



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

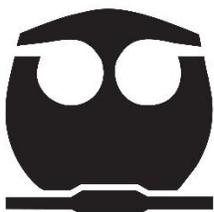
**FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LOS CORONAVIRUS MERS-COV, SARS-COV
Y SARS-COV-2 EN LA INTERFERENCIA DE LA RESPUESTA CELULAR, LA EXPRESIÓN
GÉNICA Y SU IMPACTO EN EL RETRASO DE LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR
INTERFERÓN.**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN.

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA
ERICK ISMAEL LARA MONTES.**

**ASESOR
PROFESOR FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: PROFESORA RUTH EDITH MARTIN FUENTES

VOCAL: PROFESOR FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

SECRETARIO: PROFESOR HUGO ANTONIO HERNÁNDEZ PÉREZ

1^{er}. SUPLENTE: PROFESOR ISMAEL MANCILLA HERRERA

2^{do}. SUPLENTE: PROFESOR EDGAR RICARDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA: DR. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

SUSTENTANTE: ERICK ISMAEL LARA MONTES

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	3
Índice de figuras.....	5
Índice de tablas.....	9
Listado alfabético de siglas y abreviaturas empleados en este trabajo.	10
RESUMEN.....	12
1 INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 Planteamiento del problema: Introducción al género <i>Betacoronavirus</i> y los problemas de salud ocasionados por SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2.....	13
1.2 Objetivo.....	18
1.3 Hipótesis.....	18
1.4. Metodología.....	18
2. INFORMACIÓN GENERAL SOBRE EL TEMA.....	19
2.1 Características generales de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2.....	19
2.2 Ciclo replicativo de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2.....	21
2.2.1 Reconocimiento y entrada a la célula.....	21
2.2.2 Traducción del complejo replicasa y ensamblaje de los Complejos de Replicación y Transcripción.....	23
2.2.3 Replicación, transcripción y procesamiento de RNA viral.....	26
2.2.4 Traducción de proteínas estructurales, ensamblaje y liberación de viriones.....	28
2.3 Detección de la infección viral y producción de IFN-I y citocinas.....	29
2.4 Respuesta a interferón: Activación de la vía Jak-STAT y expresión de ISGs.....	33
2.5 Interferencia de proteínas de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 en la producción de IFN-I y citocinas.....	37
2.5.1 Proteínas estructurales de SARS-CoV y MERS-CoV.....	37

2.5.2 Proteínas no estructurales de SARS-CoV y MERS-CoV.....	47
2.5.3 Proteínas accesorias de SARS-CoV.	54
2.6 Interferencia de proteínas de SARS-CoV sobre la vía Jak-STAT.....	56
2.7 Interferencia de proteínas de SARS-CoV-2 sobre la síntesis de IFN-I y la vía Jak-STAT.....	59
2.8 Consecuencias del retraso en la síntesis y señalización mediada por interferón en las infecciones por SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2.	75
3 DISCUSIÓN.....	95
3.1 Conservación entre las proteínas antagonistas de IFN-I de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2.....	96
3.2 Determinación de la actividad antagonista de IFN-I de proteínas virales.	101
3.3 Desregulación de IFN-I: Modelos animales y estudios en pacientes con COVID-19.....	103
4 CONCLUSIONES.	109
5 REFERENCIAS.	110
ANEXO 1. Rúbrica para análisis de artículos científicos originales.	117

Índice de figuras.

Figura 1. Taxonomía del orden Nidovirales	14
Figura 2. Estructura general de los coronavirus SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2	20
Figura 3. Organización del genoma de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-221	
Figura 4. Eventos de reconocimiento y entrada de SARS-CoV-2 por fusión directa con la célula hospedera y endocitosis	22
Figura 5. Modelo del replisoma de los Coronavirus	25
Figura 6. Formación de vesículas de doble membrana y red de membranas invertidas	26
Figura 7. Mecanismos de reconocimiento de PAMPs de los coronavirus e inducción de síntesis de citocinas proinflamatorias e IFN-I	32
Figura 8. Activación de la vía Jak-STAT y expresión de ISGs	34
Figura 9. Papel de la señalización mediada por IFN-I en células infectadas y células del sistema inmunológico	36
Figura 10. La proteína N de SARS-CoV interactúa con TRIM25	38
Figura 11. La interacción entre RIG-I y TRIM25 es inhibida por N de SARS-CoV	39
Figura 12. La ubiquitinación de RIG-I mediada por TRIM25 es inhibida por N	39
Figura 13. La proteína N reduce la activación del promotor de IFN- β , la producción de mRNA IFN- β e IFN- β y afecta la síntesis de genes bajo el promotor ISRE	40
Figura 14. La proteína M de SARS-CoV muestra mayor inhibición que N sobre la activación del promotor de IFN- β	41
Figura 15. La proteína M de SARS-CoV inhibe la actividad inductora de interferón de RIG-I, MDA5, TBK1, IKK ϵ y MAVS, no así de IRF3 e IRF7	42
Figura 16. La proteína M de SARS-CoV se asocia con RIG-I, TBK1, IKK ϵ y TRAF3	43
Figura 17. La proteína M de SARS-CoV impide la formación del complejo TRAF3/TANK/TBK1/IKK ϵ	44
Figura 18. La proteína M de MERS-CoV reduce la activación del promotor de IFN- β , así como la síntesis de su transcrito	45
Figura 19. La proteína M de MERS-CoV inhibe la función de IRF3	46

Figura 20. La proteína M de MERS-CoV reduce la activación del promotor con elementos ISRE.....	47
Figura 21. El dominio PLpro de SARS-CoV reduce la activación del vector ISRE-Luc e interactúa con STING	48
Figura 22. PLpro y SARS-CoV reducen la formación de dímeros de STING.....	49
Figura 23. PLpro de SARS-CoV disminuye la actividad de IRF3(5D).....	50
Figura 24. PLpro de SARS-CoV desubiquitina a IRF3(5D) y emplea su actividad DUB para reducir la activación del promotor de IFN-β	51
Figura 25. El dominio PLpro de MERS-CoV con actividad DUB reduce la activación de IFN-β.....	53
Figura 26. La proteína ORF3b inicialmente se ubica en el núcleo y finalmente se localiza en las mitocondrias.....	55
Figura 27. La proteína ORF3b de SARS-CoV reduce la activación del promotor reconocido por IRF3.....	55
Figura 28. La presencia de ORF6 inhibe la translocación de STAT1	57
Figura 29. La proteína ORF6 de SARS-CoV retiene a KPNA2 en el retículo endoplásmico	58
Figura 30. KPNA1 se localiza en el retículo endoplásmico en presencia de ORF6 de SARS-CoV e interactúa con KPNA2:ORF6 <i>in vivo</i>	59
Figura 31. Las proteínas N, ORF6 y ORF8 de SARS-CoV-2 disminuyen la activación de los promotores IFN-β, ISRE y NFκB.....	60
Figura 32. Las proteínas ORF6 y ORF8 de SARS-CoV-2 disminuyen la activación del promotor ISRE bajo condiciones de estimulación con IFN-β.....	61
Figura 33. SARS-CoV-2 retrasa la síntesis de los transcritos de IFN-β e ISG56, además de inducir bajos niveles de los mismos en comparación con SeV.....	62
Figura 34. Las proteínas nsp1, nsp3 (PLpro), nsp12-14, ORF3, ORF6, M y N de SARS-CoV-2 disminuyen significativamente la activación del promotor de IFN-β	63
Figura 35. La proteína ORF6 de SARS-CoV-2 disminuye la activación del promotor de IFN-β inducida por RIG-I-N, MDA5, MAVS e IRF3-5D.....	64
Figura 36. La proteína ORF6 de SARS-CoV-2 inhibe la translocación nuclear de IRF3.....	64
Figura 37. Las proteínas nsp1, nsp3 (PLpro), nsp13-14, ORF6, ORF8, N y S de SARS-CoV-2 disminuyen significativamente la activación del promotor con elementos ISRE	65

Figura 38. La proteína ORF6 de SARS-CoV-2 inhibe la translocación nuclear de STAT1. (A) Microscopía confocal de células HEK293T cotransfectadas con STAT1 y ORF6.....	66
Figura 39. La proteína ORF3b de SARS-CoV-2 reduce significativamente la activación del promotor de IFN- β y los transcritos del gen IFNB1	67
Figura 40. La ausencia de la secuencia NLS disminuye la localización nuclear y mejora el potencial inhibitorio de ORF3b Tor2 sobre la activación del promotor de IFN- β	68
Figura 41. Las proteínas nsp1, nsp6, nsp13 y ORF6 de SARS-CoV-2 reducen significativamente la activación del promotor de IFN- β	70
Figura 42. Las proteínas nsp1, nsp6, nsp13 y ORF6 de SARS-CoV-2 reducen la activación del promotor de IFN- β a distintos niveles de la vía por RLRs.....	71
Figura 43. Las proteínas nsp6 y nsp13 de SARS-CoV-2 reducen la activación de IRF3 a través de distintos mecanismos.....	72
Figura 44. La proteína ORF6 de SARS-CoV-2 inhibe la translocación nuclear de IRF3 e interactúa con KPNA2.....	72
Figura 45. SARS-CoV-2 emplea proteínas estructurales, nsps y accesorias para reducir la activación de STAT1 y STAT2.....	73
Figura 46. La proteína ORF6 de SARS-CoV-2 inhibe la translocación nuclear de STAT1	74
Figura 47. La ausencia del receptor IFNAR conduce a bajos niveles de IFN- β , CCL-2, TNF e IL-6	76
Figura 48. Los ratones WT BALB/c presentan un mayor porcentaje de células IMM activadas	77
Figura 49. La cantidad de células IMM productoras de CCL2, TNF, IL-6 e IL-1 β es mayor en ratones WT BALB/c	78
Figura 50. El uso de anticuerpos para el bloqueo de CCR2 y BST-2 protege de una infección letal al 100% de ratones BALB/c tratados	78
Figura 51. Efectos de la síntesis y señalización temprana y tardía de INF-I.....	80
Figura 52. La administración tardía de IFN- β recombinante no protege de una infección subletal y provoca un aumento en la cantidad IMM activados.....	81
Figura 53. El uso de anticuerpos para el bloqueo de CCR2 protege de una infección letal al 60% de ratones BALB/c tratados	81
Figura 54. Perfil de linfocitos en pacientes con COVID-19 moderada, severa y crítica, determinada por citometría de masas.....	84

Figura 55. Puntaje ISG y niveles plasmáticos de IFN- α 2 en pacientes con COVID-19 moderada, severa y crítica	85
Figura 56. Niveles plasmáticos de IL-6, TNF- α e IL-1 β en pacientes con COVID-19 moderado, severo y crítico	86
Figura 57. En pacientes con COVID-19 los niveles plasmáticos de CCL2 se encuentran elevados	87
Figura 58. Niveles de expresión de genes codificantes para proteínas involucradas en las vías de síntesis de IFN-I durante las etapas Pre-ICU, ICU y Post-ICU. DDX58, DHX58 codificantes de RIG-I y MDA5	88
Figura 59. Niveles de IFN- α en el suero de pacientes con COVID-19 en estado crítico	89
Figura 60. Niveles plasmáticos de IFN- α 2, CRP, IL-6 e IP-10 en pacientes con COVID-19 en estado crítico	90
Figura 61. Densidad celular de distintos grupos de macrófagos (según su expresión diferencial de genes) en voluntarios sanos (HC) y pacientes con COVID-19 en estado moderado (M) y severo (S)	93
Figura 62. Niveles de citocinas IL-6, IL-8 e IL-1 β en pacientes con COVID-19 en estado moderado y severo	93
Figura 63. Niveles de quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4, CCL7 y CCL8 en pacientes con COVID-19 en estado moderado (M) y severo (S).....	94
Figura 64. Resumen gráfico del contenido.....	95
Figura 65. La proteína ORF6 de SARS-CoV-2 comparte un 66.6% de identidad respecto a su ortóloga en SARS-CoV	99
Figura 66. El dominio PLpro de la cepa Wuhan-WIV04 SARS-CoV-2 presenta mutaciones cruciales que afectan su actividad DUB	99
Figura 67. La variante ORF3b Ecuador de SARS-CoV-2 carece de la secuencia NLS y presenta una elongación de 34 residuos de aminoácidos	100
Figura 68. Propuesta de fármacos y blancos terapéuticos para el control de tormenta de citocinas e hiperinflamación en pacientes con COVID-19	108

Índice de tablas.

Tabla 1. Características clínicas de pacientes con COVID-19 en estado crítico, grupos INF-negativo e INF-positivo. Tomado de: Trouillet-Assant et al. (2020).	91
Tabla 2. Proteínas de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 y sus posibles mecanismos como antagonistas de IFN-I.....	96
Tabla 3. Hallazgos relacionados con la desregulación de IFN-I en pacientes con COVID-19.....	104

Listado alfabético de siglas y abreviaturas empleados en este trabajo.

(-)gRNA (negative-sense genomic RNA).
(+)gRNA (positive-sense genomic RNA).
2'-5' OAS (2'-5' OligoAdenilate Synthase).
3CLpro (3 Cysteine-Like protease).
A (Adenosina).
ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2).
ADAR (Adenosine Deaminase Acting on RNA).
AP-1 (Activator Protein 1).
ATF2 (Activating Transcription Factor 2).
BALF (BronchoAlveolar Lavage Fluid).
BST-2 (Bone marrow STromal antigen 2).
CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain).
CCL2 (C-C motif Ligand 2).
CCR2 (C-C chemokine Receptor type 2).
CD69 (Cluster of Differentiation 69).
COVID-19 (COronaVirus Disease 2019).
CRP (C Reactive Protein).
CS (Core Sequence).
CXCL9 (C-X-C motif Ligand 9).
DMVs (Double-Membrane Vesicles).
DPP4 (DiPeptidyl Peptidase-4).
dsRNA (double-stranded RNA).
DUB (DesUBiquitinasa).
E (Envelope).
EGFP (Enhanced GFP).
eIF-2 (eukaryotic Initiation Factor 2).
ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).
ER (Endoplasmic Reticulum).
ERGIC (ER-Golgi Intermediate Compartment).
ExoN (ExoNuclease).
FE (mujer mayor, 63 años).
FNII-like (FibroNectin type II-like).
FY (mujer joven, 32 años).
G (Guanosina).
GAPDH (GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase).
GDP (Guanosine DiPhosphate).
GFP (Green Fluorescent Protein).
GISAID (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data).
GTP (Guanosine TriPhosphate).
HA (HemAgglutinina).
HCoV (s (Human CoronaViruses).
HeLa (Henrietta Lacks).
Hpi (Horas post-infección).
Hpt (Horas post-transfección).
I (Iosina).
IcSARS (Infectious clone SARS strain).
ICU (Intensive Care Unit).
IFITM (InterFeron-Induced TransMembrane protein).
IFNAR (InterFeron- α/β Receptor).
IFN-I (InterFeroNes de tipo I).
IKK ϵ (Inhibitor of NF κ B Kinase ϵ).
IL-1 (InterLeukin 1).
IP-10 (IFN-gamma-induced Protein 10).
IRF3 (IFN Regulatory Factor 3).
ISGF3 (IFN-Stimulated Gene Factor 3 complex).
ISGs (Interferon Stimulated Genes).
ISREs (Interferon-Stimulated Response Elements).
I κ B α (Inhibitor of NF κ B α).
Jak-STAT (Janus kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription).
JNK (Jun N-terminal Kinase).
Kb (kilobase).
KPNA1 (KarioPheriN Alpha 1).
KPNB1 (KarioPheriN Beta 1).
L seq (Leader sequence).
Luc (Luciferasa).
M (Membrane).
MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase).
MAVS (Mitochondrial AntiViral-Signaling).

MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated protein 5).

ME (Hombre mayor, 67 años).

MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome CoronaVirus).

MHC-I (Major Histocompatibility Complex I).

MHV (Murine Hepatitis Virus).

MKK4 (MAPK Kinase Kinase 4).

MKKK7 (MAPK Kinase Kinase Kinase 7).

MY (Hombre joven, 38 años).

MyD88 (Myeloid Differentiation primary-response protein 88).

N (Nucleocapsid).

NFκB (Nuclear Factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells).

NK (Natural Killer).

NLS (Nuclear Localization Sequence).

NS1 (NonStructural 1 protein).

Nsps (Non-structural proteins).

OMS (Organización Mundial de la Salud).

ORFs (Open ReadinG Frames).

PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns).

PBS (Phosphate-Buffered Saline).

pDCs (plasmatocytoid Dendritic Cells).

Peli1 (Pellino homolog 1).

PFU (Plaque-Forming Units).

Pi (Post-infección).

PKR (Protein Kinase dsRNA-activated).

PLA (Proximity Ligation Assay).

PLpro (Papain-Like protease).

Poly(I:C) (PolyInosinic: polyCytidylic acid).

Pp1a (Polyprotein 1a).

PRRs (Pattern Recognition Receptors).

qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction).

RBD (Receptor-Binding Domain).

RdRp (RNA deependent RNA polymerase).

RIG-I (Retinoic acid-Inducible Gene I).

RLRs (RIG-I Like Receptors).

RTC (Replication and Transcription Complex).

RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction).

S (Spikes).

SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus).

SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2).

scRNA-seq (single-cell RNA sequencing).

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

SeV (Sendai Virus).

sg mRNA (subgenomic messenger RNA).

sgRNAs (subgenomic RNAs).

SH2 (Src Homology 2).

STING (STimulator of Interferon Genes).

TANK (TRAF family member-Associated NFκB activator).

TBK1 (TANK-Binding Kinase 1).

TCID₅₀ (Fifty percent Tissue Culture Infectious Dose).

TFN-α (Tumor Necrosis Factor α).

TLRs (Toll-Like Receptors).

TMA (Trabajo Monográfico de Actualización).

TMPRSS2 (TransMembrane Protease Serine 2).

TRAF (TNF Receptor-Associated Factor).

TRIF (Toll interleukin-1 Receptor domain-containing adapter protein inducing IFN-β).

TRIM25 (TRIMpartite Motif-containing protein 25).

TRSs (Transcription Regulatory Sequences).

Tyk2 (Tyrosine kinase 2).

Ub (Ubiquitina).

Ub2 (Ubiquitin-binding domain 2).

UTR (UnTranslated Region).

viSNE (visualization of t-distributed Stochastic Neighbor Embedding).

VP24 (Viral Protein 24).

WT (Wild Type).

RESUMEN.

Durante un periodo menor a 20 años, los *Betacoronavirus* SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 han causado tres pandemias, entre las cuales, la de COVID-19 causada por SARS-CoV-2, ha destacado por su duración prolongada, el elevado número de contagios y defunciones. Las infecciones por SARS-CoV y MERS-CoV inducen una producción pobre de IFN-I (IFN- α e IFN- β) e ISGs, que son proteínas con actividad antiviral. La capacidad de estos coronavirus para evadir el reconocimiento y activación de la respuesta inmune innata del hospedero mediada por IFN-I, está relacionada con la actividad de varias proteínas estructurales y no estructurales. Investigaciones realizadas con SARS-CoV y MERS-CoV han identificado proteínas con actividad anti IFN-I, entre las cuales se encuentran, N, M, PLpro y ORF3b como inhibidores de la síntesis de IFN-I, y ORF6 como antagonista de la señalización de IFN-I. La interferencia sobre las vías de señalización que conducen a la síntesis y expresión de IFN-I e ISGs está asociada al establecimiento de una respuesta inmune exacerbada y el desarrollo de síndrome respiratorio en las infecciones por SARS-CoV y MERS-CoV. El objetivo de este trabajo es revisar la literatura científica concerniente a los antagonistas de IFN-I presentes en SARS-CoV y MERS-CoV para así determinar si debido a la relación taxonómica de SARS-CoV-2 con tales coronavirus, se conservan las proteínas con actividad anti IFN-I. Estudios recientes han demostrado que SARS-CoV-2 conserva los antagonistas N, M, PLpro, ORF3b y ORF6, además de poseer diversas proteínas con actividad inhibitoria sobre la señalización de IFN-I, lo cual se ha asociado a los bajos niveles de IFN- α e hiperinflamación pulmonar en pacientes con COVID-19.

1 INTRODUCCIÓN.

1.1 Planteamiento del problema: Introducción al género *Betacoronavirus* y los problemas de salud ocasionados por SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2.

Los coronavirus son un grupo de virus con envoltura y genomas de RNA no segmentados de cadena sencilla y sentido positivo. A la fecha, se han identificado ocho diferentes tipos de coronavirus que infectan humanos, también conocidos como HCoV (Human CoronaViruses), los cuales provocan enfermedades respiratorias. Entre ellos, se encuentran SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus), MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome CoronaVirus) y SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2), los cuales son coronavirus zoonóticos y altamente patogénicos (Fung & Liu, 2019). De acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, los coronavirus son clasificados en el orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae*. Basados en estudios serológicos y secuencia genómica, la subfamilia *Coronavirinae* se divide en cuatro géneros: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, y *Deltacoronavirus* (Woo *et al.*, 2012). Dentro del género *Betacoronavirus* hay cuatro linajes diferentes: A, B, C, y D. De los ocho coronavirus que infectan humanos, dos pertenecen al género *Alfacoronavirus*: HCoV-229E y HCoV-NL63, mientras que los seis restantes pertenecen a diferentes linajes de los *Betacoronavirus*. M-CoV, HCoV-OC43 y HCoV-HKU1 se encuentran en el linaje A, SARS-CoV y SARS-CoV-2 están dentro del linaje B, y MERS-CoV está clasificado en el linaje C (Figura 1) (Fung & Liu, 2019).

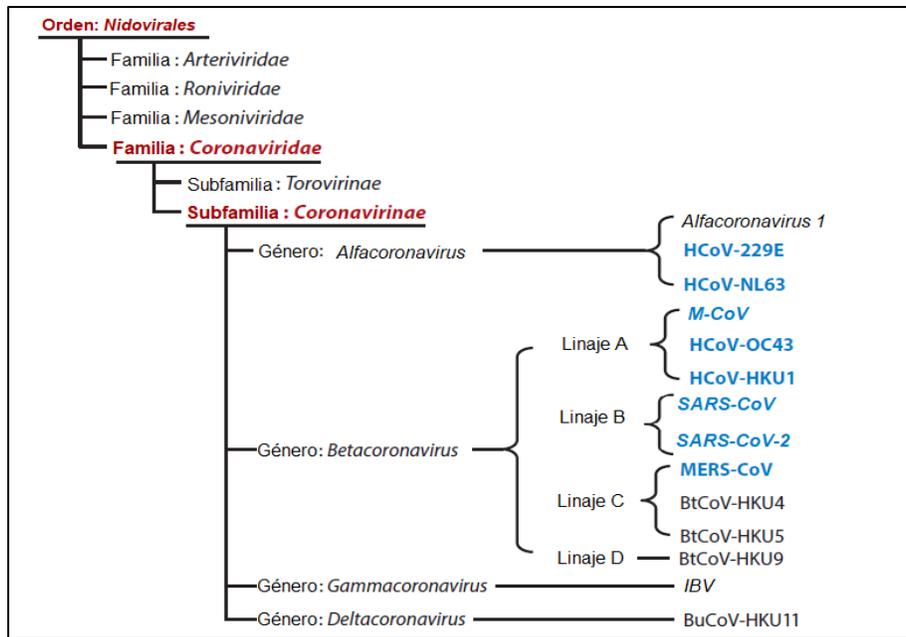


Figura 1. Taxonomía del orden Nidovirales. Los HCoV se han marcado con azul. Modificado de: Fung & Liu (2019).

Durante las dos primeras décadas del siglo XXI los coronavirus SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 han ocasionado pandemias con diferentes características e impactos. En noviembre del año 2002, en la provincia Guangdong, China se reportaron los primeros casos de pacientes con un nuevo tipo de enfermedad respiratoria viral. El agente etiológico fue identificado como SARS-CoV, un virus zoonótico originado en murciélagos de herradura (*Rhinolophus sinicus*) que posteriormente se adaptó para infectar a las civetas de palma (*Paguma larvata*) como hospedero intermedio, y finalmente a los seres humanos. Tras un periodo de incubación de 4 a 6 días los pacientes infectados por SARS-CoV desarrollaban síntomas similares a los de un resfriado y neumonía, la cual en casos severos conllevaba a insuficiencia respiratoria y síndrome de distrés respiratorio agudo. En julio de 2003, tras no detectarse más casos, se declaró el fin de la pandemia, la cual tuvo un saldo de más de 8000 casos reportados y una letalidad de aproximadamente 9.6% con 774 decesos en 27 países (Fung & Liu, 2019).

Años después, en junio de 2012 MERS-CoV se identificó como el agente causal de una enfermedad respiratoria similar a SARS con presencia en pacientes de Arabia Saudita. A pesar de que la transmisión entre humanos se considera limitada para este

virus, MERS-CoV causó brotes tanto en 2012 como en 2015, confirmándose más de 2000 casos y una tasa de letalidad de aproximadamente 35%. De manera similar a SARS-CoV, MERS-CoV se originó en murciélagos, posteriormente se adaptó a dromedarios como hospederos intermedios y finalmente desarrolló capacidad de infección en humanos (Fung & Liu, 2019).

A inicios de diciembre de 2019 se reportaron varios casos de una neumonía viral atípica en la ciudad de Wuhan, China. El aislamiento del virus responsable y la secuenciación de su genoma permitió la identificación de un nuevo coronavirus, inicialmente nombrado 2019-nCoV y posteriormente denominado SARS-CoV-2 por la OMS (Organización Mundial de la Salud). Asimismo, la enfermedad causada por dicho virus, se nombró como COVID-19 (proveniente de las palabras en inglés COronaVirus Disease, y 19 por el año 2019) (Ashour, Elkhabit, Rahman, & Elshabrawy, 2020). En lo que respecta a las estadísticas relacionadas con la actual pandemia por COVID-19, la OMS ha presentado en su sitio oficial que, al día 25 de enero de 2021, mundialmente se han reportado 98,794,942 casos confirmados, incluyendo 2,124,193 muertes. De las cifras totales a nivel mundial para la fecha indicada, México ha reportado 1,752,347 casos, de los cuales ha habido 149,084 decesos.

Previamente a la pandemia de 2002 causada por SARS-CoV, los coronavirus no eran considerados como agentes patogénicos de considerable relevancia clínica, ya que para ese tiempo los únicos coronavirus conocidos con capacidad infectiva en humanos, HCoV-229E y HCoV-OC43, sólo causaban síntomas leves de resfriado en las vías respiratorias superiores (Fung & Liu, 2019). Sin embargo, debido al efecto que han tenido las pandemias recientes por Coronavirus en la salud de la población aunado a las consecuencias sociales y económicas devastadoras en muchas regiones, es relevante conocer la biología de estos virus, así como las bases moleculares de las infecciones y mecanismos de transmisión.

De particular relevancia han surgido preguntas en torno a las diferencias existentes entre la capacidad de respuesta y resolución de la infección por parte del

hospedero ante las infecciones de los coronavirus HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 y HCoV-HKU1, que causan resfriado común en humanos (Fung & Liu, 2019), en comparación con la respuesta contra los coronavirus SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 cuyas infecciones pueden progresar hasta el desarrollo de síndromes respiratorios que eventualmente pueden provocar la muerte de los pacientes.

