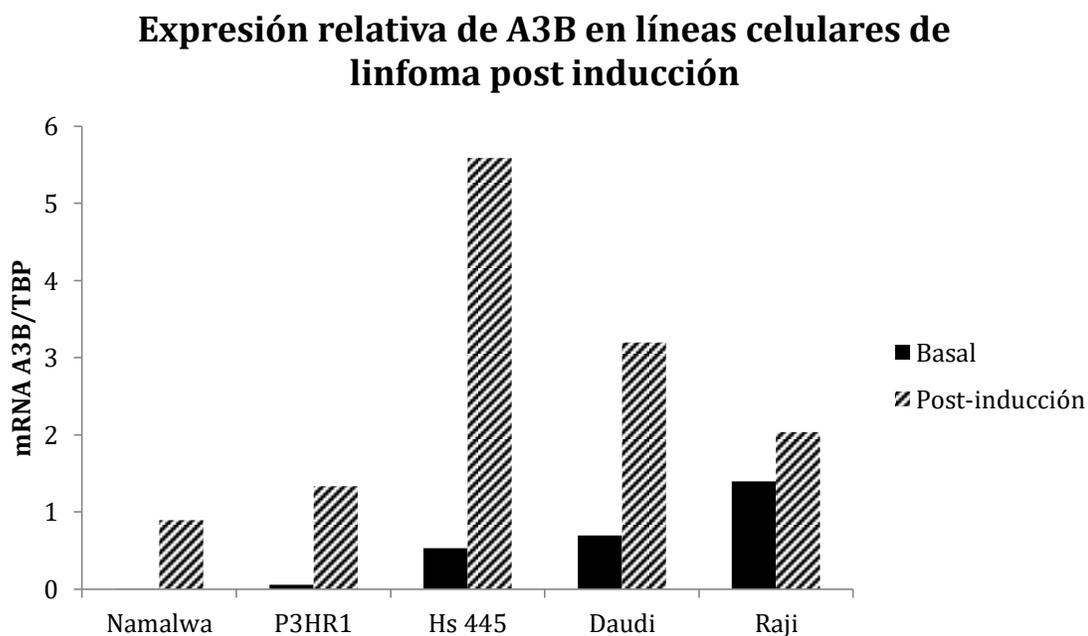


Figura 8. Expresión de A3B post-inducción del ciclo lítico del EBV. Comparamos la expresión de mRNA de A3B en un contexto basal y en un contexto post-inducción de ciclo lítico del EBV.

Posteriormente comparamos los niveles de A3B en la línea celular Raji, la línea con mayor nivel de A3B, en su contexto basal y en un contexto de inducción del ciclo lítico del EBV. No observamos diferencias en los niveles de A3B bajo estas dos condiciones (Fig. 9).

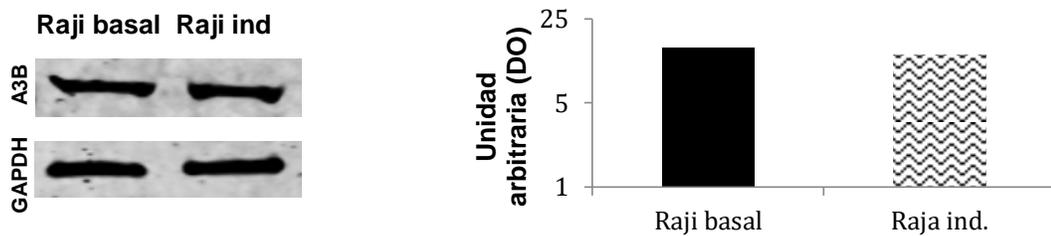


Figura 9. Niveles de proteína de APOBEC3B (A3B) en la línea celular Raji post-inducción del ciclo lítico. Western blot de A3B de la línea celular Raji en un contexto basal y post-inducción del ciclo lítico junto con su densitometría. GAPDH funge como control de carga.