Una de las principales diferencias identificadas entre las infecciones por coronavirus que provocan enfermedades respiratorias leves, y las infecciones por SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2, implica que éstos últimos inducen una producción pobre de IFN-I (Interferones de tipo I). Por ejemplo, en células embrionarias de riñón humano HEK-293 infectadas con SARS-CoV, no se detecta el transcrito del gen que codifica IFN- β (Spiegel *et al.*, 2005). Investigaciones con cultivos *ex vivo* de tejido respiratorio infectados con MERS-CoV tuvieron una respuesta ineficiente para la producción de IFN-I (Chan *et al.*, 2013), mientras que el análisis de células epiteliales bronquiales humanas infectadas con SARS-CoV-2 mostró que dichas células mantenían niveles poco detectables de IFN-I (Blanco-Melo *et al.*, 2020).

La familia de IFN-I está conformada por 13 genes de IFN- α , un único tipo de IFN- β y otros subtipos de interferón que incluyen IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω e IFN- δ (Teijaro, 2016). La importancia de la síntesis de IFN-I y la señalización mediada por interferón recae en el papel que estos tienen en la mediación de la respuesta del hospedero. En lo que concierne al papel de IFN-I en las defensas celulares intrínsecas, estos inducen la expresión de ISGs (Interferon Stimulated Genes) produciendo así proteínas antivirales como PKR (Protein Kinase dsRNA-activated), el sistema 2'-5' OAS (2'-5' OligoAdenilate Synthase)-Rnasa L e IFITM (Interferon-Induced TransMembrane protein) (Teijaro, 2016).

Además de inhibir directamente la propagación viral, los IFN-I contribuyen a la modulación de la respuesta inmune, tanto la innata como la adaptativa. Sobre la primera, el IFN- α promueve la actividad de los linfocitos NK (Natural Killer), los cuales poseen capacidad citolítica, y sobre la segunda, inducen un incremento en la expresión

de la proteína MHC-I (Major Histocompatibility Complex I), misma que es necesaria para la estimulación, diferenciación y promoción del desarrollo de linfocitos T citotóxicos capaces de eliminar células infectadas (Teijaro, 2016).

La producción de IFN-I está asociada a la activación de vías de señalización tras el reconocimiento de componentes virales, principalmente dsRNA (double-stranded RNA), a través de receptores presentes en el citoplasma y anclados a membranas. Por otro lado, la respuesta mediada por interferón se encuentra regulada por el reconocimiento de IFN-I y la activación de la vía Jak-STAT (Janus kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription) que conlleva a la expresión de ISGs (Teijaro, 2016).

Diversos estudios con SARS-CoV y MERS-CoV han encontrado que algunas de las proteínas estructurales, no estructurales y accesorias de dichos coronavirus tienen la capacidad de interferir a distintos niveles sobre las cascadas de señalización implicadas tanto en la síntesis IFN-I como en la respuesta mediada por interferón (Totura & Baric, 2012). Estas investigaciones sugieren que el bloqueo de la producción de IFN-I y la respuesta a interferón representan uno de los principales motivos en el retraso de la respuesta temprana del hospedero, además de poder estar implicadas en la inducción de una respuesta inmune tardía e inoportuna.

El estudio de los mecanismos moleculares mediante los cuales la infección por SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 antagonizan la vía del interferón permitirá comprender la patogénesis de los Coronavirus y diseñar estrategias terapéuticas. Estos mecanismos radican en la función de distintas proteínas virales y en este trabajo de revisión se analizarán los estudios y evidencias experimentales diseñados para elucidar la función de las proteínas virales que interfieren con las cascadas de señalización y la expresión génica involucradas en la producción de IFN-I y la respuesta mediada por interferón.

1.2 Objetivo.

Revisar la literatura científica concerniente a la función de las proteínas virales que interfieren con las cascadas de señalización y la expresión génica involucradas en la producción de IFN-I y la respuesta mediada por interferón. Se centrará en el análisis sobre las proteínas de los coronavirus SARS-CoV y MERS-CoV para comparar las funciones homólogas en SARS-CoV-2.

1.3 Hipótesis.

SARS-CoV-2 posee proteínas que conservan similitudes estructurales y de actividad con aquellas proteínas de SARS-CoV y MERS-CoV que se ha identificado interfieren en la producción de IFN-I y la respuesta mediada por interferón, esto debido a que mantiene relación taxonómica con tales coronavirus.

1.4. Metodología.

Para la búsqueda bibliográfica se consultaron las siguientes bases de datos: PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), Biblioteca Digital UNAM (<https://www.bidi.unam.mx/>) y Scopus (<https://www.scopus.com/home.uri>), empleando los siguientes criterios:

Palabras clave: SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, COVID-19, type I interferon, interferon antagonism, ISG, cytokine storm.

Años: 2003-2020.

Se seleccionaron los artículos y revisiones más relevantes de acuerdo con los objetivos del TMA. Para el análisis de los artículos originales experimentales, su análisis sistemático se realizó a través de la rúbrica (ANEXO 1).

2. INFORMACIÓN GENERAL SOBRE EL TEMA.

En las siguientes dos secciones se presentan aspectos generales relacionados con la estructura y el ciclo replicativo de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2. Gran parte de la información mostrada corresponde a estudios realizados con MHV (Murine Hepatitis Virus), SARS-CoV, MERS-CoV, y más recientemente con SARS-CoV-2. En el desarrollo del contenido se abordan e indican las diferencias relevantes entre los coronavirus SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2.

2.1 Características generales de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2.

Los coronavirus presentan una morfología esférica o pleomórfica (pueden alterar su morfología), con un diámetro de 80 a 120 nm. La superficie del virión presenta proyecciones en forma de garrote constituidas por homotrímeros de la glicoproteína S (Spike) con un endodominio corto transmembranal tipo I con el que se ancla a la envoltura. La envoltura viral mantiene un soporte brindado por la proteína M (Membrane), la cual está embebida en la envoltura a través de tres dominios transmembranales tipo III. La proteína E (Envelope) es una pequeña proteína transmembranal que se encuentra en bajos niveles, mientras que la proteína N (Nucleocapsid) se une al RNA genómico en un estilo de “beads-on-a-string” o “cuentas sobre cuerda”, formando una estructura con simetría helicoidal (Figura 2) (Fung & Liu, 2019).

El genoma de los coronavirus está conformado por una molécula de RNA no segmentada, de cadena sencilla y sentido positivo, con una longitud que varía entre las especies y que va desde 27 hasta 32 kb (kilobases) que codifican 22 a 29 proteínas (Hartenian *et al.*, 2020). El RNA genómico presenta una región 5' UTR (UnTranslated Region) con la modificación cap y una región 3' UTR con poliadenilación, además de múltiples ORFs (Open Reading Frames) o marcos abiertos de lectura. Como se esquematiza en la Figura 3, en los diferentes coronavirus existe un orden conservado de los genes, expresado como 5'-replicasa-S-E-M-N-3'. En esta secuencia las Nsps (Non-structural proteins o proteínas no estructurales) se engloban como parte de la región replicasa que está constituida por dos ORFs: ORF1a y ORF1b, mientras que los

ORFs que codifican para las cuatro proteínas estructurales S, E, M y N se indican con su respectiva inicial. Asimismo, cabe destacar que existe un conjunto de ORFs que codifican proteínas accesorias, los cuales se encuentran distribuidos entre los genes estructurales (Fung & Liu, 2019).

En particular, el genoma de SARS-CoV-2 tiene un tamaño aproximado de 30 kb y comparte un 82% de identidad con el genoma de SARS-CoV. El genoma de SARS-CoV-2 codifica 16 nsps (nsp1-16 contenidas en ORF1a y 1b), cuatro proteínas estructurales (S, E, M y N) y nueve proteínas accesorias (ORF3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 9c y 10) (Chan *et al.*, 2020).

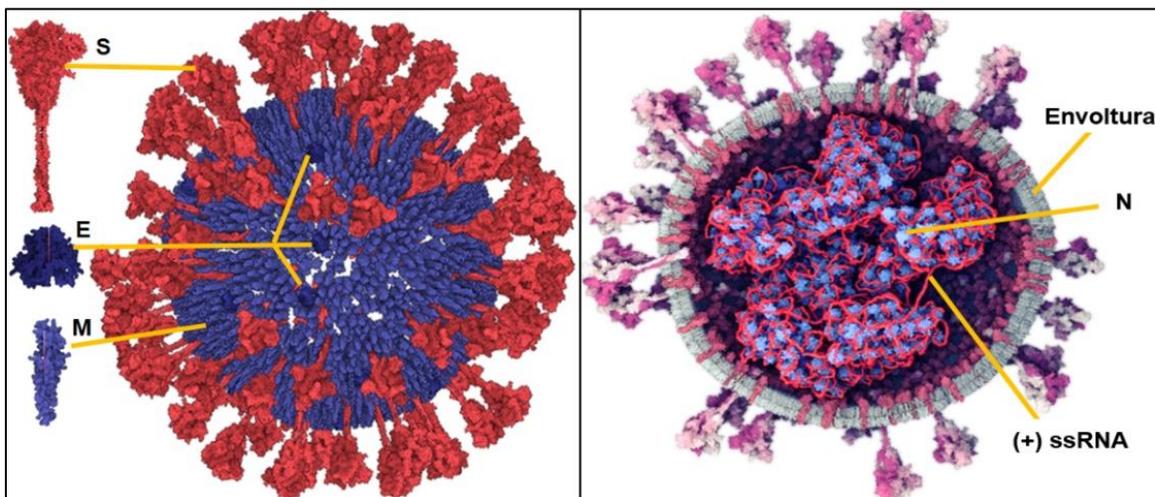


Figura 2. Estructura general de los coronavirus SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2. Modificado de: Nguyen *et al.* (2020).

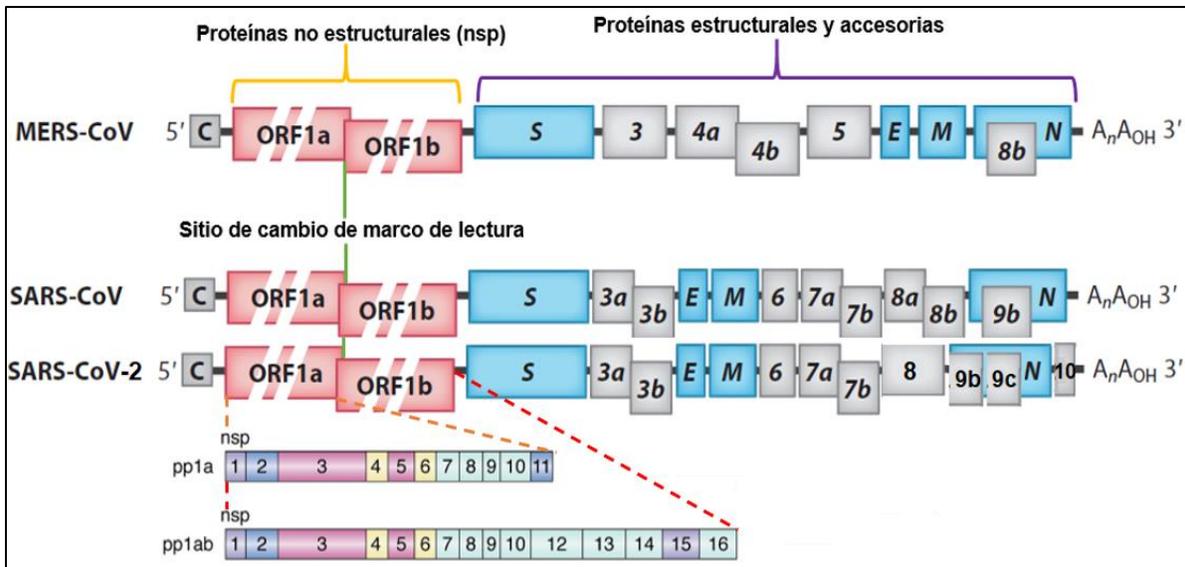


Figura 3. Organización del genoma de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2. Modificado de: Fung & Liu, 2019, y Hartenian et al. (2020).

2.2 Ciclo replicativo de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2.

2.2.1 Reconocimiento y entrada a la célula.

El ciclo de replicación de los coronavirus comienza con la unión de la proteína S a los receptores presentes en la superficie de la célula blanco. La proteína S se compone de dos dominios funcionales S1 (bulbo) que es el RBD (Recceptor-Binding Domain), y S2 (tallo) implicado en la fusión de membranas. La activación de la capacidad de fusión de la proteína S requiere cortes enzimáticos en dos sitios. El primer sitio en ser escindido es la región que delimita los dominios S1 y S2 (S1/S2), provocando cambios conformacionales en la estructura de S2, seguido por un corte en S2' que promueve la fusión entre la envoltura viral y la membrana celular. Esta serie de eventos permiten la liberación de la nucleocápside en el citoplasma (Figura 4A) (Hartenian et al., 2020).

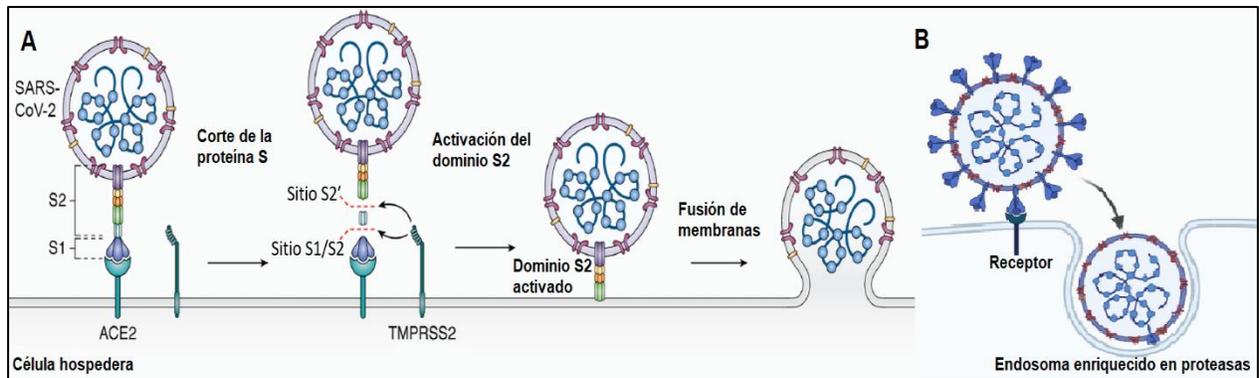


Figura 4. Eventos de reconocimiento y entrada de SARS-CoV-2 por (A) fusión directa con la célula hospedera y (B) endocitosis. *Modificado de: Hartenian et al. (2020).*

SARS-CoV y SARS-CoV-2 comparten como receptor a ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2), la cual es una peptidasa transmembranal que se expresa en la mayoría de los órganos, particularmente en el epitelio pulmonar y de intestino delgado. Para ambos coronavirus la proteólisis en los sitios S1/S2 y S2' es mediada por la proteasa TMPRSS2 (TransMembrane ProteaSe Serine 2), desencadenando la fusión de membranas. En lo que respecta a MERS-CoV, su proteína S es procesada en el sitio S1/S2 por la proteasa celular furina antes de su unión al receptor. Otra diferencia es que la proteína S de MERS-CoV emplea como receptor a la enzima DPP4 (DiPeptidyl Peptidase-4) (Hartenian *et al.*, 2020).

Un aspecto que no ha sido determinado por completo es si la entrada de los coronavirus ocurre directamente con la membrana plasmática o mediante endocitosis (Figura 4B). Tanto SARS-CoV como MERS-CoV han mostrado capacidad para emplear ambas vías, dependiendo de la célula a infectar y la célula en donde se produjeron los viriones, así como el procesamiento al que se sometió la proteína S. En el caso de MERS-CoV, si su proteína S es escindida durante su biosíntesis, únicamente requiere de un corte adicional en el sitio S2' que puede efectuarse por proteasas en la superficie celular, y por lo tanto su entrada es mediante fusión directa con la membrana plasmática. Sin embargo, cuando su proteína S no es previamente escindida, la entrada a un nuevo hospedero está mediada por endocitosis, proceso durante el cual la proteína S es activada por proteasas endosomales como las catepsinas. Bajo este último escenario, MERS-CoV únicamente es capaz de infectar células que se encuentren expresando niveles elevados de catepsinas (Hartenian *et al.*, 2020).

Una de las investigaciones que mayor información ha aportado respecto a la capacidad infectiva de SARS-CoV-2 en comparación con SARS-CoV, es el estudio de la similitud que comparten sus proteínas S. Los resultados obtenidos por el grupo de Wan *et al.* (2020) mostraron que gran parte de los residuos implicados en el reconocimiento del receptor ACE2 no están conservados en SARS-CoV-2, además de que la proteína S de este último presentó una afinidad 10 a 20 veces mayor por ACE2 que la proteína S de SARS-CoV. Esta diferencia en afinidad se ha atribuido a la formación de un puente salino entre la proteína S de SARS-CoV-2 y el receptor ACE2. Por otro lado, a diferencia de la proteína S de SARS-CoV, SARS-CoV-2 presenta una región polibásica de cuatro aminoácidos (-Pro-Arg-Arg-Ala-) entre los dominios S1/S2 que puede ser escindida por la enzima furina durante su biosíntesis, proceso que al igual que con MERS-CoV, potencia su capacidad de ingreso por fusión directa con la membrana plasmática (Hartenian *et al.*, 2020).

2.2.2 Traducción del complejo replicasa y ensamblaje de los Complejos de Replicación y Transcripción.

Una vez liberado el material genético viral en el citoplasma, se genera un conjunto de proteínas denominado replicasa. En los coronavirus el complejo replicasa está codificado por dos ORF que se traslapan (ORF1a y ORF1b), los cuales ocupan aproximadamente dos terceras partes del genoma y que se traducen directamente desde el RNA genómico. Por otro lado, los genes estructurales y accesorios son traducidos a partir de sgRNAs (subgenomic RNAs) generados durante la transcripción del genoma, tal y como se detallará más adelante (Fung & Liu, 2019).

Las proteínas nsps se encuentran codificadas en el ORF1a y ORF1b. La traducción del ORF1a genera a pp1a (polyprotein 1a) de 440 a 500 kDa que contiene desde la nsp1 hasta nsp11. Por otro lado, la traducción del ORF1b produce a pp1ab (polyprotein 1ab) con un peso de 740 a 810 kDa y que incluye la nsp1 hasta nsp16. La traducción del ORF1a o el ORF1b es dependiente de si se realiza o no la lectura del codón de paro al final del ORF1a. La omisión del codón de término ocurre mediante un fenómeno conocido como “ribosomal frameshifting”, en el cual el ribosoma realiza un

cambio en el marco de lectura del genoma viral desplazándose 1 nucleótido hacia atrás, es decir, un nucleótido río arriba del codón de paro, permitiendo la continuación de la traducción y la producción de pp1ab (Hartenian *et al.*, 2020).

El fenómeno de cambio de marco de lectura ocurre con una frecuencia del 40 al 50% de las ocasiones en que se realiza la traducción del ORF1a. Este evento se encuentra regulado y promovido por dos tipos de secuencias presentes en el RNA genómico. Cercano al codón de término existe una secuencia de heptanucleótidos 5'-UUUAAAC-3' denominada "slippery sequence" o secuencia resbaladiza, seguida río abajo por una estructura de pseudonudo de RNA que al ser muy estable provoca que el ribosoma se detenga al encontrar la secuencia resbaladiza, aumentando así la probabilidad de que el ribosoma se deslice 1 nucleótido río arriba del codón de paro y haya un cambio en el marco de lectura (Hartenian *et al.*, 2020).

La pp1a contiene nsps involucradas en el bloqueo del inicio de la respuesta inmune, además de participar como cofactores para la replicación y transcripción. Por otro lado, pp1ab incluye nsps que forman parte del replisoma. La liberación de cada nsp se lleva a cabo mediante cortes proteolíticos en cis y trans por las proteasas virales nsp3 y nsp5. Nsp3 contiene dos proteasas PLpro1 (Papain-Like protease 1) y PLpro2 (Papain-Like protease 2), mientras que nsp5 (considerada como la proteasa principal), es una proteasa de cisteína 3CLpro (3 Cysteine-Like protease), la cual escinde todas las nsps río arriba de nsp4 (Hartenian *et al.*, 2020).

Un subconjunto de nsps se asocian para formar el complejo RTC (Replication and Transcription Complex), el cual está conformado por nsp12 que tiene actividad RdRp (RNA dependent RNA polymerase), nsp7 y nsp8 como factores de procesividad, nsp13 con actividad de helicasa, nsp9 con dominio de unión a ácidos nucleicos monocatenarios, nsp14 con actividad ExoN (ExoNuclease) para corrección de errores, además de otros cofactores como nsp10, y nsp16 involucrada en el proceso de capping (adición del cap al extremo 5' del RNA) (Figura 5) (Hartenian *et al.*, 2020).

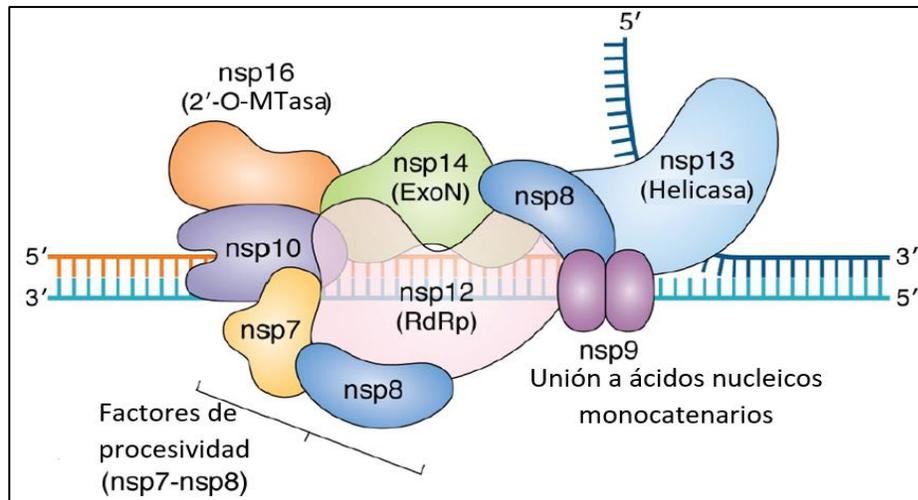


Figura 5. Modelo del replisoma de los Coronavirus. *Modificado de: Hartenian et al. (2020).*

Estudios con nsp3 y nsp4 han demostrado que estas proteínas pueden oligomerizarse y producir curvaturas a través de interacciones con sus dominios luminales, con lo que inducen rearrreglos de membranas derivadas del ER (Endoplasmic Reticulum), a partir de las cuales se forman DMVs (Double-Membrane Vesicles). Durante la infección, la membrana interna de las DMVs permanece sellada, mientras que la membrana externa forma una red continua de membranas invertidas que se comunican con el retículo endoplásmico rugoso, separando así los sitios de replicación de RNA del compartimento ERGIC (ER-Golgi Intermediate Compartment) (Hartenian et al., 2020).

Mediante la interacción de nsp3 y nsp4 se recluta a nsp6, la cual ancla RTCs a las DMVs. La formación de DMVs confiere un ambiente aislado del resto de la célula que permite evadir el reconocimiento por parte de los sensores celulares, además de localizar y aumentar la concentración de los componentes requeridos por la maquinaria de replicación y transcripción. Estudios con MHV han demostrado que el microambiente de las DMVs incluye proteínas del hospedero tales como factores de inicio de la traducción y proteínas de la vía secretora temprana (Figura 6) (Fung & Liu, 2019).

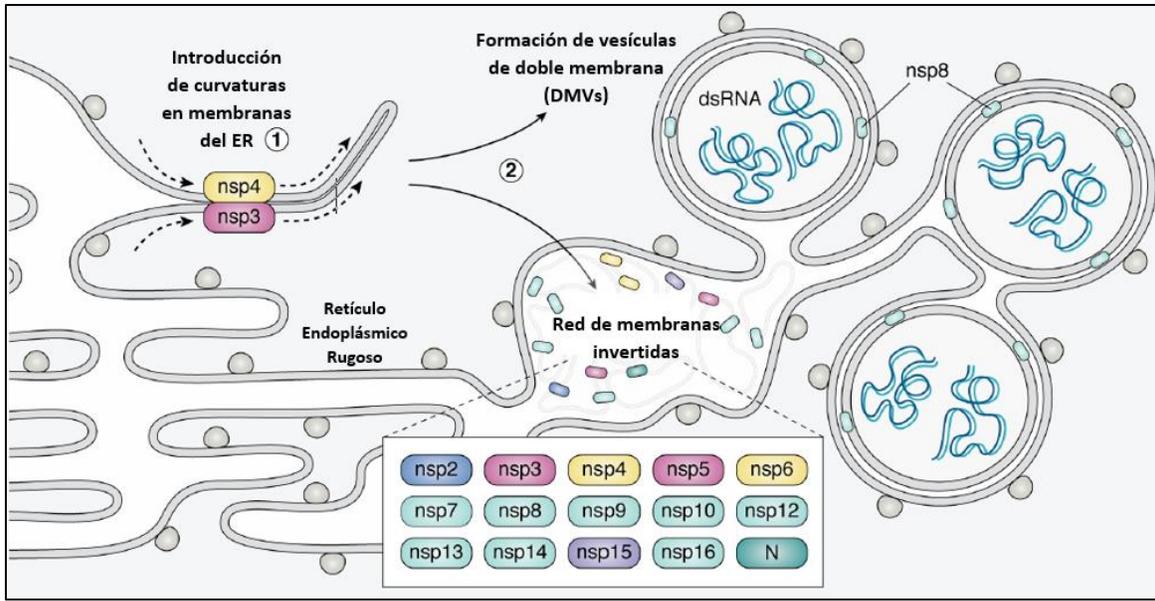


Figura 6. Formación de vesículas de doble membrana y red de membranas invertidas. Modificado de: Hartenian et al. (2020).

2.2.3 Replicación, transcripción y procesamiento de RNA viral.

La replicasa de los coronavirus emplea como templado el genoma viral (+)gRNA (positive-sense genomic RNA) para sintetizar una copia completa con sentido negativo (-)gRNA (negative-sense genomic RNA) que posteriormente es utilizada como molde para la producción de un gran número de copias de (+)gRNA. El mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la replicación del genoma a partir de (-)gRNA aún no ha sido completamente elucidado, sin embargo, se ha propuesto la participación de diversos elementos reguladores en cis presentes en los extremos 5' y 3' de la molécula de RNA (Hartenian et al., 2020).

Además de participar en la replicación del genoma, los RTCs llevan a cabo la síntesis de (-)sgRNAs, los cuales son producidos a partir de ORFs cercanos al extremo 3' del genoma. Posteriormente, con los (-)sgRNAs se generan (+)sgRNAs que son utilizados como sg mRNA (subgenomic messenger RNAs). Los sg mRNAs son 3' coterminales y poseen la secuencia L seq (Leader sequence) derivada del extremo 5' del genoma viral, cuya función es proteger a los sg mRNA del bloqueo y degradación mediada por nsp1 (Hartenian et al., 2020).

La síntesis de (-)sgRNAs se lleva a cabo mediante un mecanismo de transcripción discontinua promovida por la presencia de secuencias TRSs (Transcription Regulatory Sequences). Durante la síntesis de (-)sgRNAs, el complejo RdRp pausa la transcripción en los sitios donde se encuentran las TRSs, es decir, río abajo de L seq (TRS-L) y en el extremo 5' del cuerpo de cada ORF (TRS-B), excepto en ORF1a y ORF1b. Dentro de las TRS-L y TRS-B hay una secuencia CS (Core Sequences) altamente conservada, de modo que cuando la polimerasa está transcribiendo un ORF y se encuentra con la CS de TRS-B puede detenerse y moverse a través de una larga interacción de tipo RNA-RNA, hasta encontrar la CS de TRS-L. Por complementariedad de las CSs, la polimerasa cambia de templado y continúa la transcripción del ORF añadiendo la L seq para generar el (-)sgRNA (Hartenian *et al.*, 2020).

Con relación al procesamiento del RNA viral, debido a que la traducción del (+)gRNA y los sg mRNAs es dependiente de la maquinaria celular, dichos RNAs requieren modificaciones que les permitan ser leídos por los ribosomas y no ser reconocidos por los sistemas de detección del hospedero.

Estudios acerca del proceso de capping de los RNA virales proponen que nsp13 escinde el γ -fosfato del nucleótido en el extremo 5' de los RNAs, produciendo un nucleótido difosfato al cual se adiciona guanosina monofosfato, acción que se sugiere es realizada por nsp12 con su actividad de guanililtransferasa. Finalmente, se ha propuesto que nsp14 metila la posición N7 de la guanina, mientras que nsp16 metila las posiciones 2'-O del primer y segundo nucleótidos (Hartenian *et al.*, 2020).

La poliadenilación del extremo 3' es necesaria para la regulación y eficiencia de la traducción de los mRNAs virales, además de ser esencial para la replicación de RNAs de sentido negativo, sin embargo, se desconoce si la cola de poli(A) es añadida por la RdRp o si las polimerasas de poli(A) celulares son reclutadas para realizar este proceso (Hartenian *et al.*, 2020).

2.2.4 Traducción de proteínas estructurales, ensamblaje y liberación de viriones.

La mayoría de los sg mRNAs son monocistrónicos y por lo tanto, únicamente los ORF que contienen un extremo 5' con la modificación cap son traducidos. Sin embargo, algunos sg mRNAs emplean otros mecanismos para leer ORFs traslapados, tales como el cambio de marco de lectura o cambio en el sitio de entrada del ribosoma (Fung & Liu, 2019).

Las proteínas estructurales con dominios transmembranales como S, M y E, además de otras proteínas accesorias son traducidas en el ER debido a que necesitan de chaperonas como la calnexina, mientras que la proteína N es traducida en el citoplasma por ribosomas citosólicos (Fung & Liu, 2019). Estudios con MHV han demostrado que únicamente el (+)gRNA contiene una señal de empaquetamiento localizada en el ORF1b, dentro del gen nsp15, la cual forma una estructura de tallo-bucle que es reconocida por la proteína N para formar la nucleocápside. Sin embargo, análisis del genoma de SARS-CoV y MERS-CoV mostraron que dicha señal está ausente, por lo que aún no se elucida el mecanismo a través del cual N reconoce específicamente el RNA genómico (Hartenian *et al.*, 2020).

Una vez producidas las proteínas estructurales, accesorias y la nucleocápside, se requiere transportar todos estos componentes hacia el sitio de ensamblaje que se localiza en ERGIC, el cual es un compartimento ubicado entre el RE y el aparato de Golgi. La proteína M regula el ensamblaje de los viriones funcionando como andamio para guiar la morfogénesis de los coronavirus, mientras que interacciones M-S y M-N participan en el reclutamiento de los componentes estructurales y el genoma viral (en la nucleocápside) hacia el sitio de ensamblaje. La interacción de E con M introduce los componentes virales hacia el lumen de ERGIC e induce curvaturas en sus membranas para dar lugar a la formación de la envoltura viral y producir viriones inmaduros (Fung & Liu, 2019).

Posteriormente, los viriones inmaduros son transportados dentro de vesículas hacia el aparato de Golgi, donde los viriones maduran con la glicosilación de las proteínas de envoltura. Finalmente, al llegar a la red trans del aparato de Golgi, los

viriones maduros son empacados en vesículas etiquetadas para su transporte hacia la membrana plasmática, donde se fusionan y liberan a los viriones por exocitosis. Asimismo, se ha identificado que los coronavirus utilizan proteínas del citoesqueleto celular, tales como las tubulinas, para facilitar los procesos de ensamblaje y liberación (Fung & Liu, 2019).

2.3 Detección de la infección viral y producción de IFN-I y citocinas.

La producción de IFN-I está asociada a la activación de vías de señalización tras el reconocimiento de componentes virales o ácidos nucleicos intermediarios de su replicación (Figura 7), ambos denominados PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Los PAMPs son percibidos por un conjunto de proteínas muy diversas denominadas PRRs (Pattern Recognition Receptors), que se encuentran en el citoplasma, vesículas, endosomas, lisosomas y en la membrana plasmática (Kindler, Thiel, & Weber, 2016).

Algunos de los PRRs citoplásmicos son los RLRs (RIG-I Like Receptors), entre los cuales se encuentran RIG-I (Retinoic acid-Inducible Gene I) y MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated protein 5). Estos receptores contienen un dominio C-terminal con actividad de helicasa, por lo que reconocen moléculas de RNA formadas como intermediarios durante la replicación viral. RIG-I detecta moléculas cortas de dsRNA con extremos 5' tri o difosforilados y ssRNA con regiones poli(U) o ricas en UC. Por otro lado, MDA5 reconoce moléculas largas de dsRNA, principalmente las que forman estructuras secundarias ordenadas, además de unirse a ssRNA de sentido negativo y mRNA hipometilados en el cap del extremo 5' (Kindler *et al.*, 2016).

La interacción entre el RNA y RIG-I causa un cambio conformacional en ésta que se refleja por la exposición de un dominio CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain), el cual es reconocido y poliubiquitinado por la ligasa E3 de ubiquitina, TRIM25 (TRIpartite Motif-containing protein 25) (Newton & Dixit, 2012). Mediante esta cadena de poliubiquitina, RIG-I interactúa con una de las subunidades de un dímero de STING (STimulator of INterferon Genes), una proteína de andamio que facilita la asociación de

RIG-I con la proteína mitocondrial MAVS (Mitochondrial AntiViral-Signaling). La formación del complejo RIG-I/STING/MAVS permite el reclutamiento de proteínas río abajo en la cascada de señalización. Cabe destacar que MDA5 es capaz de activar las mismas vías que RIG-I, ya que igualmente interacciona con MAVS, sin embargo, la cadena de poliubiquitina a la cual se une su dominio CARD no involucra la actividad de TRIM25, y no se ha identificado que MDA5 requiera de la modulación de STING para interaccionar con MAVS (Sun *et al.*, 2012).

MAVS recluta factores TRAF (Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor), en específico, TRAF 3 y 6. Ambos factores tienen actividad de ligasa E3 de ubiquitina, de modo que con la formación de cadenas de poliubiquitina reclutan y activan proteínas cinasas. TRAF3 activa a IKK ϵ (Inhibitor of NF κ B Kinase ϵ) y TANK (TRAF family member-Associated NF κ B activator), que a continuación activa a TBK1 (TANK-Binding Kinase 1). Finalmente, TBK1/IKK ϵ fosforilan a IRF3 (IFN Regulatory Factor 3) e IRF7, los cuales forman homodímeros y heterodímeros para translocarse al núcleo y regular la expresión de IFN-I (Newton & Dixit, 2012).

Por otro lado, TRAF6 se une a la subunidad moduladora IKK γ del complejo IKK, con lo cual las subunidades catalíticas IKK α /IKK β fosforilan a I κ B α (Inhibitor of NF κ B α), liberando así a NF κ B (Nuclear Factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells) que se transloca al núcleo para promover la expresión de citocinas proinflamatorias (principalmente en células del sistema inmune) como IL-1 (InterLeukin 1), IL-6, IL-8, TNF- α (Tumor Necrosis Factor α), e IFN-I (en todas las células nucleadas) (Kindler *et al.*, 2016). Asimismo, TRAF6 activa una vía MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) que involucra a MKKK7 (MAPK Kinase Kinase Kinase 7), MKK4 (MAPK Kinase Kinase 4) y JNK (Jun N-terminal Kinase), siendo ésta última la cinasa que activa a los factores de transcripción ATF2 (Activating Transcription Factor 2) y c-Jun que conforman a AP-1 (Activator Protein 1) (Newton & Dixit, 2012).

Otro tipo de PRRs son los TLRs (Toll-Like Receptors), que son proteínas transmembranales localizadas en endosomas. En humanos se han identificado diez tipos diferentes de TLRs, de los cuales, TLR3 y 7 son los de mayor relevancia en el reconocimiento de PAMPs de los coronavirus. TLR3 reconoce moléculas de dsRNA

mientras que TLR7 se une a ssRNA (Figura 7). Asimismo, cada TLR recluta un cierto tipo de proteínas adaptadoras (Kindler *et al.*, 2016).

Después de su activación por unión a dsRNA, TLR3 interactúa con TRIF (Toll interleukin-1 Receptor domain-containing adapter protein inducing IFN- β) y TRAF3 para activar el complejo TANK/TBK1/IKK ϵ . Asimismo, TRAF1 une a la ligasa E3 de ubiquitina Peli1 (Pellino homolog 1), la cual funciona de manera similar a TRAF6 para activar al complejo IKK y la vía MAPK (Newton & Dixit, 2012).

La señalización por TLR7 requiere de MyD88 (Myeloid Differentiation primary-response protein 88) y TRAF3, a través de las cuales activa al complejo TANK/TBK1/IKK ϵ . De igual forma, Myd88 interactúa con TRAF6 para inducir al complejo IKK y la vía MAPK que conllevan a la liberación y translocación de los factores de transcripción NF κ B y AP-1, respectivamente (Kindler *et al.*, 2016).

El IFN- β es una de las citocinas que se producen en las etapas tempranas de la infección a través de estas vías de señalización. El gen *IFNB1* (codificante de IFN- β) es activado tras la formación del complejo “enhanceosome” o amplificador (del cual forman parte IRF3, IRF7, NF κ B y AP-1), el cual recluta enzimas remodeladoras de la cromatina y la RNA polimerasa II para promover la transcripción de dicho gen. Asimismo, la producción de IFN- β activa un mecanismo de retroalimentación positiva que induce la producción de IFN- α , además de potenciar la expresión de *IFNB1*, con lo cual se refuerza la producción de IFN-I (Honda & Takaoka, 2006).

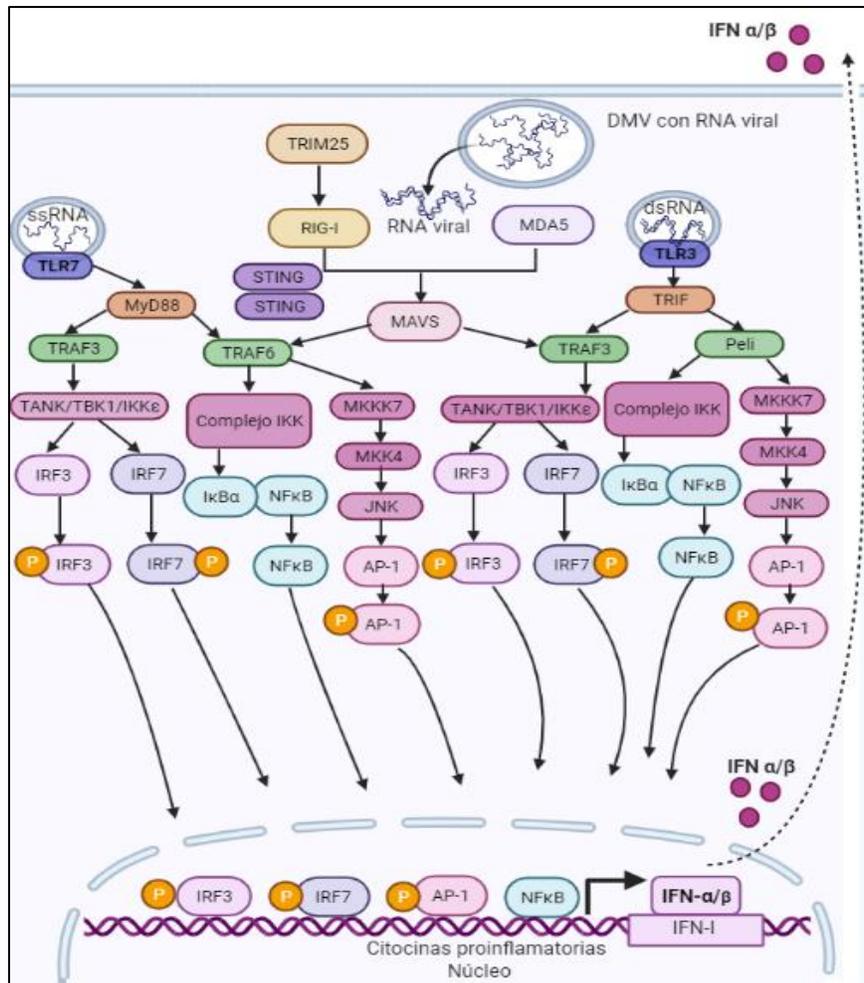


Figura 7. Mecanismos de reconocimiento de PAMPs de los coronavirus e inducción de síntesis de citocinas proinflamatorias e IFN-I. Las proteínas adaptadoras se muestran en anaranjado y las cinasas en morado.

A pesar de que los mecanismos de reconocimiento y vías de señalización antes descritos se encuentran conservados en todas las células del cuerpo humano, existe una diferencia en la expresión de los PRRs. Los RLRs se producen en todas las células nucleadas y son los receptores principalmente empleados por las células epiteliales alveolares tipo 1 y 2 para la producción de IFN-I. Por otro lado, los TLRs se encuentran preferencialmente expresados en células del sistema inmune, tales como los macrófagos alveolares y las pDCs (plasmacytoid Dendritic Cells), y por ende son los receptores más utilizados por la respuesta inmune innata para la síntesis de IFN-I y citocinas proinflamatorias. Las pDCs son las mayores productoras de IFN-I,

principalmente de IFN- α , y como se abordará más adelante, juegan un rol importante en la modulación de la respuesta inmune innata y adaptativa (Park & Iwasaki, 2020).

2.4 Respuesta a interferón: Activación de la vía Jak-STAT y expresión de ISGs.

La secreción de IFN- α e IFN- β por parte de células infectadas y células fagocíticas promueve una respuesta antiviral que comienza con la percepción de estas moléculas por el receptor IFNAR (Interferon- α/β Receptor), el cual está conformado por las subunidades IFNAR1 e IFNAR2 (Piehler, Thomas, Garcia, & Schreiber, 2012). Este receptor tiene expresión ubicua en células nucleadas, lo que permite que la señalización se lleve a cabo de manera autocrina y paracrina.

La unión de IFN- α o IFN- β , principalmente a IFNAR2 (subunidad de mayor afinidad por IFN-I), provoca la dimerización de las subunidades IFNAR1 e IFNAR2. Cada una de estas contiene en su extremo N-terminal un dominio de unión a ligando que a su vez está constituido por subdominios FNII-like (Fibronectin type II-like), en el caso de IFNAR2 por dos subdominios mientras que en IFNAR1 por cuatro. Además del dominio de unión a IFN-I, IFNAR1 e IFNAR2 poseen un dominio transmembranal y una región citoplásmica capaz de reclutar y activar proteínas cinasas. IFNAR1 recluta a Tyk2 (Tyrosine kinase 2) mientras que IFNAR2 une a Jak1. Después de su activación, Tyk2 y Jak1 fosforilan residuos de tirosina en los dominios citoplásmicos de IFNAR1 y 2, los cuales son reconocidos por los dominios SH2 (Src Homology 2) de las proteínas STAT1 y 2, respectivamente (Piehler *et al.*, 2012).

Al estar posicionados en proximidad a Jak1 y Tyk2, STAT1 y 2 son fosforilados en residuos de tirosina que posteriormente reconocen mutuamente mediante sus dominios SH2, con lo cual se promueve su dimerización. Finalmente, el heterodímero STAT1/2 se asocia con IRF9 para formar el complejo ISGF3 (Interferon-Stimulated Gene Factor 3 complex). Una vez translocado al núcleo, ISGF3 se une a los ISREs (Interferon-Stimulated Response Elements) presentes en los promotores de los ISGs e induce su transcripción (Figura 8) (Kindler *et al.*, 2016).

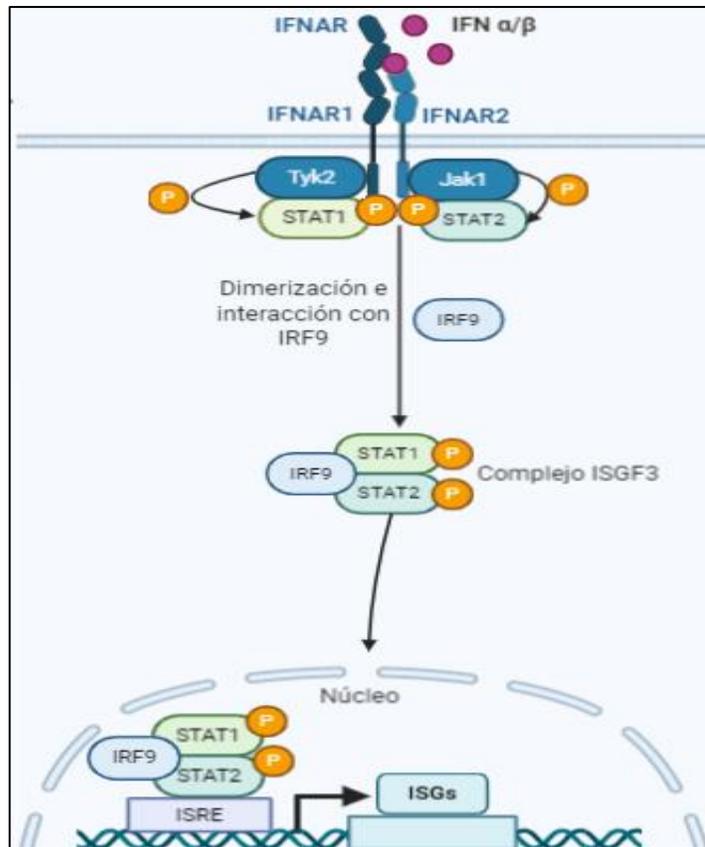


Figura 8. Activación de la vía Jak-STAT y expresión de ISGs.

La expresión de ISGs genera productos como IRF7 e IRF9 que potencian la síntesis de IFN- α e IFN- β y su señalización, respectivamente. Por otro lado, algunos de los ISG codifican proteínas tales como PKR, 2'-5'OAS-Rnasa L, ADAR (Adenosine Deaminase Acting on RNA) e IFITM que interfieren directamente en las distintas etapas de replicación de los coronavirus.

ISGs con actividad antiviral. PKR es una serina/treonina cinasa activada por dsRNA. Cuando dos PKRs se unen a la misma molécula de dsRNA, se produce un proceso de fosforilación mutua que desencadena cambios conformacionales que potencian sus actividades de cinasa. Uno de los sustratos fosforilados por PKR es la subunidad α de eIF-2 (eukaryotic Initiation Factor 2), lo que provoca la formación de un complejo inactivo en el que el factor eIF-2B es incapaz de catalizar el intercambio de GDP (Guanosine DiPhosphate) unido a eIF-2, por GTP (Guanosine TriPhosphate). Este bloqueo resulta en la inhibición de la traducción de RNAs virales y por lo tanto abatimiento en la producción de proteínas (Kindler *et al.*, 2016).

Otro de los sistemas antivirales producidos por la expresión de ISGs son las enzimas 2'-5'OAS-Rnasa L. La primera de ellas se activa al unirse a dsRNA y posteriormente produce oligómeros de ATP unidos mediante enlaces 2'-5', los cuales, activan a la Rnasa L para que degrade mRNAs, previniendo así la síntesis de proteínas tanto del hospedero como del virus. Asimismo, la degradación de mRNAs celulares produce RNAs pequeños con extremos 3' monofosforilados que son detectados por RIG-I y MDA5, lo cual conlleva a la amplificación de la producción de IFN-I (Kindler *et al.*, 2016).

ADAR es otra proteína generada por la expresión de ISGs. Su actividad consiste en la unión a dsRNA generado durante la replicación viral para catalizar la desaminación de A (Adenosina) a I (Iosina) y así desestabilizar dichas moléculas. Adicionalmente, esta modificación puede afectar la estructura y función de las proteínas virales, ya que durante la traducción I es leída como G (Guanosina), resultando en la incorporación de aminoácidos que no deberían estar presentes. De igual forma, en la replicación de RNA, la presencia de I provoca la incorporación de G, lo cual conlleva a alteraciones en el genoma viral (Samuel, 2012).

Por otro lado, ISGs como IFITM provocan un conjunto de alteraciones que bloquean la entrada de virus con envoltura, entre ellos, los coronavirus. IFITM induce la modificación de lípidos que resultan tanto en la exclusión de moléculas de agua, como en la disminución de la fluidez de la membrana del hospedero. Asimismo, se ha propuesto que mediante sus dos dominios transmembranales genera curvaturas que modifican la topología de los sitios donde se ancla, cambios que afectan negativamente el proceso de fusión de membranas (Li *et al.*, 2013).

ISGs en la regulación de la respuesta inmune. En lo que concierne al papel de la señalización mediada por IFN-I en las células del sistema inmunológico, el conjunto de ISGs se extiende a una gran variedad de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, tales como CCL2 (C-C motif ligand 2) y CXCL9 (C-X-C motif ligand 9) (Ivashkiv & Donlin, 2014). CXCL9 es un quimioatrayente que promueve la migración de células NK y linfocitos T citotóxicos al sitio de infección, además de estimular la diferenciación y activación de macrófagos alveolares que posteriormente sintetizan quimiocinas como

CCL2, CCL7 y CCL12 para atraer IMMs (Inflammatory Monocyte-Macrophages), macrófagos intersticiales, y otras células de la respuesta inmune innata y adaptativa que se encargan de resolver la infección (Figura 9) (Kindler *et al.*, 2016).

Asimismo, la producción de IFN-I promueve la actividad de las células NK e indirectamente induce un incremento en la expresión de la proteína MHC-I requerida para la activación de linfocitos T citotóxicos (Teijaro, 2016). De igual forma, los IFN-I inducen la transformación de las pDCs en células presentadoras de antígeno, con lo cual las pDCs participan como vínculo entre la respuesta inmune innata y la adaptativa (Figura 9) (Fitzgerald-Bocarsly & Feng, 2007).

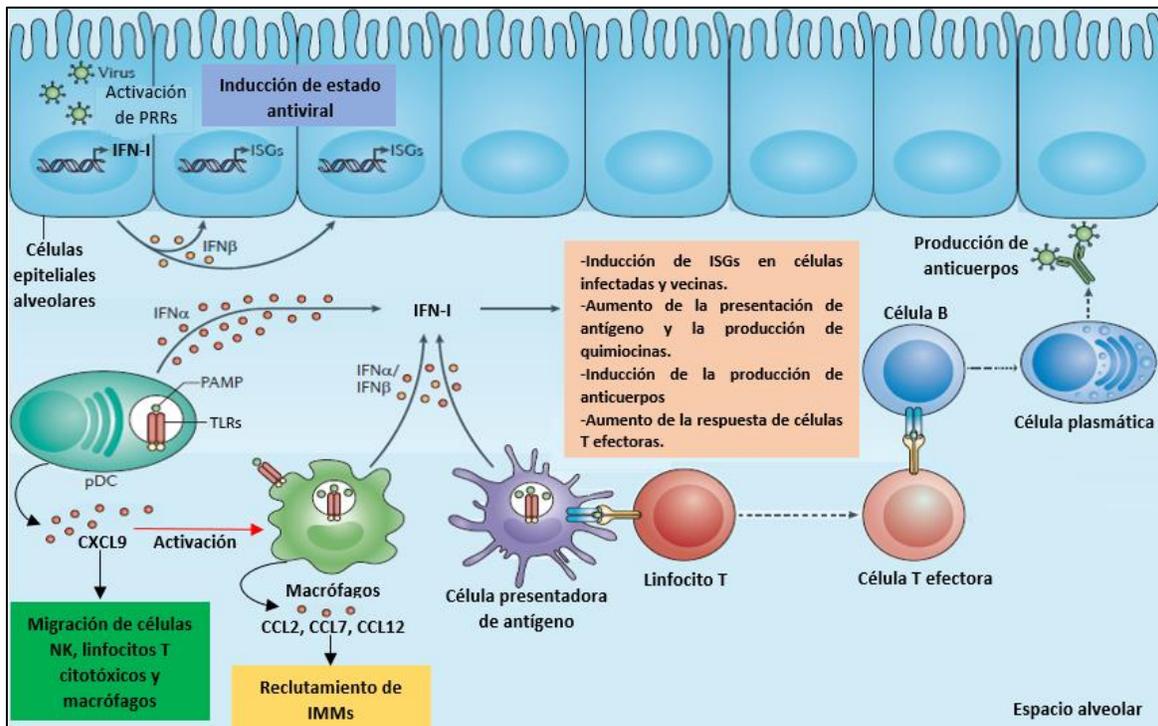


Figura 9. Papel de la señalización mediada por IFN-I en células infectadas y células del sistema inmunológico. Modificado de: Ivashkiv & Donlin (2014).

2.5 Interferencia de proteínas de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 en la producción de IFN-I y citocinas.

Desde los respectivos años de aparición de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 se han realizado diversas investigaciones con el fin de elucidar los mecanismos a través de los cuales estos coronavirus interfieren con la respuesta del hospedero. En este trabajo, se abordan los estudios más recientes y concluyentes respecto a la actividad antagonista de IFN-I de las proteínas que comparten SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2. Asimismo, debido a la relevancia de SARS-CoV-2 como agente etiológico de la actual pandemia de COVID-19, se presentan proteínas cuya actividad antagonista únicamente se ha descrito en dicho coronavirus.

2.5.1 Proteínas estructurales de SARS-CoV y MERS-CoV.

Estudios realizados por Lu, Pan, Tao, & Guo (2011) demostraron que la proteína N de SARS-CoV inhibe la síntesis de IFN- β y no interactúa con RIG-I ni MDA5, además de sugerir que actúa sobre un paso previo a la activación de RLRs. En la investigación desarrollada por Hu *et al.* (2017) se planteó como objetivo determinar con qué factor del hospedero interactúa la proteína N de SARS-CoV para inhibir la síntesis de IFN-I. Como primer acercamiento, se obtuvieron inmunoprecipitados a partir de los lisados de dos grupos de células humanas 293T, uno con expresión exógena de la proteína N con la etiqueta Flag (Flag-N) y otro con expresión de Flag-vector control. Posteriormente, los inmunoprecipitados se sometieron a SDS y tinción con azul de Coomassie (Figura 10A). Las bandas obtenidas diferencialmente en el grupo de Flag-N fueron analizadas por espectrometría de masas y tras emplear el software Mascot search, se identificó que los péptidos estudiados correspondían a la ubiquitina ligasa TRIM25.

Para demostrar la interacción *in situ* entre TRIM25 endógeno y N, se realizó un ensayo Duo-Link PLA (Proximity Ligation Assay). En esta técnica, las proteínas son reconocidas con anticuerpos primarios a los que después se unen diferentes anticuerpos secundarios conjugados a oligonucleótidos de DNA. Cuando dos proteínas se encuentran a una distancia aproximada de 10 nm, se genera un amplicón de DNA al que se hibridan sondas que emiten fluorescencia roja como señal positiva de

interacción. Mediante microscopia confocal se visualizó que únicamente las células HeLa (Henrietta Lacks) productoras de GFP (Green Fluorescent Protein)-N emitieron fluorescencia roja localizada en el citoplasma mientras que las células productoras de GFP tuvieron un resultado negativo, confirmando que la proteína N de SARS-CoV interactúa con TRIM25 endógena (Figura 10B) (Hu *et al.*, 2017).