Análisis de mutaciones C/G a T/A mediante 3D-PCR

La desnaturalización diferencial de DNA PCR (3D-PCR) nos permite estimar la temperatura más baja de desnaturalización requerida para la amplificación de cualquier fragmento de DNA. Usamos esta técnica para analizar posibles mutaciones de C/G a T/A, ya que una timina se une a una adenina mediante dos puentes de hidrógeno, a diferencia de los tres puentes que enlazan a una citosina y una guanina, por lo que un fragmento de DNA con menos puentes de hidrógeno necesitará una menor temperatura para su desnaturalización. Por lo cual una menor temperatura de desnaturalización funge como un indicador indirecto de una mutación en ese gen por parte de A3B. En este caso nuestro gen evaluado fue *cMYC*, debido a que es un bien conocido oncogén y es muy importante en linfomagénesis [6]. *cMYC* se amplificó a una temperatura de 90.5°C en la muestra de donador sano (ver materiales y métodos). En el resto de las muestras, hubo amplificación de *cMYC* a los 90.3°C, mientras que en la línea Raji, la línea celular con mayor expresión de APOBEC3B lo

encontramos expresado desde los 89.9°C. (Fig. 10). Esto indica que *cMYC* posiblemente sufrió mutaciones C/G a T/A en las líneas celulares evaluadas.

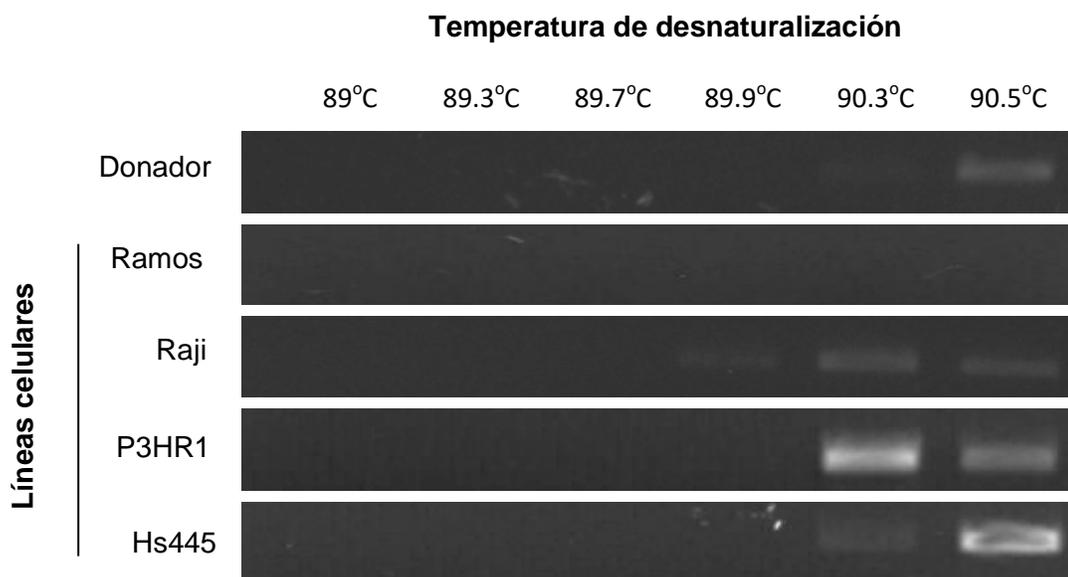


Figura 10. Detección indirecta de mutaciones en *cMYC* mediante 3D-PCR de líneas celulares de linfoma. 3D-PCR usando un gradiente de temperaturas de desnaturalización, comenzando por 89°C y culminando en 90.5°C.

Discusión

En este trabajo, exploramos la probable asociación de EBV con la inducción de mutaciones mediadas por A3B en líneas celulares de linfoma. La carga viral de las líneas Namalwa, P3HR1 y Raji fue similar a lo previamente reportada por Tang W et al [30]. Para nuestro conocimiento, la carga viral de las líneas Hs445 y Daudi no se ha reportado previamente.

Posteriormente evaluamos el nivel de expresión de A3B en estas líneas celulares, en líneas celulares de cáncer de mama (controles positivos) y en muestras de células mononucleares de sangre periférica de donadores del banco de sangre (controles sanos).

Como esperábamos, la expresión de mRNA de A3B en las seis muestras de donadores fue cercana a cero. Sorprendentemente, Ramos mostró la mayor expresión en comparación con las otras líneas de linfoma. Sin embargo, al analizar los niveles de A3B mediante Western Blot, observamos que los niveles de proteína de A3B en cada línea celular se mantuvieron proporcionales a su expresión a nivel de mRNA, con excepción de Ramos, para la cual observamos un nivel muy bajo de proteína (Fig. 7).

Posteriormente, evaluamos la expresión del mensajero de A3B post inducción del ciclo lítico de EBV en las líneas celulares de linfoma EBV positivas. Observamos que en todas hubo un aumento de expresión de A3B a comparación con su expresión basal. Estos resultados sugieren que en las líneas celulares usadas, A3B es un factor importante de la respuesta inmune antiviral. Trabajos previos han reportado que la infección por herpesvirus induce la expresión de proteínas de la familia APOBEC [31]. Suspène *et al.* [32] observaron que la sobreexpresión ectópica de A3C en células HeLa reduce la cantidad de títulos virales y la relación partícula/unidad formadora de placas (PFU) hasta 10 veces de virus de herpes simplex 1 (HSV-1). Ensayos de 3D-PCR sugirieron probables eventos de deaminación en genes de HSV-1, mismos que se encontraron en genes de EBV, determinando que probablemente todo el genoma de EBV es susceptible a estas mutaciones.

En nuestro trabajo, comparamos los niveles de proteína de A3B basales y post-inducción de ciclo lítico del EBV en la línea Raji, ya que fue la línea con mayor carga viral, con mayor expresión de mRNA y proteína de A3B dentro de las líneas EBV positivas. No observamos diferencias entre los niveles de A3B basales y post-inducción. Ya que previamente observamos un aumento en el mensajero de A3B post-inducción del ciclo lítico y una buena correlación entre los niveles de mensajero y proteína de A3B, estos resultados sugieren que la cantidad o estabilidad de la proteína A3B podría estar siendo regulada por algún mecanismo del virus. En este sentido, durante el curso de nuestro trabajo, Cheng *et al.* [33] reportaron que la subunidad grande de la ribonucleótido reductasa de EBV (BORF2) se acopla a

APOBEC3B e inhibe su actividad enzimática. Mediante ensayos de pérdida y ganancia de función tanto de BORF2 como de APOBEC3B, demostraron que BORF2 inhibe directamente la edición genómica mediada por APOBEC3B sobre ssDNA durante la replicación lítica de EBV. Los autores propusieron un mecanismo en el que BORF2 se une a APOBEC3B y la recluta lejos de los sitios nucleares de replicación del DNA viral hacia cuerpos nucleares, perinucleares y citoplasmáticos reduciendo significativamente los niveles de proteína de APOBEC3B. Por lo tanto, nuestros resultados coinciden con este trabajo y es probable que la falta de inducción de APOBEC3B a nivel de proteína que observamos post-inducción del ciclo lítico sea consecuencia del reclutamiento de APOBEC3B inducido por el ciclo lítico y mediado por la proteína viral BORF2.

Por último, evaluamos indirectamente la posible presencia de mutaciones en el gen *cMYC* en las líneas celulares de linfoma. Utilizamos la técnica de 3D-PCR (desnaturalización diferencial de DNA, la cual es una modificación de la PCR convencional, en la que se amplifica el DNA templado usando un gradiente en la temperatura de desnaturalización y por lo tanto permite detectar indirectamente cambios en la secuencia templado entre diferentes muestras problema. En nuestro caso fue útil para interrogar posibles cambios en la secuencia de *cMYC* entre líneas celulares con diferentes niveles de expresión de APOBEC3B y con referencia a un DNA control [34].