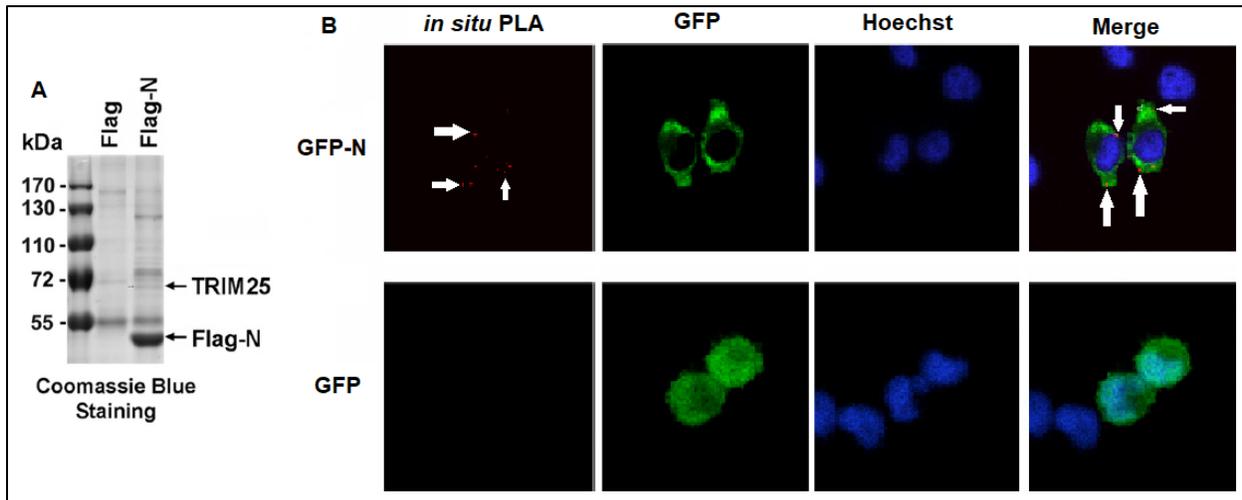


Figura 10. La proteína N de SARS-CoV interactúa con TRIM25. (A) *Electroforesis SDS-PAGE* (*S*odium *D*odecyl *S*ulfate *P*oly*A*crylamide *G*el *E*lectrophoresis) de los inmunoprecipitados obtenidos a partir de los lisados de células 293T expresando Flag y Flag-N. (B) *Ensayo Duo-Link PLA in situ* con células HeLa productoras de GFP-N y GFP. El colorante fluorescente Hoechst se une a DNA y ayuda a visualizar la localización del núcleo. Tomado de: Hu *et al.* (2017).

Considerando que la interacción de N con TRIM25 se lleva a cabo en el citoplasma y que su actividad de ubiquitina ligasa es requerida para la activación del receptor citoplásmico RIG-I, se evaluó si la unión de N a TRIM25 evita la interacción con RIG-I y la activación de este último. Al coexpresar Flag-TRIM25 y Myc-RIG-I bajo condiciones con y sin GFP-N, se observó en los inmunoblots que la cantidad de inmunoprecipitados del complejo TRIM25-RIG-I disminuyeron de manera dosis-dependiente con la expresión de GFP-N. Este resultado fue confirmado mediante un ensayo PLA *in situ*, en el que sólo las células productoras de GFP-N mostraron disminución de la señal positiva asociada a la interacción de TRIM25-RIG-I (Figura 11A, B) (Hu *et al.*, 2017).

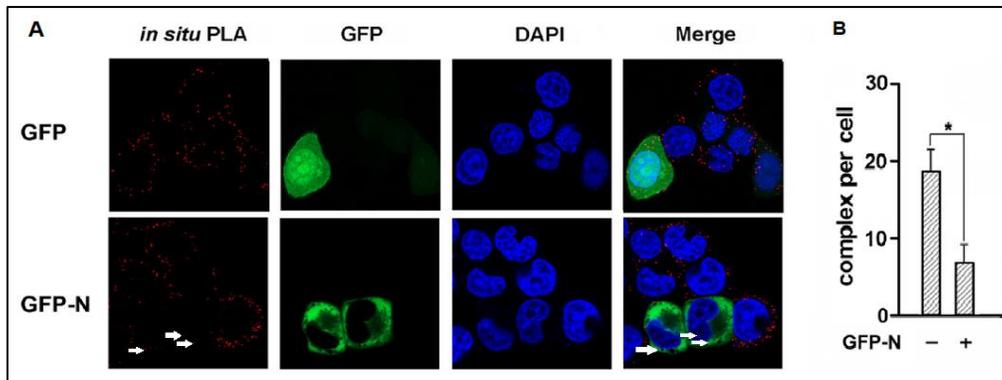


Figura 11. La interacción entre RIG-I y TRIM25 es inhibida por N de SARS-CoV. (A) Ensayo Duo-Link PLA *in situ* con células HeLa productoras de GFP y GFP-N. El colorante fluorescente DAPI se une a DNA y ayuda a visualizar la localización del núcleo. (B) Se contaron los puntos rojos de 30 células elegidas aleatoriamente y se graficaron los resultados (* $P < 0.05$). Tomado de: Hu *et al.* (2017).

De igual forma, al obtener inmunoprecipitados e inmunoblots de lisados de células 293T expresando Flag-RIG-I, HA (HemAgglutinina)-ubiquitina y diferentes concentraciones de Myc-N, se observó que la ubiquitinación de los dominios CARD de RIG-I, inducida por la infección de SeV (Sendai Virus), es inhibida de manera dosis-dependiente por N (Figura 12) (Hu *et al.*, 2017).

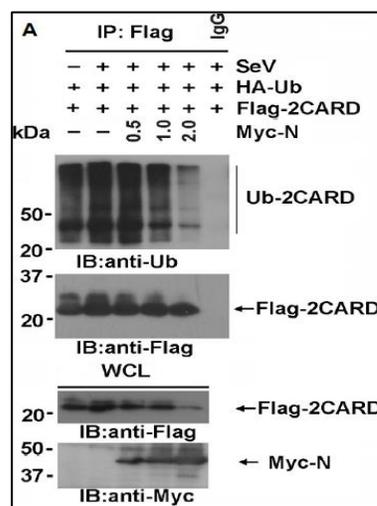


Figura 12. La ubiquitinación de RIG-I mediada por TRIM25 es inhibida por N. (A) Inmunoblots obtenidos con los inmunoprecipitados de células 293T coexpresando HA-Ub y Flag-2CARD a diferentes concentraciones de N. IgG fue empleado como control negativo. Tomado de: Hu *et al.* (2017).

Con el fin de evaluar si el bloqueo de la ubiquitinación de RIG-I afecta negativamente la transcripción del gen *IFNB1*, se realizó un ensayo dual de luciferasa.

Este ensayo permite evaluar la activación de un promotor mediante la transfección de una línea celular con dos plásmidos, uno que contiene el gen reportero codificante para la luciferasa de luciérnaga bajo el promotor de estudio, en este caso el vector IFN- β -Luc, y otro vector codificante para la luciferasa de Renilla que es empleada para normalizar la eficiencia de la transfección. La actividad enzimática de la luciferasa de luciérnaga se mide y asocia al nivel de activación del promotor. Al igual que la ubiquitinación de RIG-I, la activación del promotor de IFN- β disminuyó de manera dosis-dependiente con la expresión de N, reduciéndose desde un nivel de inducción de aproximadamente 2000 hasta un valor de 250 en presencia de 3.2 μ g de N (Figura 13A). Asimismo, se demostró que la producción del mRNA de IFN- β e IFN- β debido a la infección por SeV (un fuerte inductor de IFN- β) fue casi cuatro veces menor en presencia de N (Figura 13B, C). En lo que respecta a los ISGs bajo el control del elemento ISRE dependiente de la señalización de IFN- β , se observó que la expresión del vector ISRE-Luc disminuyó de manera dosis-dependiente al coexpresar N, teniendo niveles de inducción mayores a 8000 en ausencia de N y menores a 1000 con 0.4 μ g de la proteína viral (Figura 13D) (Hu *et al.*, 2017).

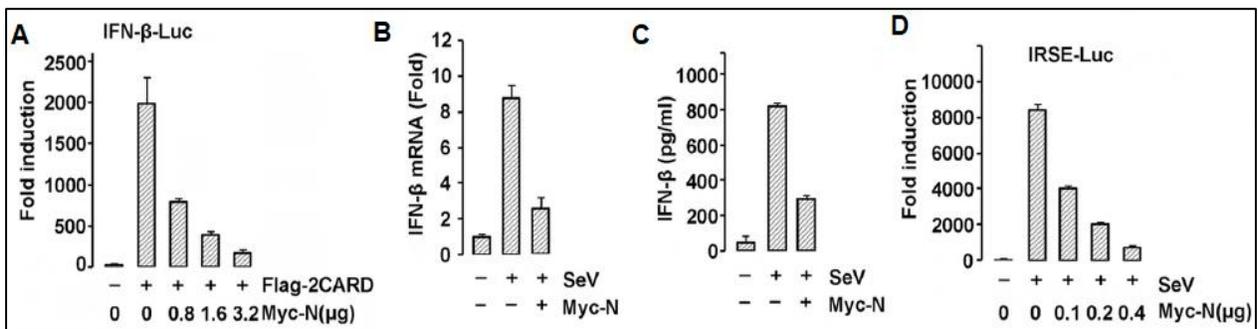


Figura 13. La proteína N reduce la activación del promotor de IFN- β , la producción de mRNA IFN- β e IFN- β y afecta la síntesis de genes bajo el promotor ISRE. (A, D) Niveles de inducción de los reporteros IFN- β -luciferasa e ISRE-luciferasa, respectivamente a diferentes concentraciones de Myc-N. (B, C) Niveles y cantidades de mRNA IFN- β e IFN- β , respectivamente con y sin Myc-N. Tomado de: Hu *et al.* (2017).

Por otro lado, se descubrió que la proteína N de MERS-CoV también posee capacidad de unión a TRIM25. Al igual que la proteína N de SARS-CoV, la producción de IFN- β -Luc inducida por activación de RIG-I se redujo de manera dosis-dependiente con la expresión de N de MERS-CoV, siendo en este caso hasta cinco veces menor (Hu *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos por Hu *et al.* (2017) demostraron de manera concluyente que SARS-CoV y MERS-CoV inhiben la síntesis de IFN- β a través de sus proteínas N, las cuales ejecutan su función antagonista mediante el bloqueo de la interacción TRIM25-RIG-I y con ello, la activación de RIG-I, receptor citoplásmico crucial para la producción de IFN-I.

La proteína M es otra proteína estructural a la cual se ha asociado función de interferencia sobre la respuesta del hospedero. Estudios con la proteína M de SARS-CoV demostraron que su actividad como supresor de la inducción de IFN-I era más eficiente que la de la proteína N del mismo coronavirus (Chan *et al.*, 2006). Sin embargo, el mecanismo de inhibición de M permaneció sin resolverse, cuestión que el grupo de Siu *et al.* (2009) buscó resolver mediante la identificación de la vía de señalización afectada, así como las proteínas blanco.

La primera aproximación fue la realización de un ensayo dual de luciferasa para evaluar la activación del promotor de IFN- β en presencia de poly(I:C) (PolyInosinic: polyCytidylic acid), una molécula inmunoestimulante con estructura similar a dsRNA. Se encontró que en presencia de la proteína M, la actividad del gen reportero se reduce a la mitad en comparación con los niveles inducidos por la proteína N (Figura 14) (Siu *et al.*, 2009).

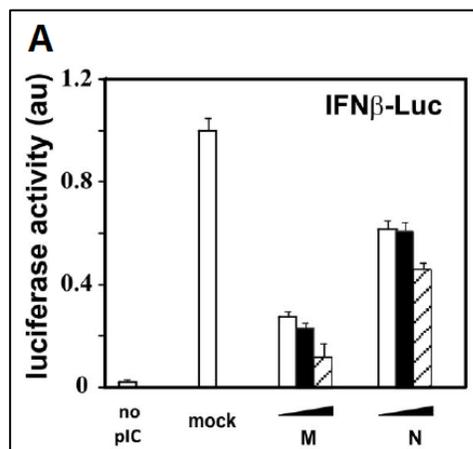


Figura 14. La proteína M de SARS-CoV muestra mayor inhibición que N sobre la activación del promotor de IFN- β . (A) Niveles de actividad de luciferasa en presencia de las proteínas M y N de SARS-CoV. au, arbitrary units. Tomado de: Siu *et al.* (2009).

Para determinar sobre cual vía de señalización por RLRs interfiere la proteína M, se evaluó el nivel de supresión sobre el reportero ISRE-Luc, cuya transcripción es inducida por las proteínas RIG-I, MDA5, MAVS, TBK1, IKK ϵ , IRF3 e IRF7. De los componentes antes mencionados, únicamente la activación por IRF3 e IRF7 no se vio afectada, indicativo de que M actúa en pasos previos a la actividad de ambos IRFs (Figura 15) (Siu *et al.*, 2009).

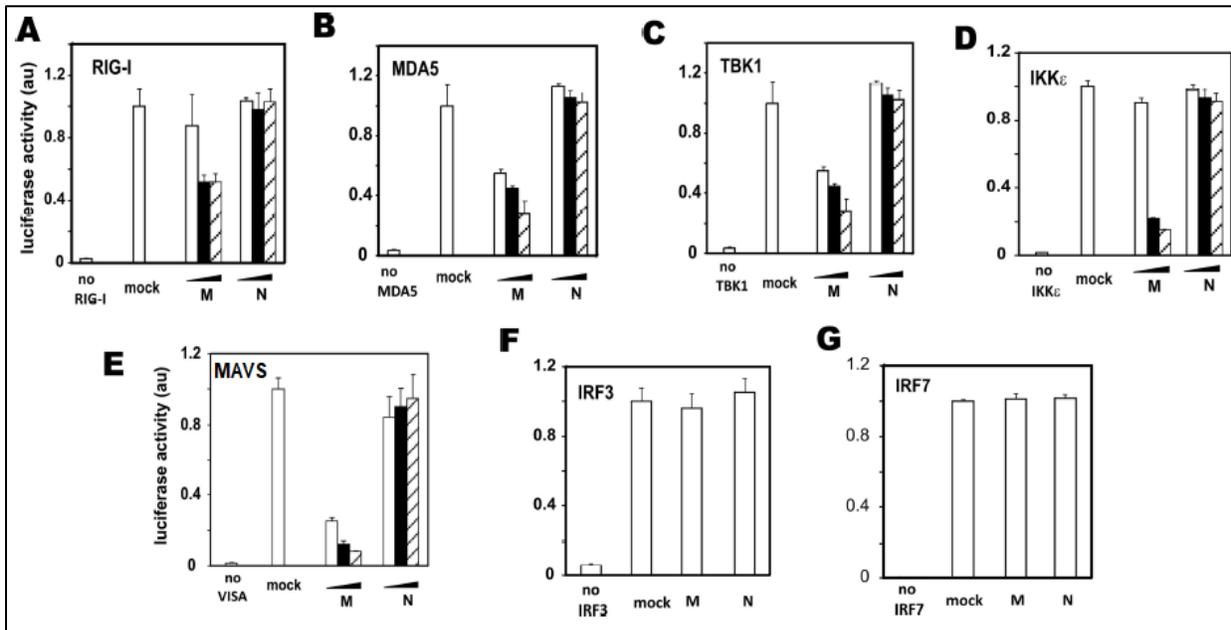


Figura 15. La proteína M de SARS-CoV inhibe la actividad inductora de interferón de RIG-I (A), MDA5 (B), TBK1 (C), IKK ϵ (D) y MAVS (E), no así de IRF3 (F) e IRF7 (G). *au*, arbitrary units. Tomado de: Siu *et al.* (2009).

Con el fin de establecer con qué proteínas interactúa M en pasos previos a la activación de IRFs, se diseñaron ensayos de coimmunoprecipitación empleando lisados de células HEK293 sobreexpresando Myc-M e individualmente cada una de las proteínas RIG-I, MDA5, TBK1, IKK ϵ , TANK, TRAF3 y TRAF6 con la etiqueta Flag. Los resultados mostraron que M coimmunoprecipitó con RIG-I, TBK1, IKK ϵ y TRAF3 (Figura 16, panel 1), por lo que se sugirió la posible formación de un complejo incapaz de continuar con la propagación de la señal para la producción de IFN-I. Esta hipótesis se reforzó al evaluar la fosforilación/activación de IRF3 en dos grupos de células HEK293, un grupo expresando únicamente TBK1/IKK ϵ y otro produciendo TBK1/IKK ϵ y M. En el grupo productor de M la forma fosforilada de IRF3 fue indetectable, mientras que en las

células que sólo expresaron cinasas sí se observó la presencia de IRF3 activado (Figura 16, panel 2) (Siu *et al.*, 2009).

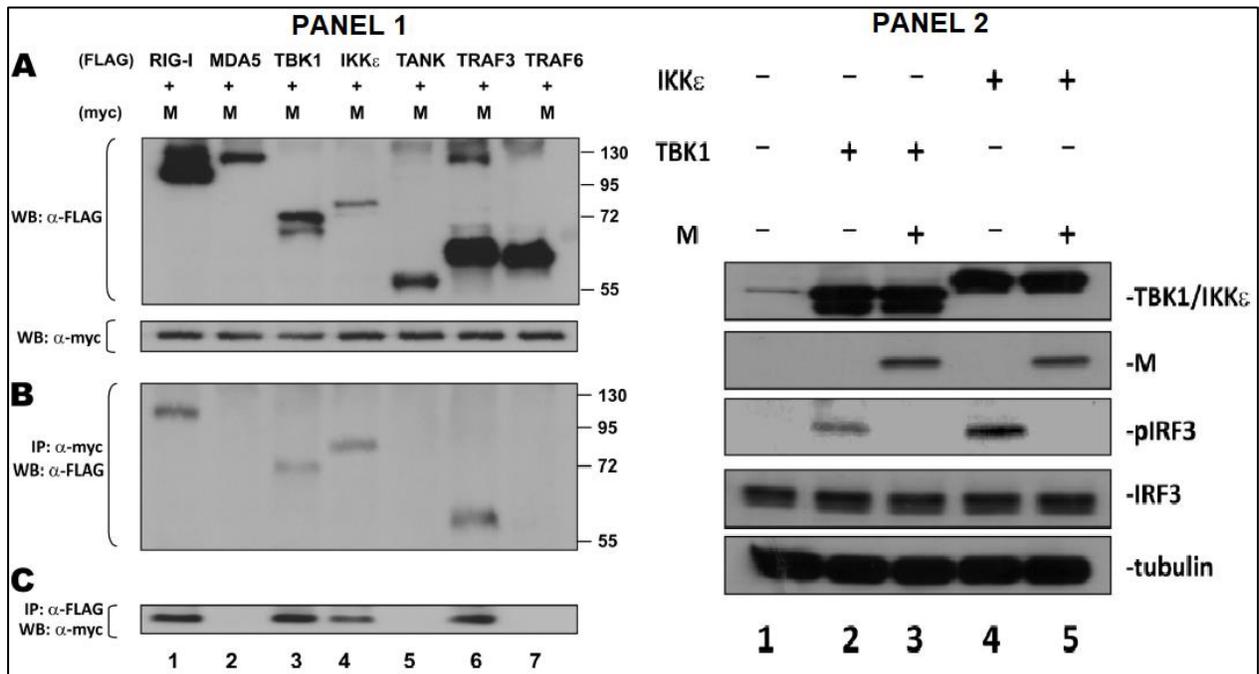


Figura 16. La proteína M de SARS-CoV se asocia con RIG-I, TBK1, IKKε y TRAF3. (Panel 1) (A) Análisis por WB (Western Blot) de los lisados de células HEK293. (B, C) Análisis por WB de los inmunoprecipitados obtenidos con α-myc y α-FLAG. (Panel 2). Inhibición de la fosforilación de IRF3 en células productoras de la proteína M de SARS-CoV. La proteína tubulina se empleó como control de carga. Tomado de: Siu *et al.* (2009).

Para confirmar si M bloquea la formación del complejo activo TRAF3/TANK/TBK1/IKKε y así inhibe la activación de IRF3, se analizaron las interacciones de dichas proteínas en presencia y ausencia de la proteína M. Al coexpresar TBK1, TRAF3 y M en células HEK293 se observó que la interacción entre TBK1 y TRAF3 se pierde en presencia de la proteína M (Figura 17, carril 2 comparado con 1). De igual forma, las interacciones de TRAF3, tanto con IKKε como con TANK son inhibidas en las células que coexpresan M (Figura 17, carriles 4 y 6) (Siu *et al.*, 2009).

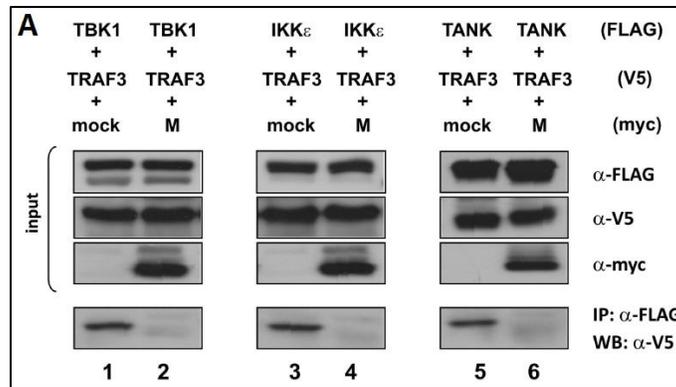


Figura 17. La proteína M de SARS-CoV impide la formación del complejo TRAF3/TANK/TBK1/IKK ϵ . (A) Inmunoblots de los diferentes coinmunoprecipitados entre los componentes del complejo TRAF3/TANK/TBK1/IKK ϵ en presencia y ausencia de la proteína M. Tomado de: Siu *et al.* (2009).

Estos resultados demuestran que la función antagonista de M sobre la síntesis de IFN-I es mediada por la capacidad de la proteína viral del bloquear la formación del complejo funcional TRAF3/TANK/TBK1/IKK ϵ , con lo cual impide la activación de IRF3, factor de transcripción esencial para la síntesis de IFN-I.

Por otro lado, mediante un estudio de caracterización de proteínas estructurales y accesorias de MERS-CoV, el grupo de Yang *et al.* (2013) determinó que al igual que en SARS-CoV, la proteína M de MERS-CoV posee actividad antagonista de IFN-I. Este resultado fue obtenido al evaluar la activación del reportero IFN- β -Luc en respuesta a la infección con SeV. La actividad de la luciferasa (dependiente de la expresión del vector) tuvo una reducción del 40% en presencia de la proteína M (Figura 18A). Posteriormente, empleando RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) se confirmó que los niveles del transcrito de IFN- β son considerablemente menores en células 293T transfectadas con el plásmido codificante para M (Figura 18B) (Yang *et al.*, 2013).

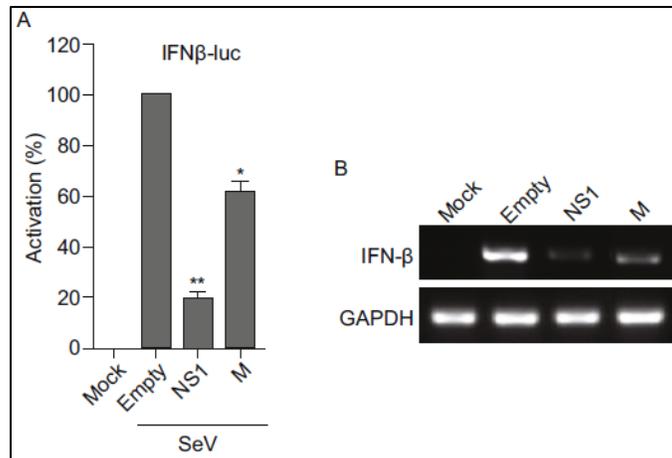


Figura 18. La proteína M de MERS-CoV reduce la activación del promotor de IFN- β , así como la síntesis de su transcrito. (A) Porcentajes de activación del constructo IFN- β -Luc (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (B) Electroforesis de los productos obtenidos por RT-PCR. NS1 (NonStructural 1 protein): Proteína del virus A de influenza usada como control positivo. GAPDH (GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase): Control positivo para asegurar la calidad de los RNAs analizados. Tomado de: Yang *et al.* (2013).

También analizaron la capacidad de la proteína M para inhibir la activación del promotor reconocido por IRF3. Para ello, se transfectaron células 293T con la construcción del reportero 55CIB (sitios para la unión de IRF3)-Luc y posteriormente se infectaron con SeV. Los resultados mostraron que el porcentaje de actividad de la luciferasa fue 80% menor en las células que expresan la proteína M de MERS-CoV (Figura 19A). Asimismo, mediante microscopía confocal se estudió si M es capaz de bloquear la translocación de IRF3 al núcleo. A pesar de haber sido infectadas con SeV, GFP-IRF3, permaneció en el citoplasma de las células transfectadas con el plásmido codificante para HA-M, mientras que en las células no productoras de M, GFP-IRF3 se localizó en el núcleo (Figura 19B) (Yang *et al.*, 2013).

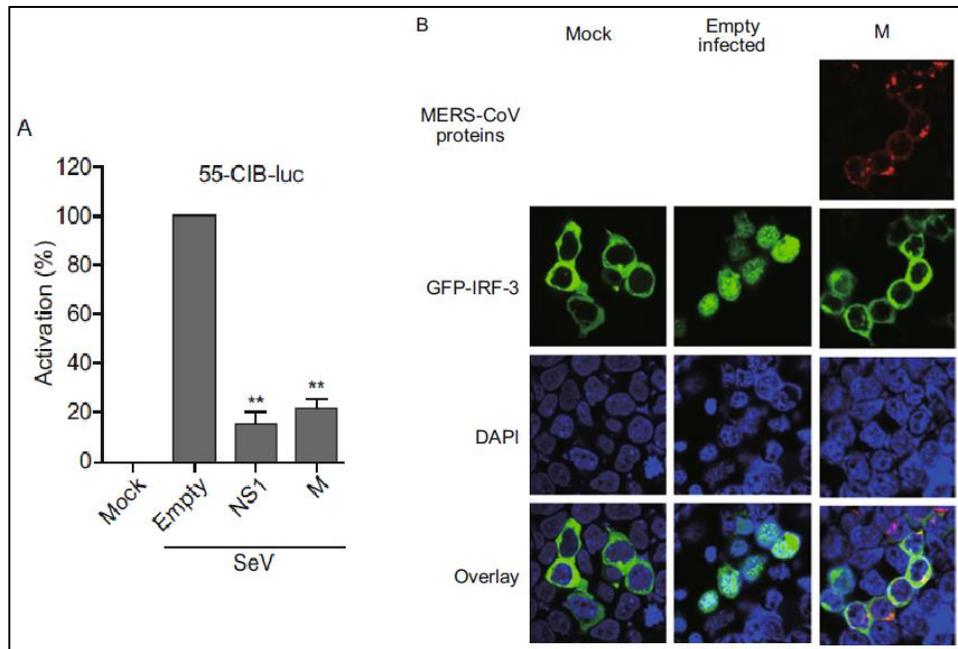


Figura 19. La proteína M de MERS-CoV inhibe la función de IRF3. (A) Porcentajes de activación del constructo 55-CIB-Luc (** $p < 0.01$). (B) Microscopía confocal de células 293T transfectadas con plásmidos codificantes para GFP-IRF3 y HA-M. Tomado de: Yang et al. (2013).