En este sentido, si en la temperatura de desnaturalización más baja a la que se amplifica el DNA es inferior a la del control, esto puede considerarse una evidencia indirecta de mutaciones en uniones CG que dieron lugar a uniones TA [32].

cMYC se amplificó en la muestra de donador únicamente en la mayor temperatura de desnaturalización evaluada. En todas las líneas celulares hubo amplificación de *cMYC* a temperaturas más bajas. El DNA de la línea celular Raji mostró amplificación desde los 89.9°C, sugiriendo que el gen *cMYC* posiblemente ha sufrido mutaciones en estas líneas, y en una mayor proporción en la línea Raji, la cual mostró la mayor expresión de APOBEC3B entre las líneas celulares de linfoma (Fig. 10).

Nuestro trabajo coincide con lo previamente reportado por Shinohara et al. [6] quienes realizaron secuenciación de Sanger de *cMYC* y otros genes en líneas celulares de linfoma con alta expresión de A3B. Encontraron varias mutaciones de C a T en regiones en donde se ha informado que se concentran las mutaciones somáticas inducidas por las citidina deaminasas. Adicionalmente, mostraron que la sobreexpresión de A3B induce mutaciones que en más del 80% fueron transiciones C/ G a T/A. determinando que la expresión de A3B puede inducir mutaciones somáticas en genes activamente transcritos relacionados con el tumor en células de linfoma.

En conclusión, de acuerdo a nuestros resultados el ciclo lítico de EBV induce la expresión de A3B, pero que hay una expresión basal de A3B aún en ausencia de la reactivación viral. Consideramos que la expresión ocurre tanto a nivel de mensajero como de proteína. Sin embargo, la cascada lítica de EBV conlleva la expresión de una plétora de genes entre los cuales se encuentran genes que contrarrestan la respuesta innata antiviral como BORF2 que conducen al decaimiento en los niveles de proteína de A3B. No obstante, mediante repetidos ciclos de reactivación durante la vida de la célula infectada, la activación de A3B puede eventualmente, inducir mutaciones como lo sugirió nuestro ensayo de 3D-PCR cuando comparamos líneas infectadas con el control sano. Para nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en el que sugiere que la infección por EBV puede inducir mutaciones fuera de blanco, es decir fuera del genoma de EBV y por lo tanto en el genoma de la célula hospedero. Dichas mutaciones son generadas “accidentalmente” por la respuesta inmune antiviral desplegada por A3B.

Referencias

1. Salter, J.D., R.P. Bennett, and H.C. Smith, *The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function*. Trends Biochem Sci, 2016. **41**(7): p. 578-594.
2. Navaratnam, N., et al., *Evolutionary origins of apoB mRNA editing: catalysis by a cytidine deaminase that has acquired a novel RNA-binding motif at its active site*. Cell, 1995. **81**(2): p. 187-95.
3. Salter, J.D., et al., *Regulation of Antiviral Innate Immunity Through APOBEC Ribonucleoprotein Complexes*. Subcell Biochem, 2019. **93**: p. 193-219.
4. Harris, R.S. and J.P. Dudley, *APOBECs and virus restriction*. Virology, 2015. **479-480**: p. 131-45.
5. Milewska, A., et al., *APOBEC3-mediated restriction of RNA virus replication*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 5960.
6. Shinohara, M., et al., *APOBEC3B can impair genomic stability by inducing base substitutions in genomic DNA in human cells*. Sci Rep, 2012. **2**: p. 806.
7. Burns, M.B., et al., *APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer*. Nature, 2013. **494**(7437): p. 366-70.
8. Serebrenik, A.A., et al., *The deaminase APOBEC3B triggers the death of cells lacking uracil DNA glycosylase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(44): p. 22158-22163.
9. Salamango, D.J., et al., *APOBEC3B Nuclear Localization Requires Two Distinct N-Terminal Domain Surfaces*. J Mol Biol, 2018. **430**(17): p. 2695-2708.
10. Lackey, L., et al., *Subcellular localization of the APOBEC3 proteins during mitosis and implications for genomic DNA deamination*. Cell Cycle, 2013. **12**(5): p. 762-72.
11. Mugnaini, E.N. and N. Ghosh, *Lymphoma*. Prim Care, 2016. **43**(4): p. 661-675.
12. Jiang, M., N.N. Bennani, and A.L. Feldman, *Lymphoma classification update: T-cell lymphomas, Hodgkin lymphomas, and histiocytic/dendritic cell neoplasms*. Expert Rev Hematol, 2017. **10**(3): p. 239-249.
13. Zhang, L., et al., *Exposure to glyphosate-based herbicides and risk for non-Hodgkin lymphoma: A meta-analysis and supporting evidence*. Mutat Res, 2019. **781**: p. 186-206.
14. Blinder, V., S.G. Fisher, and N.Y. Lymphoma Research Foundation, *The role of environmental factors in the etiology of lymphoma*. Cancer Invest, 2008. **26**(3): p. 306-16.
15. Koca, E., et al., *Angiotensin-converting enzyme expression of the lymphoma-associated macrophages in the lymph nodes of Hodgkin's disease*. J Natl Med Assoc, 2007. **99**(11): p. 1243-4, 1246-7.
16. Melenotte, C., et al., *Bacterial infection and non-Hodgkin's lymphoma*. Crit Rev Microbiol, 2020. **46**(3): p. 270-287.
17. Trofe, J., et al., *The role of immunosuppression in lymphoma*. Recent Results Cancer Res, 2002. **159**: p. 55-66.
18. Filipovich, A.H., et al., *Primary immunodeficiencies: genetic risk factors for lymphoma*. Cancer Res, 1992. **52**(19 Suppl): p. 5465s-5467s.
19. Smatti, M.K., et al., *Epstein-Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update*. Front Oncol, 2018. **8**: p. 211.

20. Hjalgrim, H., J. Friborg, and M. Melbye, *The epidemiology of EBV and its association with malignant disease*, in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunophylaxis*, A. Arvin, et al., Editors. 2007: Cambridge.
21. Yin, H., et al., *Molecular mechanisms of EBV-driven cell cycle progression and oncogenesis*. *Med Microbiol Immunol*, 2019. **208**(5): p. 573-583.
22. Fields, *Virology*. 2008.
23. Li, X., et al., *Retrograde regulation by the viral protein kinase epigenetically sustains the EBV latency-to-lytic switch to augment virus production*. *J Virol*, 2019.
24. Weber, E., et al., *A Noncanonical Basic Motif of Epstein-Barr Virus ZEBRA Protein Facilitates Recognition of Methylated DNA, High-Affinity DNA Binding, and Lytic Activation*. *J Virol*, 2019. **93**(14).
25. Li, H., et al., *Epstein-Barr virus lytic reactivation regulation and its pathogenic role in carcinogenesis*. *Int J Biol Sci*, 2016. **12**(11): p. 1309-1318.
26. Countryman, J.K., L. Gradoville, and G. Miller, *Histone hyperacetylation occurs on promoters of lytic cycle regulatory genes in Epstein-Barr virus-infected cell lines which are refractory to disruption of latency by histone deacetylase inhibitors*. *J Virol*, 2008. **82**(10): p. 4706-19.
27. Sanchez-Ponce, Y., et al., *Simultaneous Detection of Beta and Gamma Human Herpesviruses by Multiplex qPCR Reveals Simple Infection and Coinfection Episodes Increasing Risk for Graft Rejection in Solid Organ Transplantation*. *Viruses*, 2018. **10**(12).
28. Kimura, H., et al., *Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay*. *J Clin Microbiol*, 1999. **37**(1): p. 132-6.
29. Jabs, W.J., et al., *Normalized quantification by real-time PCR of Epstein-Barr virus load in patients at risk for posttransplant lymphoproliferative disorders*. *J Clin Microbiol*, 2001. **39**(2): p. 564-9.
30. Tang, W., et al., *Atypical Epstein-Barr viral genomic structure in lymphoma tissue and lymphoid cell lines*. *Diagn Mol Pathol*, 2013. **22**(2): p. 91-101.
31. Stavrou, S. and S.R. Ross, *APOBEC3 Proteins in Viral Immunity*. *J Immunol*, 2015. **195**(10): p. 4565-70.
32. Suspene, R., et al., *Genetic editing of herpes simplex virus 1 and Epstein-Barr herpesvirus genomes by human APOBEC3 cytidine deaminases in culture and in vivo*. *J Virol*, 2011. **85**(15): p. 7594-602.
33. Cheng, A.Z., et al., *Epstein-Barr virus BORF2 inhibits cellular APOBEC3B to preserve viral genome integrity*. *Nat Microbiol*, 2019. **4**(1): p. 78-88.
34. Suspene, R., et al., *Recovery of APOBEC3-edited human immunodeficiency virus G->A hypermutants by differential DNA denaturation PCR*. *J Gen Virol*, 2005. **86**(Pt 1): p. 125-129.