Finalmente, se evaluó si M es capaz de reprimir la respuesta inducida por IFN-I. Dos grupos de células 293T se transfectaron con el constructo ISRE-Luc, uno de ellos también recibió el plásmido codificante para M, y posteriormente ambos grupos se estimularon con IFN- β . Los resultados obtenidos mostraron que la proteína M de MERS-CoV tiene actividad inhibitoria sobre la activación del promotor ISRE, ya que su síntesis provocó una disminución del 50% en la actividad de la luciferasa (Figura 20) (Yang et al., 2013).

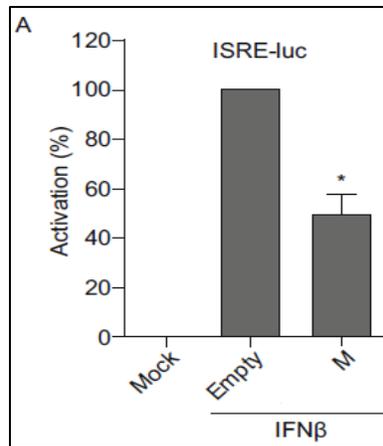


Figura 20. La proteína M de MERS-CoV reduce la activación del promotor con elementos ISRE. (A) Porcentaje de activación del constructo ISRE-Luc (* $p < 0.05$). Tomado de: Yang *et al.* (2013).

Los estudios realizados por Yang *et al.* (2013) demostraron que la proteína M de MERS-CoV disminuye la activación del promotor de IFN- β interfiriendo sobre la translocación nuclear de IRF3 o probablemente en algún paso previo a dicho evento, por ejemplo, su activación por fosforilación. Sin embargo, dado que no se realizaron estudios para elucidar el mecanismo específico de inhibición, aún quedan aspectos sin resolver, entre ellos, cuáles son los factores del hospedero y los dominios estructurales de las proteínas involucradas en el proceso de interferencia sobre la síntesis de IFN-I. En lo que respecta a características distintivas de la proteína M de MERS-CoV, también se descubrió que puede disminuir la activación de promotores con elementos ISRE, y aunque se desconoce cómo lo hace, esta capacidad podría hacerle un mejor antagonista de IFN-I comparado con su ortólogo en SARS-CoV.

2.5.2 Proteínas no estructurales de SARS-CoV y MERS-CoV.

En lo que se refiere a proteínas no estructurales, la proteína nsp3 es una de las que ha sido mayormente estudiada debido a su relevancia como antagonista de la síntesis de IFN-I tanto en SARS-CoV como en MER-CoV.

Investigaciones realizadas por Devaraj *et al.* (2007) demostraron que la proteína nsp3 de SARS-CoV, particularmente el dominio PLpro, inhibe la síntesis de IFN- β mediante el bloqueo de la fosforilación y activación de IRF3 sin requerir de su actividad proteolítica. Continuando con esta investigación, Sun *et al.* (2012) se plantearon

identificar los factores celulares involucrados y con ello elucidar el mecanismo de inhibición de nsp3 de SARS-CoV, enfocándose únicamente en PLpro como dominio independiente, es decir, sin el resto de la proteína nsp3.

Considerando el papel de STING (adaptador para la interacción entre RIG-I y MAVS) sobre la activación de IRF3, se estudió si el dominio PLpro inhibe la activación de un promotor dependiente de IRF3 con elementos ISRE. Para abordarlo se empleó el reportero ISRE-Luc estimulado por la actividad de STING y se midió su expresión en ausencia de PLpro y a diferentes concentraciones de éste. En ausencia de PLpro, STING indujo una activación aproximadamente 15 veces mayor en comparación con el control sin STING, mientras que con la expresión de PLpro, la activación del promotor presentó una reducción dosis-dependiente (Figura 21A). Este fenómeno fue atribuido a la posible interacción de PLpro con STING, por lo que su asociación fue evaluada y confirmada mediante la coimmunoprecipitación de PLpro-V5 con STING-Flag (Figura 21B) (Sun *et al.*, 2012).

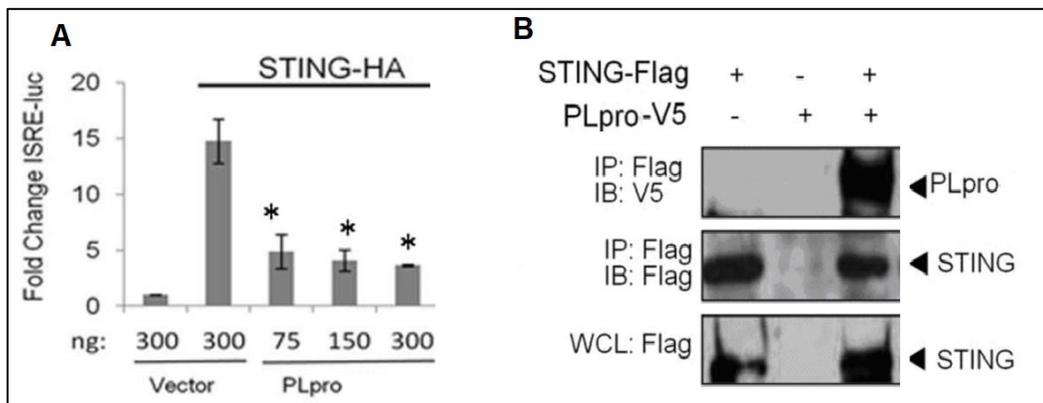


Figura 21. El dominio PLpro de SARS-CoV reduce la activación del vector ISRE-Luc e interactúa con STING. (A) Niveles de activación de ISRE-Luc ($*p < 0.05$). (B) Immunoblots de los coimmunoprecipitados de PLpro-V5 y STING-Flag. Tomado de: Sun *et al.* (2012).

Debido a que los homodímeros de STING son la forma funcional requerida para la activación de IRF3, se analizó si la expresión de PLpro disminuía la presencia de dicho oligómero en células HEK293T infectadas con SeV. Esta hipótesis fue confirmada mediante geles SDS-PAGE en los que se reveló que PLpro provoca una reducción de los dímeros de STING (Figura 22A). Este resultado cobró mayor relevancia al observar

que células HEK293T infectadas con SARS-CoV igualmente mostraron bajos niveles de la forma funcional de STING (Figura 22B) (Sun *et al.*, 2012).

De igual forma, se analizó si la actividad DUB (DesUBiquitinasa) de PLpro estaba involucrada en el mecanismo de inhibición, ya que la formación de dímeros de STING requiere de la síntesis de cadenas de poliubiquitina. Para abordar esta pregunta se midió la presencia de dímeros de STING en células HEK293T productoras de PLpro WT (Wild Type) y PLpro mutante (C1651A) que carece de actividad DUB. Los resultados obtenidos revelaron que únicamente PLpro con actividad DUB provoca una disminución en los dímeros de STING (Figura 22A), proporcionando evidencia de que la actividad DUB es necesaria para prevenir su formación y por consiguiente para interferir en la fosforilación de IRF3 (Sun *et al.*, 2012).

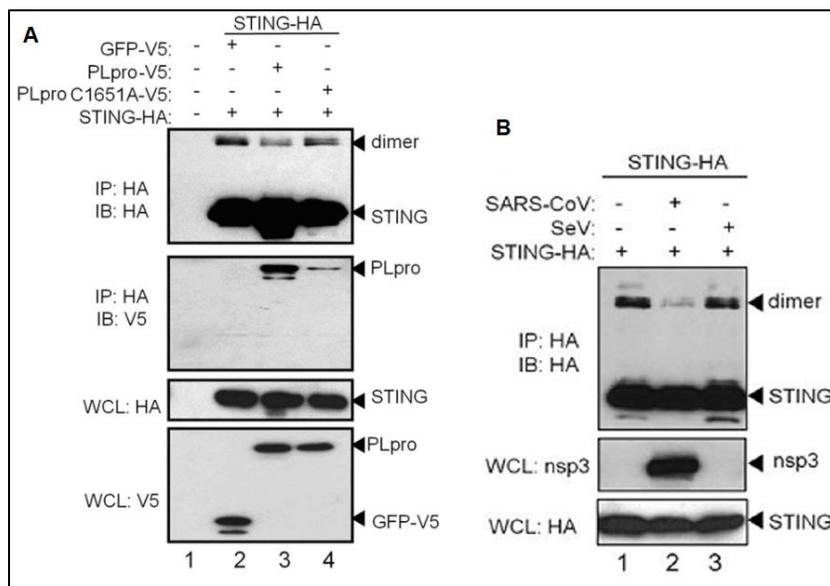


Figura 22. PLpro y SARS-CoV reducen la formación de dímeros de STING. (A) *Inmunoblots de los inmunoprecipitados con lisados de células HEK293T transfectadas con PLpro WT y PLpro C1651A.* (B) *Inmunoblots de los inmunoprecipitados con lisados de células HEK293T infectadas con SARS-CoV y SeV.* Tomado de: Sun *et al.* (2009).

Algunos estudios han sugerido que IRF3, además de modificarse por fosforilación, también requiere estar ubiquitinada para activarse por completo y ser funcional (Jiang *et al.*, 2012). Por tal motivo, Matthews *et al.* (2014) realizaron un conjunto de experimentos para evaluar el efecto de la ubiquitinación de IRF3 y determinar si dicha modificación puede ser removida por la actividad DUB de PLpro.

Para analizar si PLpro puede interferir sobre etapas posteriores a la fosforilación de IRF3, se evaluó su capacidad para inhibir la actividad de IRF3(5D), una mutante constitutivamente activa de IRF3 que mimetiza su región C-terminal fosforilada y que puede inducir la actividad de IFN- β -Luc. Con este experimento se demostró que PLpro inhibe la actividad de IRF3 fosforilada, ya que provocó una disminución del 50% en la actividad de la luciferasa en comparación con las células únicamente transfectadas con IRF3(5D) (Figura 23) (Matthews *et al.*, 2014).

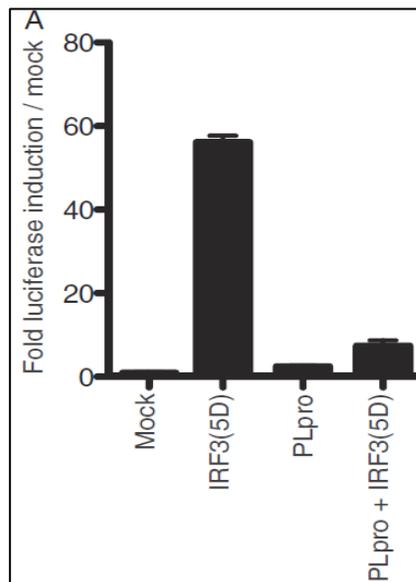


Figura 23. PLpro de SARS-CoV disminuye la actividad de IRF3(5D). (A) Niveles inducidos del vector IFN- β -Luc. Tomado de: Matthews *et al.* (2014).

Para complementar estos ensayos, se estudió la capacidad de IRF3(5D) para dimerizarse, translocarse al núcleo y unirse a DNA; se observó que PLpro no interfiere en ninguno de estos procesos, por lo que se formuló la hipótesis de que IRF3(5D) requiere estar ubiquitinada. Para probarlo, se elaboró un ensayo en el que transfectaron células HEK293T con diferentes combinaciones de plásmidos codificantes para Flag-IRF3(5D), donadores de Ub (Ubiquitina): HA-K48-Ub y HA-K63-Ub, y GFP-PLpro. Los lisados de las células fueron tratados con perlas anti-Flag para seleccionar a Flag-IRF3(5D) y posteriormente se hicieron inmunoprecipitados con anti-HA para determinar el estado ubiquitinado de IRF3(5D) (Figura 24A). Al observar los inmunoprecipitados se concluyó que IRF3(5D) es ubiquitinada y que PLpro promueve su desubiquitinación (Matthews *et al.*, 2014).

El papel de PLpro como inhibidor de la ubiquitinación de IRF3 y antagonista de la síntesis de IFN-I fue confirmado al demostrar que la actividad de luciferasa producida a partir de IFN- β -Luc únicamente disminuye, casi en su totalidad, en presencia de PLpro WT, mientras que la mutante de PLpro carente de actividad DUB no provoca cambios en comparación con las células que sólo expresan IRF3 o IRF3(5D) (Figura 24B) (Matthews *et al.*, 2014).

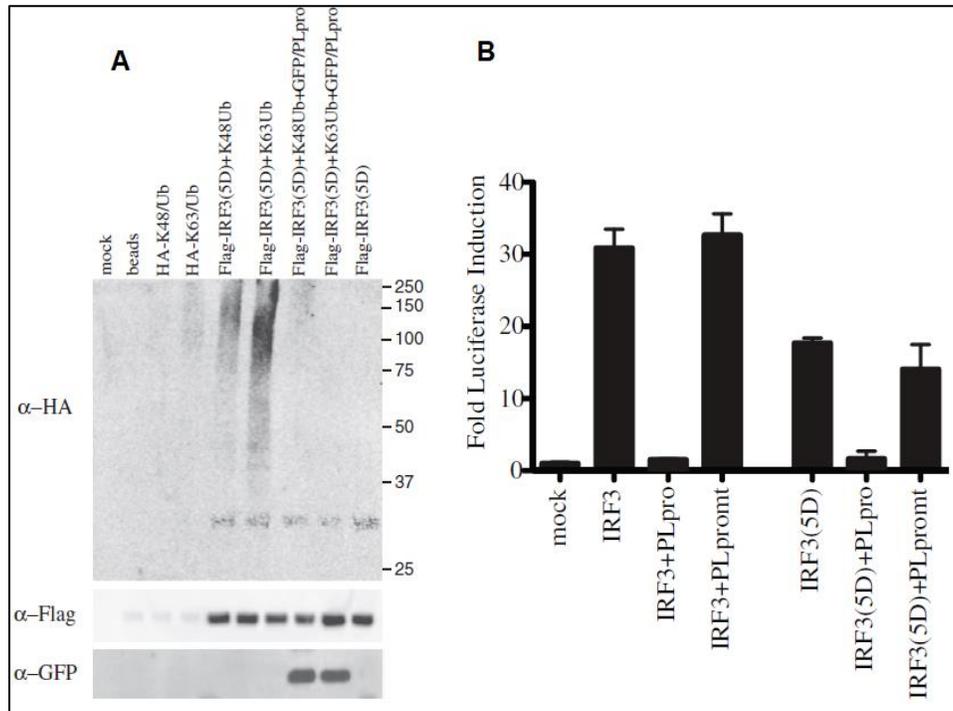


Figura 24. PLpro de SARS-CoV desubiquitina a IRF3(5D) y emplea su actividad DUB para reducir la activación del promotor de IFN- β . (A) *Inmunoblots* obtenidos con los lisados de células HEK293T transfectadas con diferentes combinaciones de plásmidos. (B) Niveles inducidos del vector IFN- β -Luc. Tomado de Matthews *et al.* (2014).

De esta manera, los resultados de Sun *et al.* (2009) y Matthews *et al.* (2014), plantean dos posibles mecanismos en los que PLpro emplea su actividad DUB para interferir sobre la función de IRF3 y disminuir la producción de IFN-I. Asimismo, en cada uno de los mecanismos PLpro actúa a diferentes niveles de la vía de señalización. En el primero, PLpro evita la fosforilación de IRF3 al evitar la formación de dímeros de STING, mientras que en el segundo, desubiquitina e inactiva a IRF3, de modo que pese a su translocación al núcleo y unión a DNA es incapaz de inducir la síntesis de IFN-I.

En el caso de MERS-CoV, tomando como antecedente la relevancia de la actividad DUB de PLpro en SARS-CoV para inhibir la síntesis de IFN-I, así como los reportes de Mielech *et al.* (2014) en torno a la actividad DUB de PLpro en MERS-CoV, el grupo de Bailey-Elkin *et al.* (2014) cristalizó a PLpro de MERS-CoV en complejo con ubiquitina, y basándose en su estructura introdujeron mutaciones en la región DUB. Una vez obtenida la mutante de PLpro (mutada en el sitio activo con C1592A) evaluaron la capacidad de la misma y de PLpro WT para inhibir la activación del promotor de IFN- β (a partir del vector IFN- β -Luc) inducida por RIG-I(2CARD), MAVS e IRF3(5D) (Figura 25). En cada grupo de células transfectadas con RIG-I(2CARD), MAVS e IRF3(5D) se registró que PLpro WT redujo la actividad de la luciferasa de manera dosis-dependiente, mientras que la mutante C1592A mostró niveles equiparables a los obtenidos con los controles (Bailey-Elkin *et al.*, 2014)

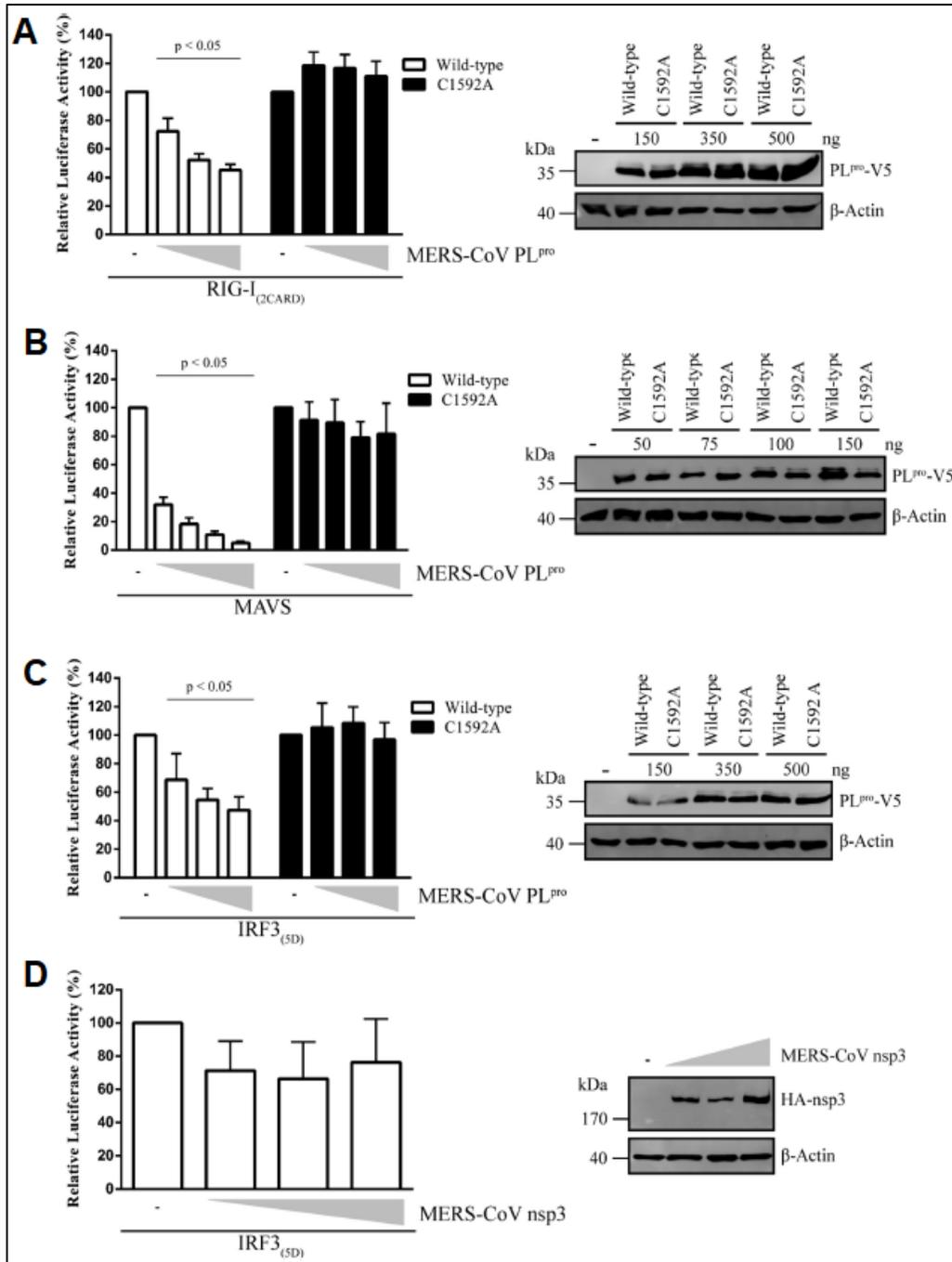


Figura 25. El dominio PL^{pro} de MERS-CoV con actividad DUB reduce la activación de IFN- β . (A), (B), y (C) Porcentajes de actividad relativa de la luciferasa inducidos por RIG(2CARD), MAVS e IRF3(5D), respectivamente, empleando PL^{pro}. (D) Porcentajes de actividad relativa de la luciferasa inducidos por IRF3(5D), empleando nsp3. A la derecha de cada gráfico se encuentran las electroforesis que muestran la abundancia y cantidades empleadas de cada constructo de PL^{pro} WT y mutante. La proteína β -actina se empleó como control de carga. Tomado de: Bailey-Elkin et al. (2014).

Con estos resultados Bailey-Elkin *et al.* (2014) concluyeron que el dominio PLpro de la proteína nsp3 de MERS-CoV emplea su actividad DUB para inhibir la señalización entre RIG-I y MAVS, observándose que inhibe de manera más significativa al nivel de MAVS.

Asimismo, se determinó que PLpro interfiere sobre la actividad de IRF3(5D), tal y como se ha reportado para su ortólogo en SARS-CoV. Sin embargo, la expresión de nsp3 (proteína completa) no inhibió significativamente la activación del promotor de IFN- β inducida por IRF3(5D) (Figura 25D). Esta diferencia de resultados fue atribuida a la localización de nsp3, pues es posible que su anclaje a membrana le imposibilite emplear a IRF3(5D) como sustrato.

2.5.3 Proteínas accesorias de SARS-CoV.

En lo que concierne a proteínas accesorias, únicamente SARS-CoV y SARS-CoV-2 comparten a ORF3b como proteína con función antagonista sobre la síntesis de IFN-I. Los primeros estudios efectuados con ORF3b de SARS-CoV demostraron que esta proteína provoca una disminución en la fosforilación de IRF3 para así reducir la síntesis de IFN- β (Kopecky-Bromberg, *et al.*, 2007). Posteriormente, un análisis de la dinámica de localización de ORF3b brindó información sobre su posible mecanismo para inhibir la activación de IRF3 (Freundt, Park, Lenardo & Xu, 2009).

En la investigación desarrollada por Freundt *et al.* (2009), se transfectaron células Vero con un plásmido codificante para ORF3b-EGFP (Enhanced GFP), y después se tiñeron los núcleos y mitocondrias con las sondas fluorescentes Hoechst y MitoTracker Red, respectivamente. Al visualizar las células mediante microscopía confocal, se observó que ORF3b se localiza tanto en el núcleo como en las mitocondrias. Posteriormente, con un ensayo de distribución espacio-temporal se concluyó que ORF3b inicialmente se localiza en el núcleo y eventualmente migra hacia la membrana externa de la mitocondria, donde se ancla mediante una α -hélice anfipática (conformada por los residuos de aminoácidos 71-90) de manera definitiva (Figura 26) (Freundt *et al.*, 2009).

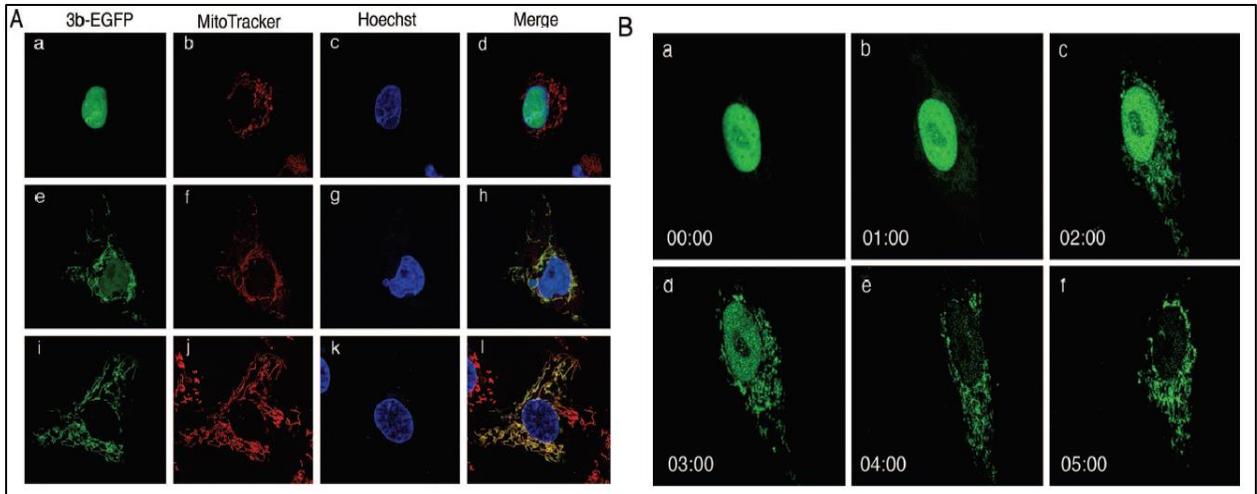


Figura 26. La proteína ORF3b inicialmente se ubica en el núcleo y finalmente se localiza en las mitocondrias. (A) Microscopía confocal de células Vero transfectadas con ORF3b-EGFP y teñidas con Hoechst y MitoTracker Red a 16 hpt. (B) Microscopía confocal de células Vero transfectadas con ORF3b-EGFP. Los tiempos se muestran en horas y se estableció el inicio 00:00 que corresponde a 4 hpt (horas post-transfección) en que fue detectable ORF3b. Tomado de: Freundt et al. (2009).

La localización de ORF3b en la mitocondria sugiere que esta proteína inhibe la activación de IRF3 al interferir sobre la señalización mediada por MAVS, la cual igualmente se ubica en la mitocondria. Para estudiar esta hipótesis se transfectaron células HEK293T con un reportero de luciferasa bajo el control de un promotor de respuesta a IRF3. La activación del plásmido fue inducida por la sobreexpresión de RIG-I-N (una forma constitutivamente activa de RIG-I) y MAVS. La actividad de la luciferasa tuvo una reducción del 15% en las células que coexpresaron MAVS y ORF3b, mientras que el grupo que coexpresó RIG-I-N y ORF3b sólo presentó una disminución de aproximadamente 5% (Figura 27) (Freundt et al., 2009).

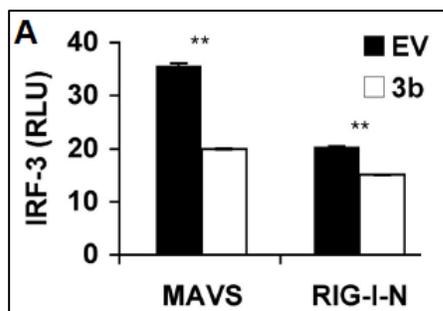


Figura 27. La proteína ORF3b de SARS-CoV reduce la activación del promotor reconocido por IRF3. (A) Niveles de luciferasa inducidos por MAVS Y RIG-I-N en ausencia o presencia de ORF3b (** $p < 0.01$). Tomado de: Freundt et al. (2009).

Aunque no se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación u otros ensayos para demostrar la interacción entre ORF3b y MAVS, Freundt *et al.* (2009) propusieron que ORF3b inhibe la activación de IRF3 y la síntesis de IFN-I, probablemente al interactuar con MAVS, ya que de esta manera impediría la formación y activación de complejos río abajo en la cascada de señalización.

2.6 Interferencia de proteínas de SARS-CoV sobre la vía Jak-STAT.

De los tres coronavirus, objeto de esta revisión, solamente SARS-CoV y SARS-CoV-2 comparten la proteína ORF6 como antagonista de la señalización de IFN-I. Los primeros estudios efectuados con ORF6 se realizaron en SARS-CoV por el grupo de Kopecky-Bromberg *et al.* (2007), quienes demostraron que esta proteína inhibe la activación del promotor ISRE y evita la translocación del factor de transcripción STAT1, pero no su fosforilación ni dimerización.

Para esclarecer el mecanismo de inhibición de ORF6 en SARS-CoV, Frieman *et al.* (2007) se enfocaron en el proceso de translocación de STAT1. Inicialmente se corroboró que únicamente la presencia de ORF6 bloquea la translocación de STAT1, pues mediante microscopía confocal se observó que células Vero infectadas con icSARS (infectious clone SARS strain) WT mantenían a STAT1-GFP en el citoplasma, contrario a su localización nuclear en las células infectadas con icSARS Δ ORF6 (cepa carente de ORF6). Asimismo, la transfección con el plásmido codificante de HA-ORF6 en células infectadas con icSARS Δ ORF6 complementó la función de ORF6 y se impidió la translocación al núcleo de STAT1-GFP (Figura 28).

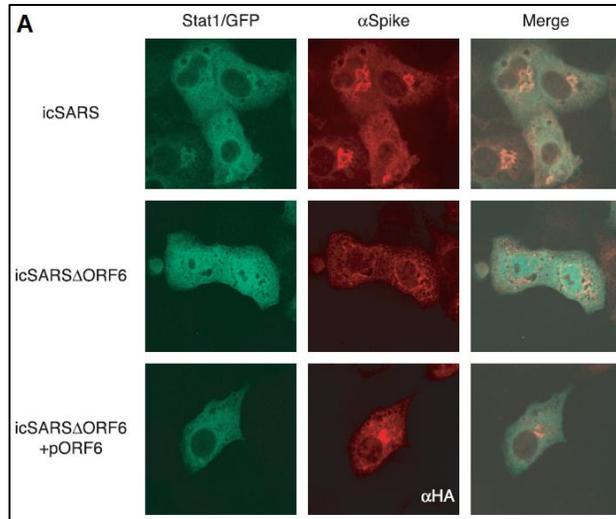


Figura 28. La presencia de ORF6 inhibe la translocación de STAT1. (A) *Microscopía confocal de células Vero infectadas con icSARS o icSARSΔORF6. Para visualizar las células del segundo panel (en rojo) éstas fueron tratadas con un anticuerpo primario anti-S o anti-HA y un secundario conjugado con la sonda fluorescente Alexa 546. Tomado de: Frieman et al. (2007).*

Tomando en cuenta que ORF6 no inhibe la fosforilación ni dimerización de STAT1 (Kopecky-Bromberg *et al.*, 2007), se dedujo que ORF6 actúa río abajo en la vía, probablemente al nivel de la translocación de los factores de transcripción. La translocación de STAT1 e ISGF3 es mediada por su unión al factor de importación nuclear KPNA1 (KarioPherin Alpha 1), el cual a su vez recluta a KPNA2 (KarioPherin Beta 1) para formar un complejo que finalmente es transportado al núcleo (Frieman *et al.*, 2007).

Algunos autores han reportado proteínas virales que se unen a KPNA1 para bloquear su interacción con STAT1, entre ellas VP24 (Viral Protein 24) del virus del ébola (Reid *et al.*, 2006). Por este motivo, Frieman *et al.* (2007) evaluaron la interacción de ORF6 con diferentes carioferinas, para lo cual cotransfectaron células 293 con diferentes combinaciones de plásmidos codificantes para KPNA1, KPNA2, KPNA3 y KPNA4, todas ellas etiquetadas con Flag, y HA-ORF6. Al analizar los coimmunoprecipitados obtenidos con los lisados celulares se observó que ORF6 únicamente interactúa con KPNA2 (Figura 29A). Asimismo, los datos de microscopía confocal sobre células cotransfectadas con cada Flag-KPNA y HA-ORF6 confirmaron que sólo KPNA2 es retenida en el retículo endoplásmico, sitio en donde ORF6 se encuentra anclado (Figura 29B).

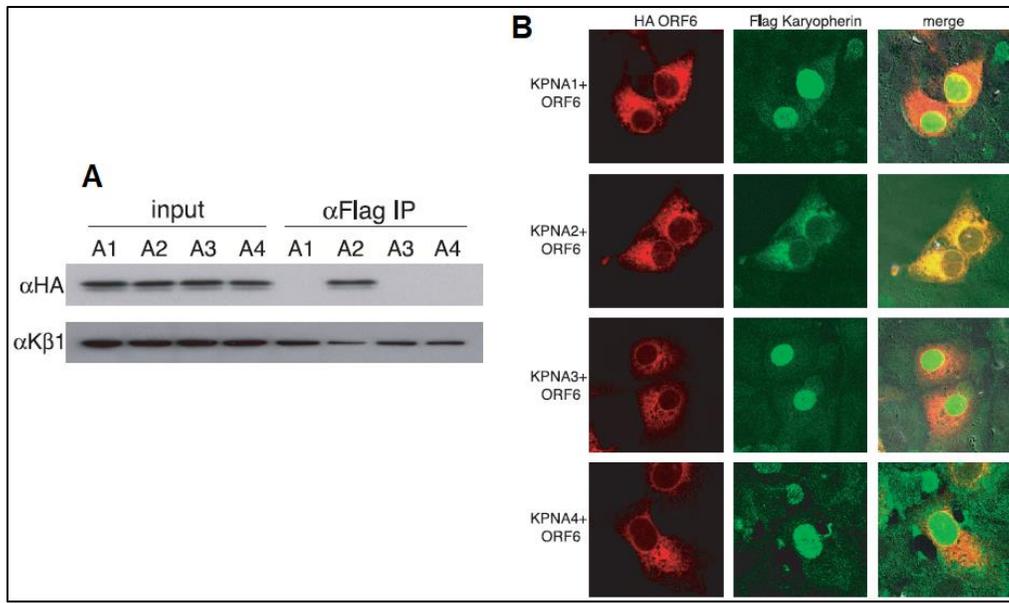


Figura 29. La proteína ORF6 de SARS-CoV retiene a KPNA2 en el retículo endoplásmico. (A) *Inmunoblots de los lisados de células 293 cotransfectadas con plásmidos para Flag-KPNA, HA-ORF6 y KPNB1.* (B) *Microscopía confocal de células 293 cotransfectadas con plásmidos para Flag-KPNA y HA-ORF6. Las células del primer panel (rojas) fueron tratadas con un anticuerpo primario anti-HA y anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 546, mientras que las del segundo panel (verdes) con anti-Flag y anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488. Tomado de: Frieman et al. (2007).*

Dado que STAT1 y el complejo ISGF3 no interactúan con KPNA2, sino con KPNA1:KPNB1, se abordó la posibilidad de que ORF6 utilice a KPNA2 para competir con KPNA1 por KPNB1 y así afectar el transporte de STAT1 al núcleo. Una vez comprobada la interacción de KPNA2 con KPNB1 (Figura 29A, inmunoblot inferior), se puso a prueba la hipótesis de que KPNA2 secuestra a KPNB1 en el retículo endoplásmico. Para tal fin, se transfectaron células Vero con los plásmidos codificantes para HA-ORF6 y Flag-KPNB1. Los resultados obtenidos mostraron que en ausencia de ORF6, KPNB1 se localizó en el núcleo, mientras que KPNB1 colocalizó con ORF6 en las células que expresaron ambas proteínas (Figura 30A) (Frieman *et al.*, 2007).

Para evaluar la interacción de KPNB1 con KPNA2:ORF6 *in vivo*, se transfectaron células 293 con plásmidos para cada Flag-KPNA y HA-ORF6. Después de obtener los lisados de las células se realizó un inmunoprecipitado con anti-HA y posteriormente inmunoblots con anti-Flag y anti-KPNB1. En los resultados se observó KPNB1 coimmunprecipitó con KPNA2:ORF6, confirmándose la hipótesis de que KPNA2 une a KPNB1 *in vivo* (Figura 30B) (Frieman *et al.*, 2007).

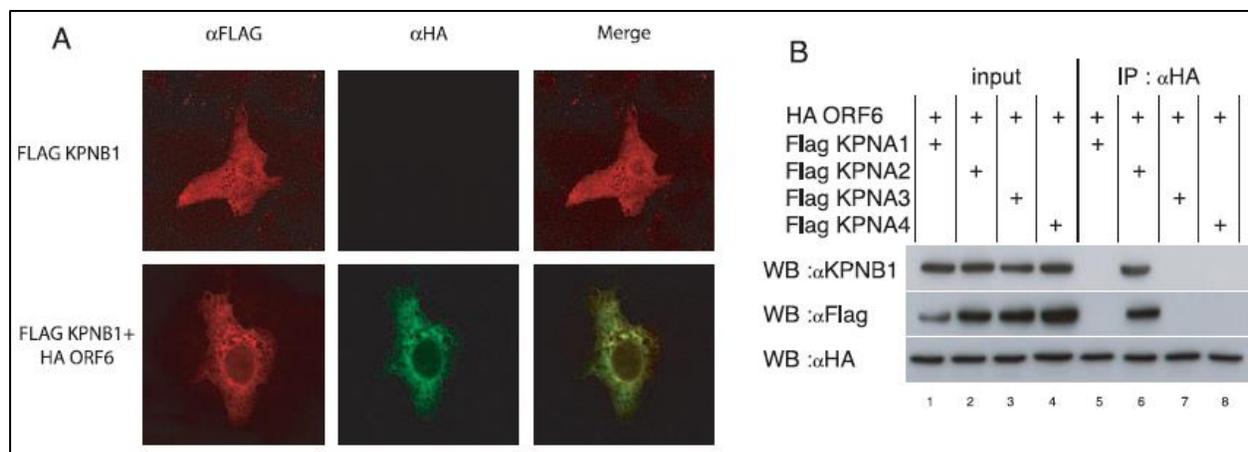


Figura 30. KPNB1 se localiza en el retículo endoplásmico en presencia de ORF6 de SARS-CoV e interactúa con KPNA2:ORF6 in vivo. (A) Microscopía confocal de células 293 transfectadas con plásmidos para Flag-KPNB1 y HA-ORF6. Las células del primer panel fueron tratadas con anticuerpo primario anti-Flag y anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 546, mientras que las del segundo panel con anti-HA y anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488. (B) Inmunoblots obtenidos empleando anti-KPNB1, anti-Flag y anti-HA. Tomado de: Frieman et al. (2007).

2.7 Interferencia de proteínas de SARS-CoV-2 sobre la síntesis de IFN-I y la vía Jak-STAT.

Como se ha podido apreciar en secciones previas, los estudios presentados para las proteínas de SARS-CoV y MERS-CoV se han desarrollado durante varios años desde la identificación de los coronavirus en cuestión y por ello, la mayoría de las investigaciones abordadas han retomado trabajos como antecedente para realizar estudios en los que elucidan los mecanismos de inhibición de las proteínas virales e incluso para algunas de ellas se ha determinado cuáles son las regiones estructurales involucradas.

En el caso de SARS-CoV-2, dada su reciente identificación en diciembre de 2019, las investigaciones realizadas a la fecha constan principalmente de ensayos en los que se evalúa el potencial antagonista de IFN-I de diversas proteínas de SARS-CoV-2, y únicamente para algunas de ellas se han hecho estudios específicos que brindan más detalles sobre su papel en la patología provocada por SARS-CoV-2. En cualquiera de los casos, en este trabajo se han reunido las investigaciones más actuales y concluyentes sobre las proteínas que SARS-CoV-2 emplea para retrasar la síntesis y respuesta mediada por IFN-I.

Uno de los primeros estudios en los que se examinó el potencial inhibitorio de IFN-I de las proteínas de SARS-CoV-2 fue el desarrollado por Li *et al.* (2020), quienes sintetizaron plásmidos codificantes para las proteínas estructurales (S, E, M y N) y accesorias ORF3a, 6, 7a, 8 y 10, cada una de ellas fusionada a la etiqueta HA.

Para examinar el posible potencial antagonista de cada proteína, se transfectaron células HEK293T con cada uno de los plásmidos para las proteínas virales, en combinación con diferentes quimeras del gen reportero luciferasa bajo el control de los promotores de IFN- β , NF κ B e ISRE. Como control negativo se empleó un plásmido “vacío” (no codificante) mientras que como control positivo se utilizó el plásmido codificante para la proteína NS1 del virus A de influenza. A las 24 hpt las células se infectaron con SeV para inducir la síntesis de IFN- β , y por tanto, la de ISG bajo el control de ISRE. Una vez transcurridas 18 hpi (horas post-infección), se obtuvieron lisados de las células y se midió la actividad de la luciferasa. Para cada uno de los tres promotores evaluados, las proteínas N, ORF6 y ORF8 redujeron su activación IFN- β (reducción del 30%-75%), ISRE (40%-75%) y NF κ B (~50%~30%) (Figura 31) (Li *et al.*, 2020).

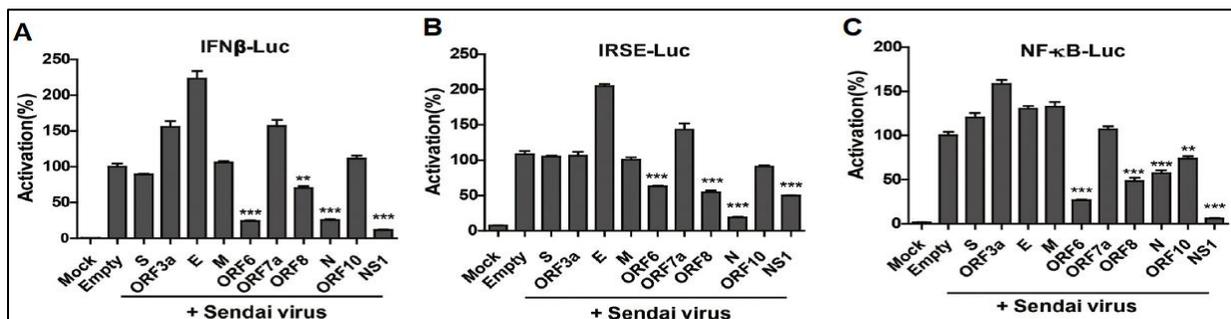


Figura 31. Las proteínas N, ORF6 y ORF8 de SARS-CoV-2 disminuyen la activación de los promotores IFN- β , ISRE y NF κ B. (A), (B) y (C). Porcentajes de activación de los promotores IFN- β , ISRE y NF κ B, respectivamente (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Tomado de: Li *et al.* (2020).

Al evaluar diferentes concentraciones de N, ORF6 y ORF8, se registró el mismo comportamiento inhibitorio sobre la activación de los promotores, además de observarse que ORF6 es el antagonista más potente y que se le requiere en menor cantidad para que muestre su efecto (Li *et al.*, 2020).

Asimismo, al modificar la estimulación de SeV por IFN- β se determinó que únicamente la proteína N inhibe la síntesis de IFN-I, mientras que ORF6 y ORF8 no solo inhiben la síntesis de IFN-I sino también su señalización, característica que les hace inhibidores más versátiles en SARS-CoV-2 (Figura 32) (Li *et al.*, 2020).

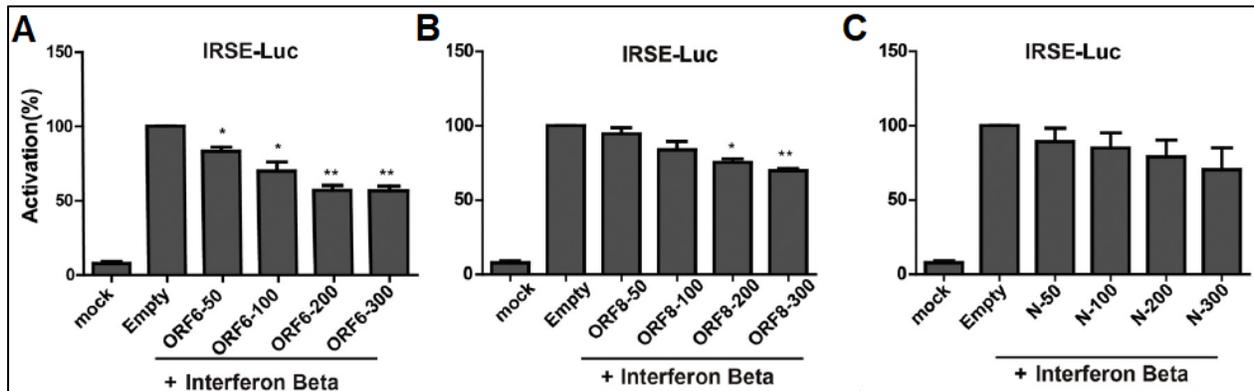


Figura 32. Las proteínas ORF6 y ORF8 de SARS-CoV-2 disminuyen la activación del promotor ISRE bajo condiciones de estimulación con IFN- β . *Proteína-cantidad en μg . (A), (B) y (C). Porcentajes de activación del promotor ISRE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Tomado de: Li *et al.* (2020).*

Finalmente, se estudió cómo la presencia de N, ORF6 y ORF8 repercute sobre el nivel de transcritos de IFN- β y algunos ISGs, en específico ISG56 e ISG54. De manera similar a los experimentos previos, se transfectaron células HEK293T con los plásmidos codificantes para N, ORF6 y ORF8, posteriormente se infectaron con SeV y por último se colectaron las células para lisarles y determinar mediante qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) los niveles de mRNA de IFN- β , ISG56 e ISG54. Los resultados coincidieron con las determinaciones anteriores pues las tres proteínas causaron una disminución significativa en la producción de los transcritos de IFN- β e ISGs (Li *et al.*, 2020).

Con este primer estudio Li *et al.* (2020) concluyeron que SARS-CoV-2 cuenta con tres proteínas con actividad antagonista de IFN-I. Las proteínas ORF6 y ORF8 inhiben la síntesis de IFN-I e ISGs mientras que la proteína N únicamente inhibe la síntesis de IFN-I. Asimismo, con base en los resultados se determinó que ORF6 requiere de bajas concentraciones para ejercer su actividad, además de ser la proteína que provoca mayor disminución en la activación de los promotores de IFN- β , NF κ B, ISRE y sus productos.

De manera similar a Li *et al.* (2020), el grupo de Lei *et al.* (2020) desarrolló una investigación para evaluar el potencial antagonista de las proteínas de SARS-CoV-2, ampliando el conjunto de proteínas estudiadas, siendo un total de 23 que incluyó a las nsps.

Previo al estudio de las proteínas virales, se infectaron células Calu-3 (una línea celular de epitelio pulmonar) con SeV o SARS-CoV-2. A diferentes tiempos se seleccionaron células para determinar la carga viral y, por otro lado, mediante qPCR los niveles de transcrito de IFN- β e ISG56. Al comparar los valores obtenidos se observó que SARS-CoV-2 induce bajos niveles de IFN- β e ISG56 durante las 12 hpi, sin embargo, a las 24 hpi ambos transcritos se elevan drásticamente, tiempo que coincidió con el máximo del título viral. Por el contrario, desde las 4 hpi SeV induce de manera considerable la expresión de IFN- β e ISG56, y a las 8 hpi los niveles de transcrito alcanzaron sus valores máximos (Figura 33) (Lei *et al.*, 2020).

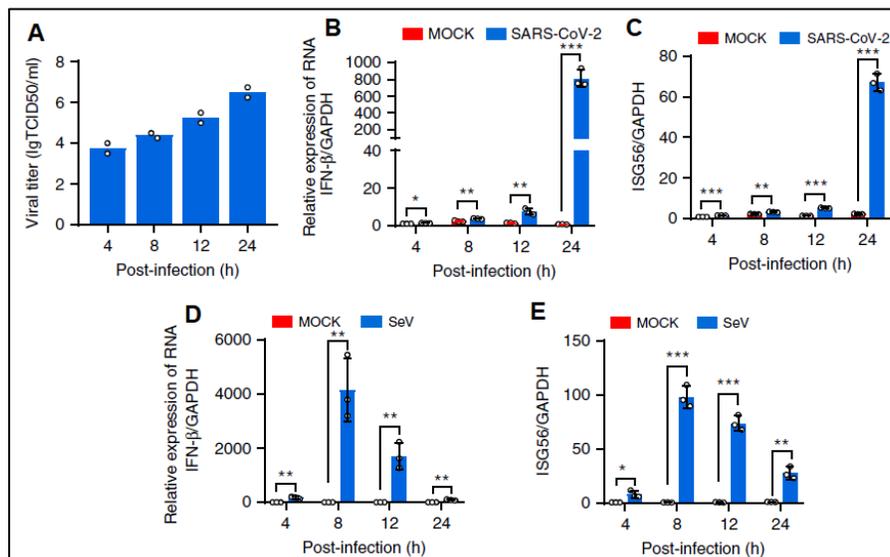


Figura 33. SARS-CoV-2 retrasa la síntesis de los transcritos de IFN- β e ISG56, además de inducir bajos niveles de los mismos en comparación con SeV. (A) Carga viral de SARS-CoV-2 a diferentes tiempos pi. Los valores se determinaron mediante TCID₅₀ (Fifty percent Tissue Culture Infectious Dose). (B), (C). Niveles relativos de RNA de IFN- β e ISG56, respectivamente en células infectadas con SARS-CoV-2. (D), (E) Niveles relativos de RNA de IFN- β e ISG56, respectivamente en células infectadas con SeV (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). Tomado de: Lei *et al.* (2020).

Una vez demostrado que SARS-CoV-2 retrasa y reduce la síntesis de IFN- β e ISG56, se sintetizaron plásmidos codificantes para nsp1-10, nsp12-16, S, E, M, N,

ORF3, ORF6, ORF7a, ORF8b y el dominio PLpro de nsp3. Tras confirmar la expresión de cada proteína se procedió a transfectar células 293T con los plásmidos de las proteínas virales, así como el vector reportero IFN- β -Luc. Después de 24 hpt., las células se infectaron con SeV y transcurridas 12 hpi se midió la actividad de la enzima luciferasa para cada condición con las proteínas de SARS-CoV-2 (Figura 34). Del conjunto de proteínas evaluadas, nsp1, nsp3 (PLpro), nsp12-14, ORF3, ORF6, M y N disminuyeron significativamente la activación del promotor de IFN- β , destacando entre ellas nsp1 y nsp13, siendo la primera la de mayor potencial antagonista, pues inhibió por completo la activación del promotor (Lei *et al.*, 2020).

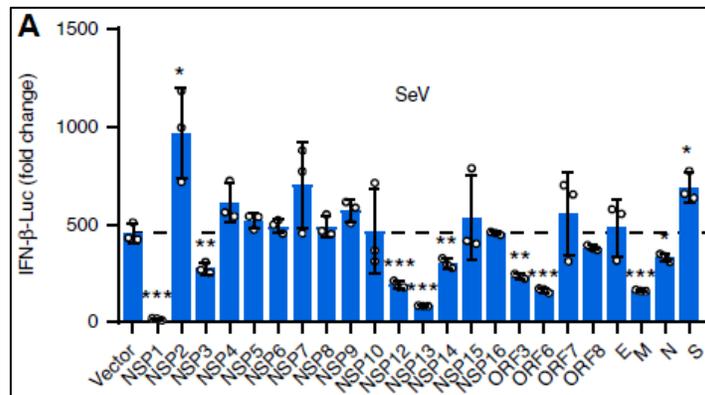


Figura 34. Las proteínas nsp1, nsp3 (PLpro), nsp12-14, ORF3, ORF6, M y N de SARS-CoV-2 disminuyen la activación del promotor de IFN- β . (A) Niveles de activación del plásmido reportero IFN- β -Luc por cada una de las proteínas virales mostradas (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001). Tomado de: Lei *et al.* (2020).

A pesar de que nsp1 se identificó como el antagonista más potente, la investigación se enfocó en el estudio de ORF6, ya que de entre las proteínas con actividad inhibitoria compartidas con SARS-CoV, ésta se reportó como la proteína con menor grado de conservación.

Para conocer el nivel al cual ORF6 interfiere para inhibir la síntesis de IFN- β , se cotransfectaron células 293T con combinaciones de diferentes plásmidos: un reportero (IFN- β -Luc), el codificante para ORF6 y alguno de los plásmidos de RIG-I-N, MDA5, MAVS o IRF3-5D. ORF6 redujo la activación del promotor de IFN- β de manera dependiente de su concentración al coexpresarse con cada uno de los factores involucrados en la vía de señalización (Figura 35) (Lei *et al.*, 2020).

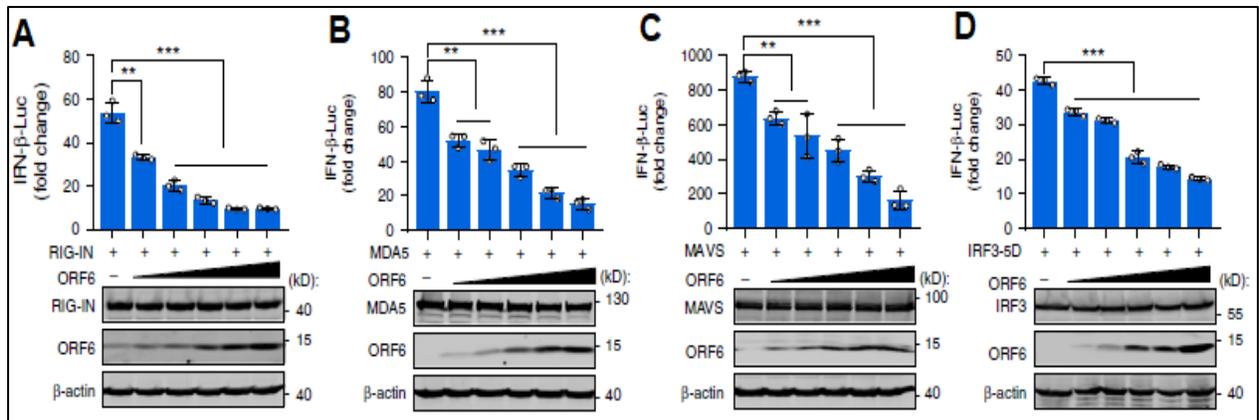


Figura 35. La proteína ORF6 de SARS-CoV-2 disminuye la activación del promotor de IFN- β inducida por RIG-I-N, MDA5, MAVS e IRF3-5D. (A), (B), (C) y (D) Niveles de activación del plásmido reportero IFN- β -Luc inducido por RIG-I-N, MDA5, MAVS e IRF3-5D, respectivamente, tanto en ausencia de ORF6 como a diferentes concentraciones del mismo (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). La proteína β -actina se empleó como control de carga. Tomado de: Lei et al. (2020).

Esta serie de resultados sugirieron que ORF6 actúa al nivel de activación de IRF3 o en un paso posterior, lo cual fue confirmado mediante un ensayo de inmunofluorescencia en el que se observó que ORF6 inhibe la translocación nuclear de IRF3 en células HEK293T (Figura 36) (Lei et al., 2020).