Anexos

Anexo 1. Reactivos para Hibridacion *in situ*

Buffer Salino de TRIS (TBS)

TRIS/HCl	50mM o 7.88g/L
NaCl	150 mM o 8.76g/L Ajustar pH a 7.6 y esterilizaren autoclave

Buffer Salino de TRIS -Tritón 100x (TBS-T)

TRIS/HCl	50 mM o 7.88 g/L
NaCl	150 mM o 8.76 g/L
Tritón 100x	0.1% o 1 mL/L

Esterilizar por filtración. Ajustar a pH 7.6 o usar TBS ajustado

Buffer Salino de TRIS -Tritón 100x -Albumina de Suero Bovino (TBS-T-BSA)

TRIS/HCl	50 mM o 7.88 g/L
NaCl	150 mM o 8.76 g/L
Tritón 100x	0.1% o 1 mL/L
Albumina de Suero Bovino	3% o 30g/L

Esterilizar por filtración. Ajustar a pH 7.6 o usar TBS ajustado

Buffer Salino de TRIS -Tritón 100x -Albumina de Suero Bovino-Suero de Conejo (Solución de Bloqueo)

TRIS/HCl	50 mM o 7.88 g/L
NaCl	150 mM o 8.76 g/L

Tritón 100x	0.1% o 1 mL/L
Albumina de Suero Bovino	3% o 30 g/L
Suero de Conejo	20% o 200 mL/L

Esterilizar por filtración. Ajustar a pH 7.6 o usar TBS ajustado

Buffer del sustrato de fosfatasa alcalina (Buffer del sustrato de FA)

TRIS/HCl	50 mM o 15.76 g/L
NaCl	150 mM o 8.76 g/L
MgCl ₂	50 mM o 4.76 g/L

Ajustar pH a 9.0 y esterilizar en autoclave

Sustrato de la enzima (Solución de revelado)

Buffer del sustrato de FA	980 uL/mL
Sustrato de la enzima (Vial B)	20 uL/mL
Levamisol (Vial C)	1 uL/mL

Anexo 2. Reactivos para Western blot

Lower PAGE buffer, pH 8.8 (1L):

TRIS base	181.7 g (1.5 M)	
HCL titration solution	ajustar pH a 8.8	dd
H ₂ O	llevar a 1L	

Upper PAGE buffer, pH 6.8 (1L):

TRIS base	60.6 g (0.5 M)
HCL titration solution	ajustar pH a 6.8
dd H ₂ O	llevar a 1L

Laemmli sample buffer 5x (15ml):

Tris base	454 mg (1x: 50 mM)
SDS	1.5 g (1x: 2 w/V)
Bromphenol blue	15 mg (1x: 0.2 %)
Dithiothreitol (DTT)	1.16 g (1x: 100 mM)
Glycerol	7.5 mL (1x: 10% V/V)
dd H ₂ O	llevar a 15 mL

SDS-PAGE running buffer 10x, pH8.3 (1L):

TRIS base	30.0 g (1x: 25 mM)
Glycine	144 g (1x: 0.2 M)
SDS	10.0 g (1x: 1% w/V)
HCl titration solution	ajustar pH a 8.3
dd H ₂ O	llevar a 1 L

Ammoniumperoxodisulfate (APS) 10 % (w/V)

APS (Ammoniumperoxodisulfate)	1g
dd H ₂ O	10 mL

Laemmli sample buffer 2x β-mercaptoethanol 7% (1mL)

Laemmli sample buffer 5x	400 μL
β -mercaptoethanol	70 μL
dd H ₂ O	530 μL