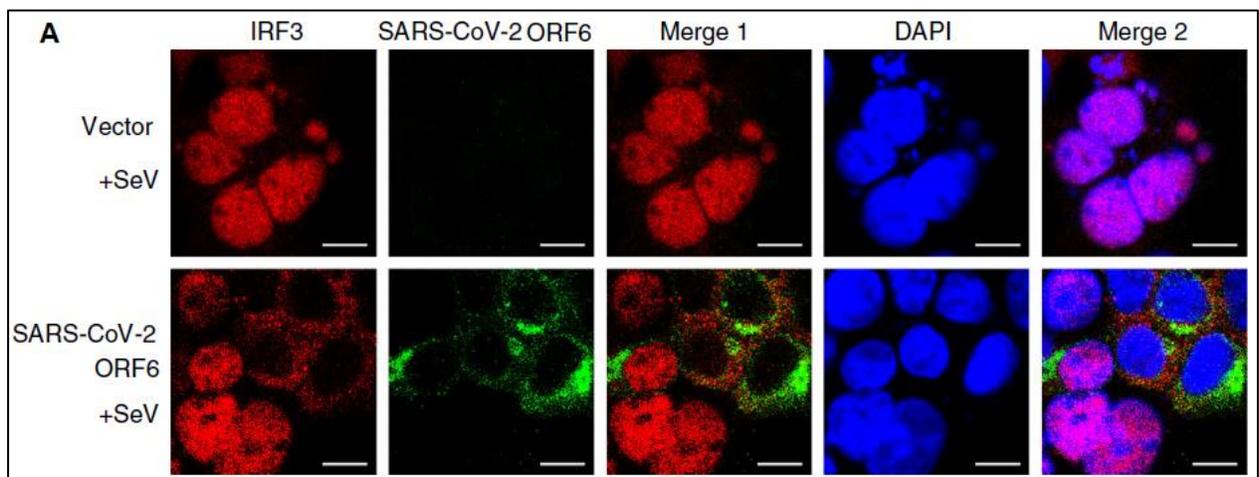


Figura 36. La proteína ORF6 de SARS-CoV-2 inhibe la translocación nuclear de IRF3. (A) Microscopía confocal de células HEK293T productoras de IRF3. Las células del panel superior se transfectaron con un vector vacío (no codificante), mientras que las del panel inferior fueron transfectadas con el plásmido de ORF6. Tomado de: Lei et al. (2020).

Considerando que el ortólogo de ORF6 en SARS-CoV inhibe la señalización de IFN-I mediante la translocación nuclear de STAT1 (Frieman et al., 2007) se determinó si

ORF6 reduce la activación de un promotor con elementos ISRE. Con el interés de identificar todas proteínas virales de SARS-CoV-2 con dicha actividad, se examinó el conjunto de 23 proteínas disponibles. Para realizar este análisis se transfectaron células con cada uno de los plásmidos de las proteínas virales junto con el plásmido reportero ISRE-Luc, y tras 24 hpt se estimularon con IFN- β durante 12 h, después de lo cual se midió la actividad de la enzima luciferasa. Con este ensayo se comprobó que ORF6 inhibe la señalización mediada por IFN-I, actividad que también mostraron nsp1, PLpro, nsp13-14, ORF8, N y S, entre los cuales nuevamente nsp1 fue el antagonista más potente (Figura 37) (Lei *et al.*, 2020).

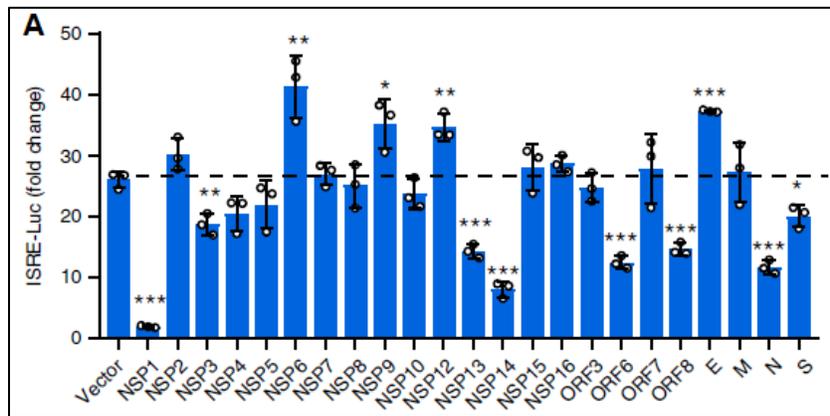


Figura 37. Las proteínas nsp1, nsp3 (PLpro), nsp13-14, ORF6, ORF8, N y S de SARS-CoV-2 disminuyen la activación del promotor con elementos ISRE. (A) Niveles de activación del plásmido reportero ISRE-Luc por cada una de las proteínas virales mostradas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Tomado de: Lei *et al.* (2020).

Después de demostrar el potencial inhibitorio de ORF6 sobre la señalización de IFN-I, se retomó el enfoque en dicha proteína y se procedió a examinar su habilidad para bloquear la translocación nuclear de STAT1. Para abordarlo se transfectaron células con el plásmido codificante de ORF6 y una vez transcurridas 24 hpt se estimularon con IFN- β durante 30 min. Los análisis por inmunofluorescencia de las células proporcionaron evidencia de que ORF6 reduce la translocación nuclear de STAT1 del 28% en el grupo control, hasta el 4% en células productoras de ORF6 (Figura 38) (Lei *et al.*, 2020).

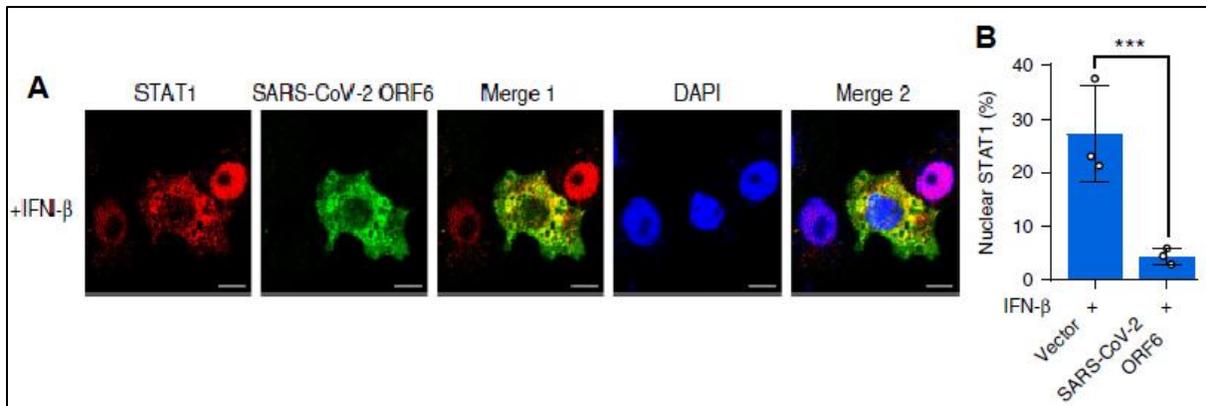


Figura 38. La proteína ORF6 de SARS-CoV-2 inhibe la translocación nuclear de STAT1. (A) Microscopía confocal de células HEK293T cotransfectadas con STAT1 y ORF6. (B) Porcentaje de STAT1 nuclear en células transfectadas con vector control no codificante o el plásmido de ORF6. Tomado de: Lei *et al.* (2020).

Con esta segunda investigación se concluyó que las proteínas ORF3, nsp12 y M inhiben la síntesis de IFN-I, ORF8 y S interfieren sobre la señalización mediada por interferón, mientras que nsp1, nsp3 (PLpro), nsp13-14, ORF6 y N inhiben tanto la síntesis como la señalización de IFN-I. De igual forma, con este trabajo Lei *et al.* (2020) identificaron a nsp1 como el antagonista más potente de SARS-CoV-2. Por otro lado, se demostró que ORF6 bloquea la translocación nuclear de IRF3 y STAT1, inhibiendo así la síntesis y señalización de IFN-I, respectivamente.

A diferencia de los estudios antes abordados en los que se evaluaron proteínas estructurales, nsps y accesorias, el grupo de Konno *et al.* (2020) se enfocó en las proteínas accesorias tomando como antecedente la literatura en donde se identificaron a ORF3b (Freundt *et al.*, 2009) y ORF6 (Frieman *et al.*, 2007) como antagonistas de IFN-I en SARS-CoV.

Como primera aproximación en el estudio se hizo una comparación individual de cada ORF codificante de proteínas accesorias de SARS-CoV y SARS-CoV-2. Los resultados obtenidos mostraron que cada pareja de ORFs conserva una longitud muy similar, excepto ORF3b, la cual en SARS-CoV-2 presenta una longitud de 66 pb (22 aminoácidos), mientras que su ortólogo en SARS-CoV posee un tamaño de 459 pb (153 aminoácidos). Debido a esta notable diferencia, los autores formularon la hipótesis

de que ORF3b de SARS-CoV-2, contrario a su ortólogo, posiblemente carecería de actividad antagonista sobre la síntesis de IFN-I (Konno *et al.*, 2020).

Para probar la actividad antagonista de ORF3b de SARS-CoV-2, se realizó un ensayo dual de luciferasa con el plásmido reportero IFN- β -Luc, a partir del cual se determinó el potencial inhibitorio sobre la activación del promotor de IFN- β inducido por la infección con SeV. Los valores obtenidos proporcionaron evidencia de que ORF3b de SARS-CoV-2, al igual que su ortólogo, reduce significativamente la activación del promotor de IFN- β de manera dosis-dependiente (Figura 39A). Por el contrario, al medir la expresión relativa del transcrito de *IFNB1* se observó que únicamente ORF3b de SARS-CoV-2 causó una reducción significativa de ~33% (Figura 39B) (Konno *et al.*, 2020).

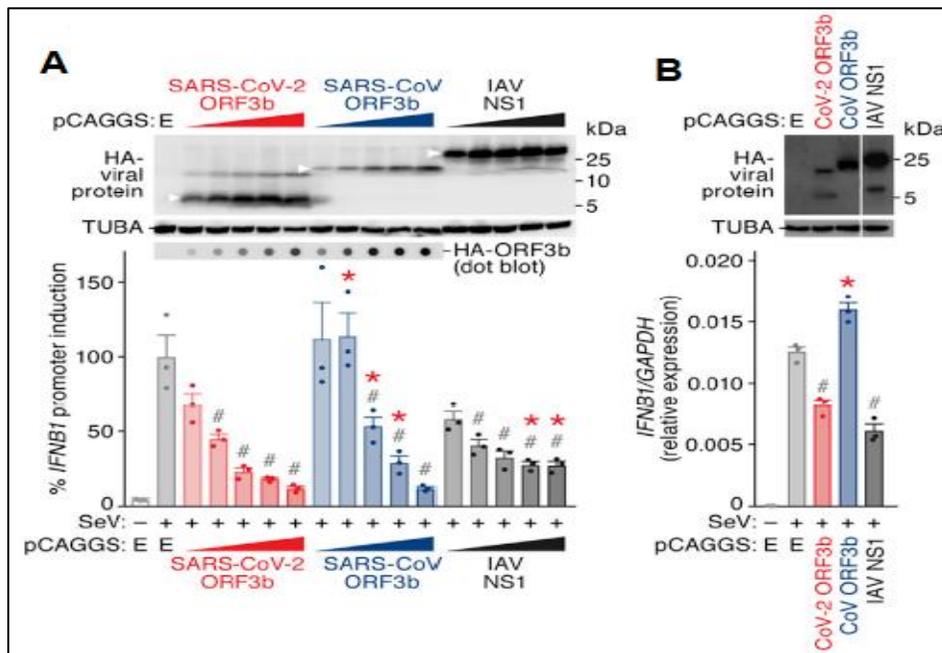


Figura 39. La proteína ORF3b de SARS-CoV-2 reduce significativamente la activación del promotor de IFN- β y el transcrito del gen *IFNB1*. (A) Porcentajes de activación del promotor de IFN- β al emplear diferentes cantidades (50, 100, 200, 300 o 500 ng) del plásmido HA-ORF3b de SARS-CoV-2 y SARS-CoV, y IAV HA-NS1. (B) Niveles relativos del transcrito de *IFNB1*. En ambos experimentos se empleó NS1 como control positivo. El gen constitutivo *GAPDH* se utilizó como control en las determinaciones por qPCR. Tomado de: Konno *et al.* (2020).

Cuando se comparó la actividad inhibitoria entre ORF3b de SARS-CoV-2 (cepa Wuhan-Hu-1) y nueve variantes de ORF3b de SARS-CoV sobre la expresión de IFN- β , se encontró que ORF3b de SARS-CoV-2 inhibió significativamente la activación del

promotor de IFN- β (~50% de reducción), mientras que sólo Tor2, BJ1B2-4, P3pp1 y P3PP46 de SARS-CoV mostraron potencial antagonista (Konno *et al.*, 2020).

Dado que algunas variantes ORF3b de SARS-CoV poseen NLS (Nuclear Localization Sequence), mientras que otras no (al igual que ORF3b de SARS-CoV-2), se estudió su participación en la capacidad inhibitoria. Para ello, se generaron dos mutantes de ORF3b, una de Tor2 (de bajo potencial antagonista) con un codón de paro en la posición 115 del extremo C-terminal (L115*) para eliminar su NLS (conformada por los residuos de aminoácidos 135-153), y otra de ORF3b Rs4231 (de considerable potencial antagonista, perteneciente a un coronavirus relacionado con SARS-CoV), a la cual se le añadió la secuencia NLS. Con un ensayo dual de luciferasa (Figura 40A) y de localización nuclear (Figura 40B) se confirmó que la ausencia de NLS mejora el potencial inhibitorio de ORF3b Tor2 mientras que su adición en ORF3b Rs4231 reduce su capacidad como antagonista de IFN-I, indicativo de que la presencia de ORF3b en el citosol es crucial para su actividad inhibitoria (Konno *et al.*, 2020).

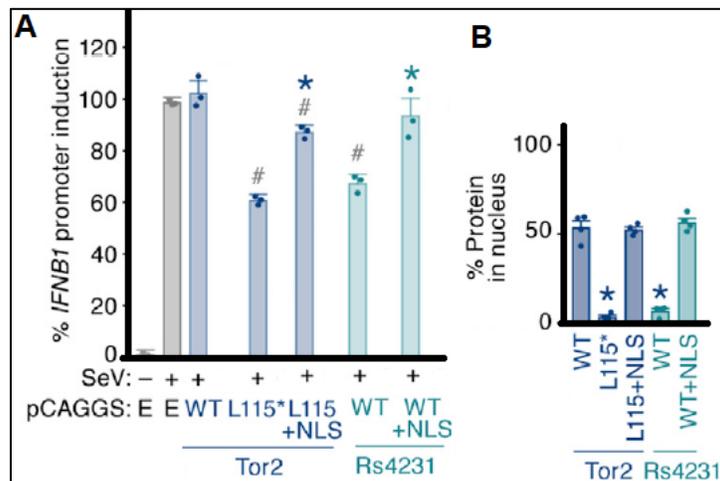


Figura 40. La ausencia de la secuencia NLS disminuye la localización nuclear y mejora el potencial inhibitorio de ORF3b Tor2 sobre la activación del promotor de IFN- β . (A) Porcentajes de activación del promotor de IFN- β en presencia de diferentes variantes (WT y mutantes con o sin NLS) de ORF3b Tor2 y Rs4231. (B) Porcentajes de localización nuclear de las variantes de ORF3b Tor2 y Rs4231 (* $p < 0.05$). Tomado de: Konno *et al.* (2020).

El gen ORF3b de SARS-CoV-2 está conservado entre las 17000 secuencias depositadas en GISAID (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data). Sin embargo, dentro de éstas, se identificaron dos secuencias idénticas carentes del codón

de paro característico de ORF3b parental de SARS-CoV-2, alcanzando un tamaño de 56 aminoácidos que también implica la ausencia de NLS. Debido a que ambas variantes fueron obtenidas de distintos pacientes con síntomas graves de COVID-19 en Quito, Ecuador se consideró que podría tratarse de una nueva variante de ORF3b en SARS-CoV-2. Para determinar el potencial inhibitorio de esta variante natural, ORF3b Ecuador, se realizó un ensayo dual de luciferasa en el que se le comparó con ORF3b WT de SARS-CoV-2. Los valores registrados demostraron que la represión del promotor de IFN- β y de IRF3 causada por la variante ORF3b Ecuador fueron 40% y 30% mayores, respectivamente que las provocadas por WT ORF3b (Konno *et al.*, 2020).

En esta investigación se concluyó que ORF3b de SARS-CoV-2 posee potencial antagonista de IFN-I que se ve potenciado con la ausencia de la secuencia NLS en su extremo C-terminal, por lo que permanece en el citoplasma donde, a través de un mecanismo aún desconocido, bloquea la actividad de IRF3. Asimismo, se identificó una nueva variante denominada ORF3b Ecuador de SARS-CoV-2, misma que mostró mayor actividad antagonista respecto a ORF3b parental, indicativo de que el presente coronavirus SARS-CoV-2 continúa evolucionando y con ello, adquiriendo nuevas características que le hacen potencialmente más patógeno (Konno *et al.*, 2020).

Xia *et al.* (2020) hicieron un estudio exhaustivo enfocado tanto en la identificación de proteínas de SARS-CoV-2 con actividad anti-IFN-I, como en la elucidación de sus posibles mecanismos de inhibición.

Al igual que en investigaciones previas, tras verificar la expresión de los plásmidos codificantes para cada una de las 26 proteínas virales (nsp1-2, nsp4-16, S, E, M, N, ORF3a, b, ORF6, ORF7a, b, ORF8 y ORF10), se realizó una primera aproximación mediante un estudio en el que se evaluó su capacidad para inhibir la activación del promotor de IFN- β . Los resultados del ensayo dual de luciferasa mostraron que de entre las 26 proteínas, nsp1 y ORF6 fueron los antagonistas más potentes causando una reducción del 98% y 91% de la actividad de la luciferasa, respectivamente, mientras que nsp6 y nsp13 indujeron reducciones significativas del 40% y 48%, respectivamente (Figura 41) (Xia *et al.*, 2020).

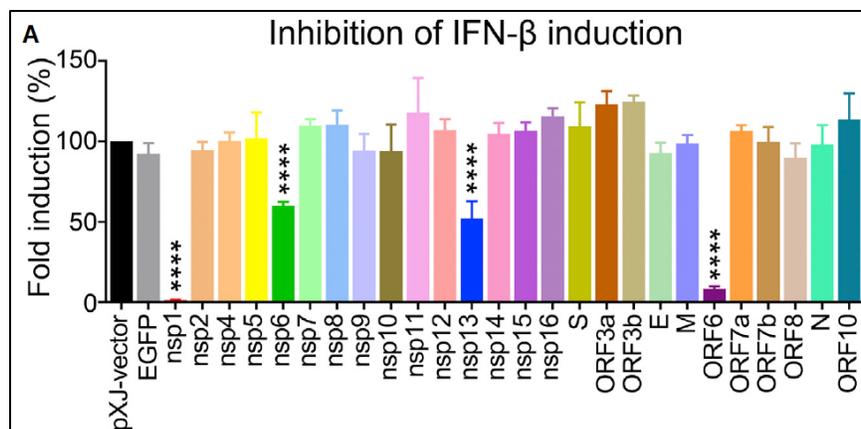


Figura 41. Las proteínas nsp1, nsp6, nsp13 y ORF6 de SARS-CoV-2 reducen significativamente la activación del promotor de IFN- β . (A) Porcentajes de inducción del vector IFN- β -Luc al transfectar células HEK293T con alguno de los plásmidos codificantes para cada una de las proteínas virales mostradas (**** $p < 0.0001$). El plásmido pXJ-vector no codifica para proteína alguna y se utilizó como control. Igualmente, el plásmido EGFP se incluyó como control, ya que fue añadido a nsp11 para hacerle detectable. Tomado de: Xia et al. (2020).

Después de identificar las proteínas antagonistas de la síntesis de IFN-I, se buscó determinar el nivel al cual actúan cada una de ellas. Para ello, se transfectaron células HEK293T con los plásmidos codificantes para nsp1, nsp6, nsp13 y ORF6, además del vector reportero IFN- β -Luc y alguno de los plásmidos para un componente de la vía de señalización: MAVS, TBK1, IKK ϵ o IRF3-5D (Xia et al., 2020).

La activación mediada por MAVS, TBK1 o IKK ϵ se suprimió significativamente por nsp6 y nsp13. IRF3-5D restauró la actividad de la luciferasa del 60% al 98% para nsp6 y del 52% al 87% para nsp13, con lo cual se dedujo que ambas proteínas virales actúan en pasos previos y/o al nivel de la activación de IRF3. Por otro lado, nsp1 mostró un perfil de reducción similar a nsp6 y nsp13 con la diferencia de que IRF3-5D sólo restauró ~20% de la activación del promotor de INF- β . En lo concerniente a ORF6, independientemente del factor involucrado, causó una reducción de ~70% en la activación del promotor de INF- β , de modo que inhibe en etapas previas o después de la activación de IRF3 (Figura 42) (Xia et al., 2020).

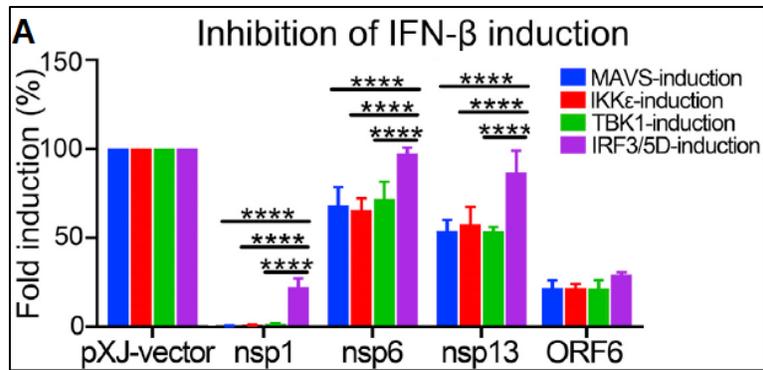


Figura 42. Las proteínas nsp1, nsp6, nsp13 y ORF6 de SARS-CoV-2 reducen la activación del promotor de IFN- β a distintos niveles de la vía por RLRs. (A) Porcentajes de inducción del vector IFN- β -Luc al transfectar células HEK293T con alguno de los plásmidos codificantes para una proteína viral (nsp1, nsp6, nsp13 u ORF6) y un plásmido para algún factor de la vía (MAVS, IKK ϵ , TBK1 o IRF3-5D) (**** $p < 0.0001$). El plásmido pXJ-vector no codifica para proteína alguna y se utilizó como control. Tomado de: Xia *et al.* (2020).

Con base en los resultados previos, se diseñaron ensayos para determinar específicamente el nivel al cual actúan nsp6, nsp13 y ORF6. Nsp1 no fue incluido debido a que en estudios recientes (Thoms *et al.*, 2020) se reportó que inhibe la síntesis de IFN-I e ISGs mediante el bloqueo global de la traducción de mRNAs del hospedero.

A través de un análisis de los niveles de IRF3 fosforilado en presencia de nsp6, nsp13 y ORF6 se dedujo que únicamente nsp6 y nsp13 actúan en etapas previas a la activación de IRF3, mientras que ORF6 lo hace posteriormente. Para determinar si nsp6 y nsp13 suprimen la fosforilación de TBK1, se cotransfectaron células HEK293T con un plásmido codificante para TBK1 y otro ya sea para nsp6 o nsp13. A las 24 hpt se midieron los niveles de TBK1 fosforilado, los cuales indicaron que únicamente nsp13 afecta la activación de TBK1 (Figura 43A) (Xia *et al.*, 2020).

Paralelamente, se estudió la coimmunoprecipitación de ambas nsps con TBK1, encontrándose que tanto nsp6 como nsp13 interactúan con tal enzima (Figura 43B). En conjunto, estos resultados indicaron que nsp13 inhibe la fosforilación de TBK1, afectando así la activación de IRF3, mientras que nsp6 reduce los niveles de IRF3 fosforilado a través de su interacción con TBK1, probablemente bloqueando la formación del complejo activo con IKK ϵ (Xia *et al.*, 2020).

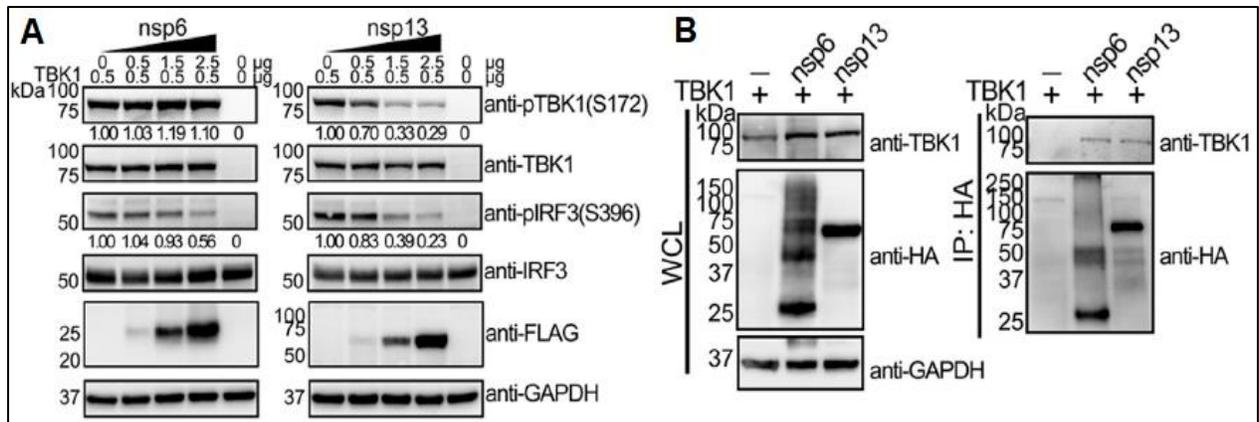


Figura 43. Las proteínas nsp6 y nsp13 de SARS-CoV-2 reducen la activación de IRF3 a través de distintos mecanismos. (A) Niveles de fosforilación de IRF3 y TBK1 a diferentes cantidades de los plásmidos de nsp6-Flag y nsp13-Flag. (B) Inmunoprecipitados obtenidos de células cotransfectadas con TBK1 y nsp6-HA o nsp13-HA. En ambos experimentos la expresión de GAPDH se empleó como control. Tomado de: Xia et al. (2020).

Por otro lado, continuando con los estudios de ORF6, se midieron los niveles de IRF3 nuclear en células HEK293T transfectadas con el plásmido de ORF6 y estimuladas con poly(I:C), además de analizar su posible interacción con factores de importación nuclear KNPA1-6. Concordando con lo reportado por Lei et al. (2020), ORF6 inhibe la translocación nuclear de IRF3 y al igual que su ortólogo en SARS-CoV (Frieman et al., 2007), interactúa con KPNA2 (Figura 44) (Xia et al., 2020).

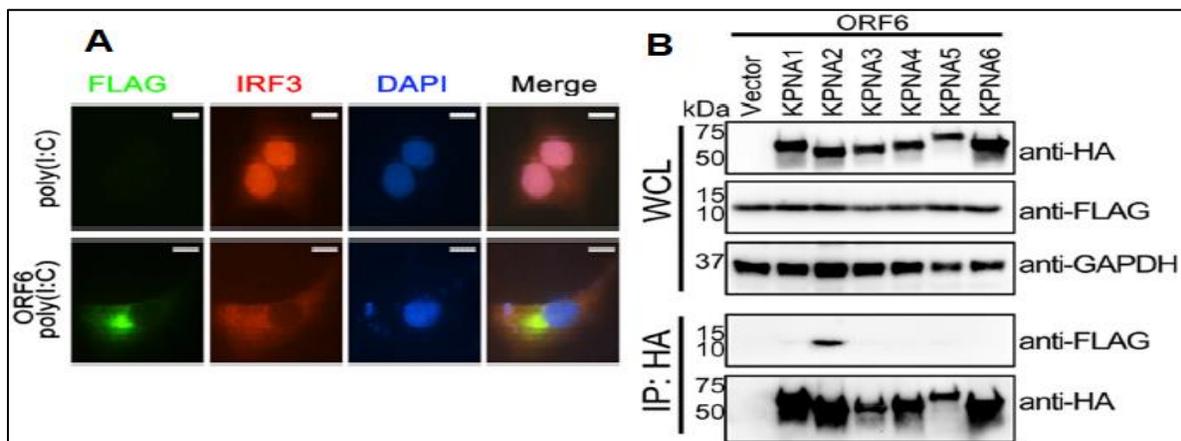


Figura 44. La proteína ORF6 de SARS-CoV-2 inhibe la translocación nuclear de IRF3 e interactúa con KPNA2. (A) Microscopía confocal de células A549 transfectadas con ORF6-Flag y estimuladas con poly(I:C). Para visualizar las células se utilizaron anticuerpos primarios anti-Flag y anti-IRF3 y los anticuerpos secundarios anti-Alexa Fluor 488 (verde) y anti-Alexa Fluor 568 (rojo), respectivamente. (B) Inmunoprecipitados obtenidos con células cotransfectadas con plásmidos codificantes para KPNA1-6-HA y ORF6-Flag. La expresión de GAPDH se empleó como control. Tomado de: Xia et al. (2020).

En lo que respecta a la inhibición de la señalización mediada por IFN-I, se realizó un ensayo dual de luciferasa (análogo al realizado para determinar los antagonistas de la síntesis de IFN- β) utilizando el vector reportero ISRE-Luc, con el cual se evaluaron 26 proteínas de SARS-CoV-2. Con los resultados de este nuevo panel se identificaron a nsp1, nsp6, nsp7, nsp13, nsp14, ORF3a, ORF7a y ORF7b como antagonistas de la señalización de IFN- α (Xia *et al.*, 2020).

Debido a que nsp1, nsp6, nsp13, ORF3a, M, ORF6, ORF7a y ORF7b provocaron una disminución mayor al 40% en la activación del promotor ISRE, se estudió la capacidad de cada una de dichas proteínas para bloquear la fosforilación de STAT1 y STAT2. Para esta determinación se transfectaron células HEK293T con un plásmido codificante para una de las proteínas virales, se estimularon con IFN- α y finalmente se analizaron los niveles de STAT1 y STAT2 fosforilados (Xia *et al.*, 2020).

Los resultados mostraron que nsp1, nsp6, nsp13, ORF3a, ORF7b y M suprimen la activación de STAT1 en un rango del 33%-46%, mientras que ORF6 y ORF7a tuvieron un efecto pobre como inhibidores. Respecto a STAT2, su fosforilación fue reducida en un intervalo del 33%-55% por nsp6, nsp13, ORF7a y ORF7b. Por el contrario, la reducción de la activación de STAT2 por nsp1, ORF6, ORF3a y M no fue significativa (Figura 45) (Xia *et al.*, 2020).

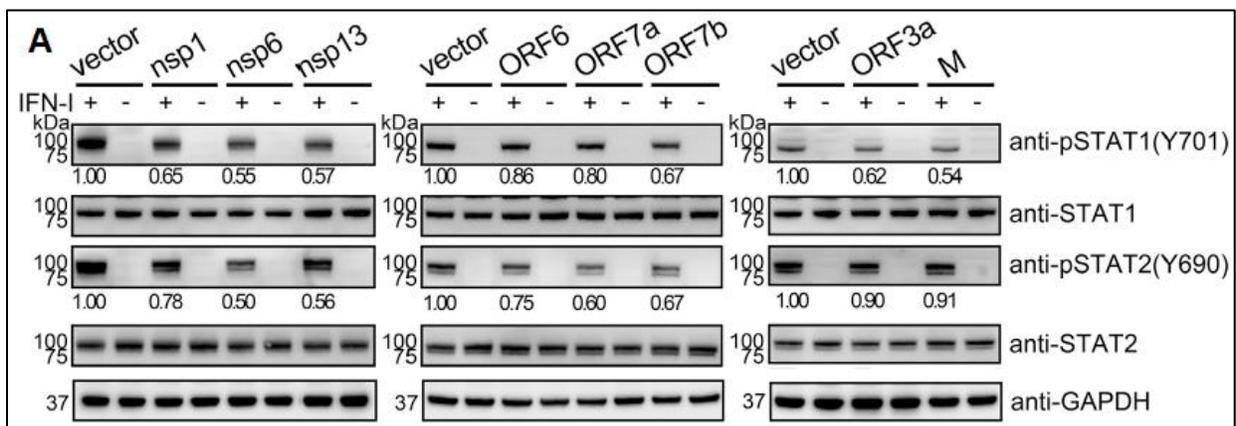


Figura 45. SARS-CoV-2 emplea proteínas estructurales, nsps y accesorias para reducir la activación de STAT1 y STAT2. (A) Niveles de fosforilación de STAT1 y STAT2 en presencia de nsp1, nsp6, nsp13, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF3a y M. La expresión de GAPDH se empleó como control. La intensidad de las bandas de STAT1 y STAT2 (normalizada a 1.00 con el vector control) fue cuantificada con el software Image Lab. Tomado de: Xia *et al.* (2020).

Tomando en cuenta que ORF6 no bloquea la fosforilación de ninguna proteína STAT, pero sí interactúa con KPNA2, se planteó que ORF6 inhibe la translocación nuclear de STAT1. Para probar esta hipótesis se transfectaron células Vero con el plásmido de ORF6, se estimularon con IFN- α y se evaluaron los niveles de STAT1 nuclear. Confirmando la hipótesis, STAT1 únicamente se transloca al núcleo con estimulación de IFN- α y la ausencia de ORF6, cuya expresión provocó la permanencia de STAT1 en el citoplasma (Figura 46). Con estos resultados, se estableció que al igual que su ortólogo en SARS-CoV (Frieman *et al.*, 2007), ORF6 de SARS-CoV-2 inhibe la señalización de IFN-I mediante su interacción con KPNA2, con lo cual consigue bloquear la translocación nuclear de STAT1 (Xia *et al.*, 2020).

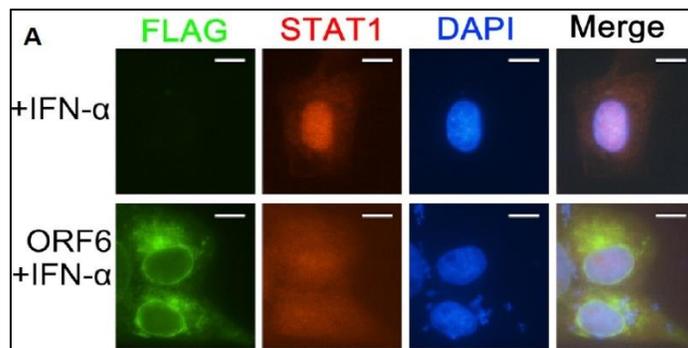


Figura 46. La proteína ORF6 de SARS-CoV-2 inhibe la translocación nuclear de STAT1. (A) Microscopía confocal de células Vero transfectadas con ORF6-Flag y estimuladas con IFN- α . Para visualizar las células se utilizaron anticuerpos primarios anti-Flag y anti-STAT1, y los anticuerpos secundarios anti-Alexa Fluor 488 (verde) y anti-Alexa Fluor 568 (rojo), respectivamente. Tomado de: Xia *et al.* (2020).

Con la información obtenida en esta investigación, Xia *et al.* (2020) concluyeron que SARS-CoV-2 cuenta con diferentes proteínas para contrarrestar la respuesta del hospedero. Nsp1, nsp6, nsp13 y ORF6 inhiben la síntesis de IFN-I, así como su señalización, mientras que nsp7, ORF3a, M, ORF7a y ORF7b bloquean la señalización mediada por IFN-I.

Al conjuntar los hallazgos reportados en las investigaciones con proteínas de SARS-CoV-2 se obtienen dos grupos de antagonistas implicados en la síntesis y/o en la señalización de IFN-I. Respecto al bloqueo de la síntesis de IFN-I, SARS-CoV-2 emplea a nsp1, nsp3, nsp6, nsp12-14, ORF3b, ORF6, ORF8, M y N. Por otro lado, para inhibir

la señalización de IFN-I, utiliza a nsp1, nsp3, nsp6, nsp7, nsp13-14, ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, N y S.

Analizando ambos grupos de proteínas de SARS-CoV-2 con actividad antagonista, se observa que mantiene todas proteínas descritas previamente ya sea en MERS-CoV y/o en SARS-CoV: N, M, nsp1, nsp3 (PLpro), ORF3b y ORF6. Asimismo, si bien es cierto que existen diferencias entre los resultados obtenidos y reportados por cada grupo de investigación (cuestión que se abordará en la discusión de este trabajo), es notable que en SARS-CoV-2 se han descrito una mayor cantidad de proteínas antagonistas de IFN-I, lo cual podría contribuir de manera importante a la supresión de la respuesta del hospedero, así como en el desarrollo complicaciones como el síndrome respiratorio agudo en la COVID-19.

2.8 Consecuencias del retraso en la síntesis y señalización mediada por interferón en las infecciones por SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2.

Uno de los aspectos clínicos más relevantes que comparten las enfermedades causadas por SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2, es la capacidad de progresión hacia un estado crítico en el que se desarrolla síndrome de distrés respiratorio agudo, el cual es un tipo de insuficiencia respiratoria caracterizada por la aparición de inflamación generalizada en los pulmones (Fan, Brodie & Slutsky, 2018). Esta condición ha sido atribuida al conjunto de efectos citopáticos inducidos por los coronavirus, así como a la desregulación de la respuesta inmune innata, la cual se ha asociado con el retraso de la síntesis y señalización mediada por interferón (Channappanavar *et al.*, 2016).

Con el objetivo de estudiar el papel inmunopatológico de la señalización de IFN-I, Channappanavar *et al.* (2016) trabajaron con dos grupos de ratones BALB/c, uno WT y otro grupo knockout para el receptor IFNAR (*Ifnar*^{-/-}). Ambos grupos de ratones fueron infectados con una dosis de SARS-CoV de 3x10⁴ PFU (Plaque-Forming Units). Al día 8 pi (post-infección) el 85% de los ratones WT BALB/c murieron, mientras que al día 10 pi los virus de SARS-CoV habían sido completamente eliminados de los pulmones de todos los ratones *Ifnar*^{-/-}. Estos resultados sugirieron que la señalización de IFN-I en la

infección por SARS-CoV contribuye al desarrollo de un estado crítico que puede llegar a ser mortal.

Debido al planteamiento de un posible rol inmunopatológico desencadenado por IFN-I, contrario a su actividad de protección desarrollada por la estimulación temprana de la respuesta inmune innata, se diseñó un conjunto de experimentos para analizar los periodos de replicación de SARS-CoV y la producción de IFN- β . El título viral máximo para ambos grupos de ratones se presentó aproximadamente a las 16 hpi. En lo que concierne a los niveles de IFN- β en muestras de fluido BALF (BronchoAlveolar Lavage Fluid) de ratones BALB/c, no se detectó IFN- β sino hasta las 24 hpi, comportamiento que fue similarmente registrado para las citocinas proinflamatorias CCL2, TNF e IL-6. Por el contrario, los niveles de IFN- β y citocinas proinflamatorias en ratones *Ifnar*^{-/-}, se mantuvieron bajos y relativamente constantes durante las 72 hpi en que se realizaron las mediciones (Figura 47) (Channappanavar *et al.*, 2016).

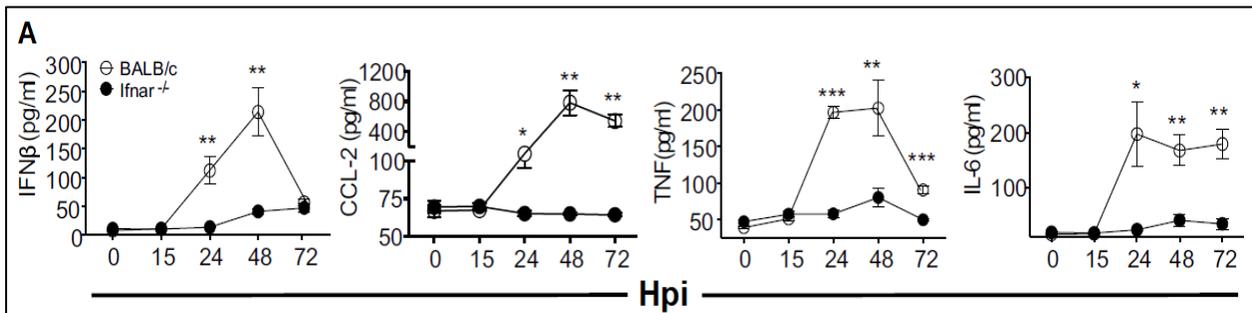


Figura 47. La ausencia del receptor IFNAR conduce a bajos niveles de IFN- β , CCL-2, TNF e IL-6. (A) Niveles de IFN- β , CCL-2, TNF e IL-6 en muestras BALF de ratones WT BALB/c e *Ifnar*^{-/-} (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001). Tomado de: Channappanavar *et al.* (2016).

Considerando que el retraso de la producción de IFN- β y citocinas proinflamatorias podría contribuir al desarrollo de una respuesta inmune innata desregulada, se evaluó el efecto de la administración de IFN- β recombinante antes de las 16 hpi. Los resultados obtenidos demostraron que con la administración a las 6 hpi se mantiene una supervivencia del 100% de los ratones tratados, a las 12 hpi el 40% sobrevive, y a las 24 hpi el 100% de los ratones mueren una vez transcurridos 7 días pi. Esta evidencia muestra que el IFN- β confiere una mayor supervivencia durante la infección por SARS-CoV, sólo si su producción es previa al tiempo en que se alcanza el máximo título viral (Channappanavar *et al.*, 2016).

Posteriormente, se analizó la actividad de IFN-I en el reclutamiento de células de la respuesta inmune innata. Durante los primeros 3 días pi el número total de neutrófilos, células NK, macrófagos alveolares y pDCs fueron equiparables entre los ratones BALB/c e *Ifnar*^{-/-}. Sin embargo, al día 3 pi se detectó que la población de células con fenotipo Ly6C^{hi}CD11b⁺ (identificadas como IMMs) era 6 veces mayor en el grupo BALB/c. Asimismo, los IMMs recolectados de ratones BALB/c mostraron una mayor expresión de los marcadores de superficie CD69 (Cluster of Differentiation 69), BST-2 (Bone marrow STromal antigen 2), CD80 y CD86, los cuales están asociados a una mayor activación (Figura 48) (Channappanavar *et al.*, 2016)

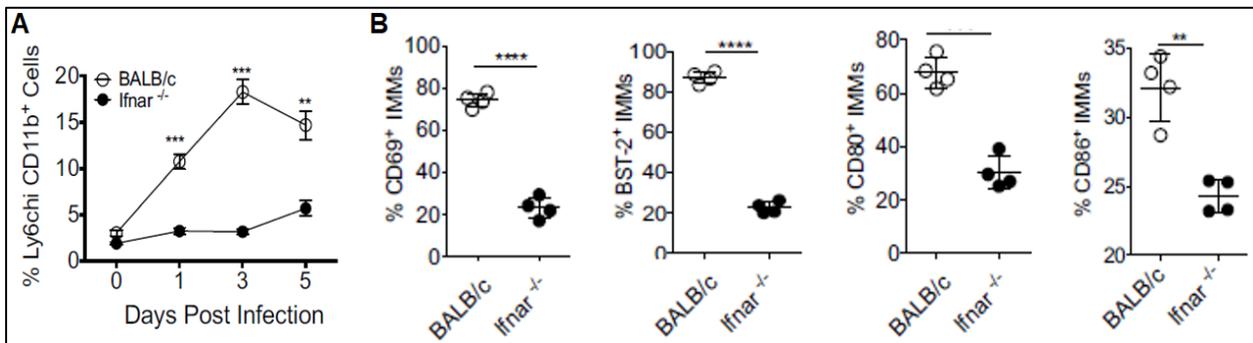


Figura 48. Los ratones WT BALB/c presentan un mayor porcentaje de células IMM activadas. (A) Porcentaje de IMMs en ratones WT BALB/c e *Ifnar*^{-/-}. (B) Porcentaje de IMMs positivos para los marcadores de superficie CD69, BST-2, CD80 y CD86 (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). Tomado de: Channappanavar *et al.* (2016).

De igual forma, se demostró que los IMMs son los mayores productores tanto de CCL2 (quimiocina que refuerza el reclutamiento de IMMs al sitio de infección), así como de las citocinas proinflamatorias TNF, IL-6 e IL-1 β . Además, se observó que el porcentaje de IMMs productores de CCL2 y citocinas proinflamatorias es mayor en ratones BALB/c comparados con los recolectados del grupo *Ifnar*^{-/-} (Figura 49) (Channappanavar *et al.*, 2016).

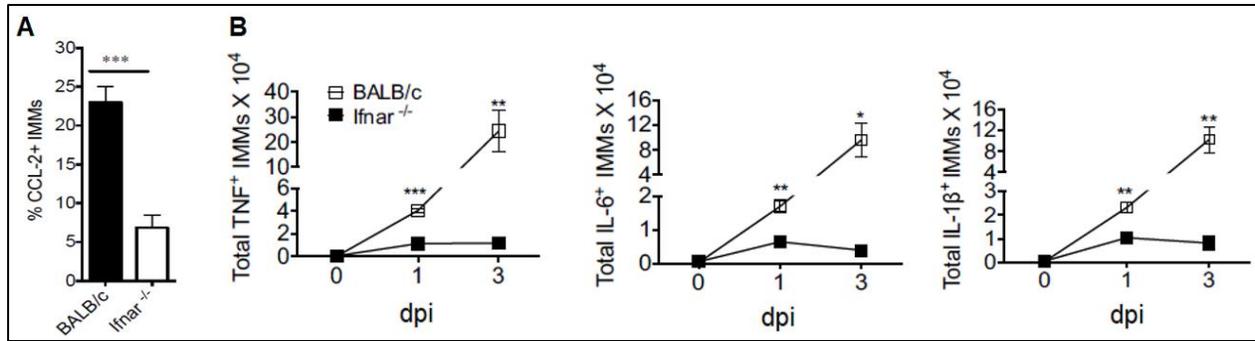


Figura 49. La cantidad de células IMM productoras de CCL2, TNF, IL-6 e IL-1 β es mayor en ratones WT BALB/c. (A) Porcentaje de IMMs CCL2⁺ en ratones WT BALB/c e *Ifnar*^{-/-}. (B) Porcentaje de IMMs positivos para las citocinas TNF, IL-6 e IL-1 β (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Tomado de: Channappanavar et al. (2016).

Para confirmar el papel inmunopatológico de los IMMs en ratones BALB/c, se utilizaron los anticuerpos monoclonales MC21 y α -BST-2 para bloquear CCR2 (C-C chemokine Receptor type 2) y BST-2, respectivamente, y con ello reducir el número de IMMs. El tratamiento con los anticuerpos protegió a los ratones BALB/c de una enfermedad letal (Figura 50), además de reducir el edema alveolar y el desprendimiento de células epiteliales bronquiales (Channappanavar et al., 2016).

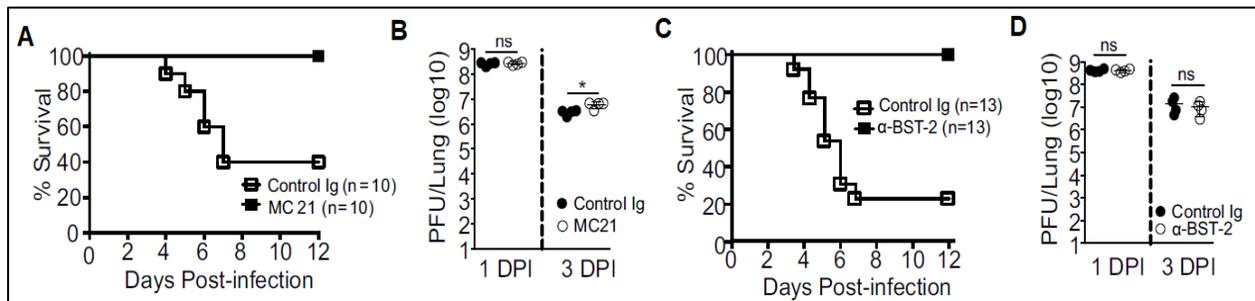


Figura 50. El uso de anticuerpos para el bloqueo de CCR2 y BST-2 protege de una infección letal al 100% de ratones BALB/c tratados. (A, C) Porcentaje de supervivencia de ratones BALB/c con y sin tratamiento de anticuerpo MC21 y α -BST-2, respectivamente. (B, D) Carga viral en pulmones de ratones BALB/c con y sin tratamiento de anticuerpo MC21 y α -BST-2, respectivamente (* $p < 0.05$). Tomado de: Channappanavar et al. (2016).

Cabe destacar que la disminución en el número de IMMs modificó muy poco los títulos virales (Figura 50 B, D), lo cual es indicativo de que los IMMs son reclutados durante un periodo en el que su actividad no ayuda a controlar significativamente la propagación viral, y por el contrario sí contribuye a la inflamación y daño del tejido pulmonar.

Finalmente, se estudió la cantidad de células T en ratones BALB/c, *Ifnar*^{-/-} y un grupo de BALB/c tratado con MC21. El número total de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ específicos de SARS-CoV fue considerablemente menor en el grupo BALB/c comparado con los ratones *Ifnar*^{-/-} y los tratados con MC21. Debido a que se ha reportado que IFN-I sensibiliza a los linfocitos T para efectuar apoptosis, se midió el porcentaje de células T expresando anexina V (molécula empleada para detectar células apoptóticas) en BALB/c e *Ifnar*^{-/-}, encontrándose un aumento del 15% en la población apoptótica de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en los ratones WT. Este fenómeno se asoció a TNF, ya que su neutralización disminuyó la cantidad de linfocitos T en apoptosis (Channappanavar *et al.*, 2016).

En conclusión, los resultados obtenidos por Channappanavar *et al.* (2016) demostraron que la producción temprana de IFN-I durante la infección por SARS-CoV conduce a una mejor supervivencia, mientras que el retraso de su señalización promueve la acumulación de IMMs altamente activados, mismos que amplifican dicho evento mediante la síntesis de CCL2, además de producir citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β y TNF, estando esta última relacionada con la apoptosis de linfocitos T específicos de SARS-CoV. Asimismo, se ha propuesto que la disminución de células T puede contribuir a la inmunopatología causante del síndrome de distrés respiratorio agudo, pues en condiciones óptimas fungen como supresores de la respuesta inmune innata, de modo que su reducción puede provocar la desregulación de dicha respuesta e influir en la producción prolongada de mediadores proinflamatorios (Figura 51).

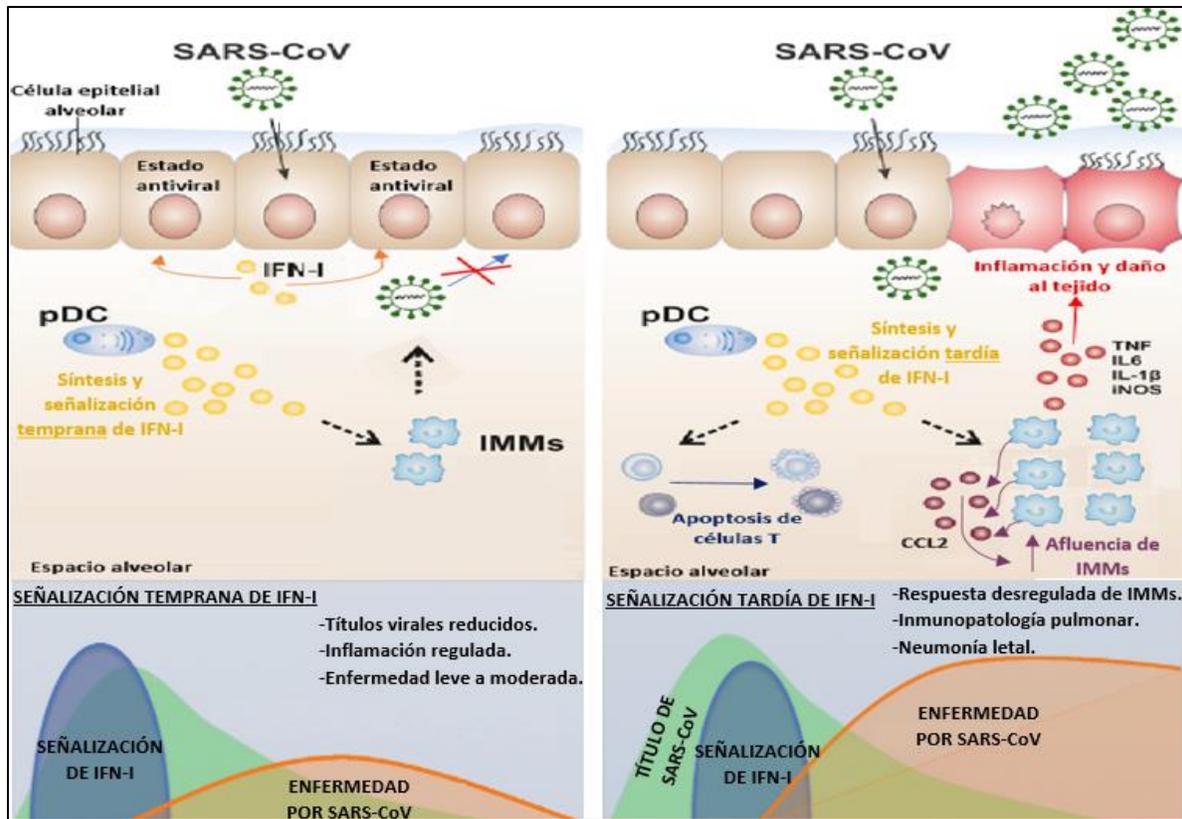


Figura 51. Efectos de la síntesis y señalización temprana y tardía de IFN-I. Modificado de: Channappanavar et al. (2016) y Kindler & Thiel. (2016).

En lo que respecta a MERS-CoV, un estudio analizó el efecto de la administración temprana y tardía de IFN-β recombinante en ratones BALB/c infectados con una cepa adaptada de MERS-CoV. En este modelo, el máximo de la carga viral se observó a los 2 días pi. Tras infectar un grupo de ratones con una dosis letal de 750 PFU, se administró IFN-β recombinante a las 6 h pi. Los resultados mostraron que todos los ratones del grupo control tratado con PBS (Phosphate-Buffered Saline) sucumbieron a la infección, mientras que el 100% de los ratones tratados con IFN-β recombinante fueron protegidos de una infección letal (Channappanavar et al., 2019).

Por otro lado, dos grupos de ratones BALB/c fueron administrados con una dosis subletal de 250 PFU, posteriormente, un grupo recibió tratamiento de IFN-β recombinante a los 2 días pi mientras que el otro grupo fue tratado a los 4 días pi. Los ratones que recibieron tratamiento mostraron una menor supervivencia en comparación con los del grupo control (Figura 52). Aunado a estos resultados, en el grupo con tratamiento a los 2 días pi se registró un aumento en la cantidad de IMMs infiltrantes, lo

cuales, con base en la expresión de CD80 estaban más activados en comparación con los obtenidos del grupo control (Figura 52) (Channappanavar *et al.*, 2019).

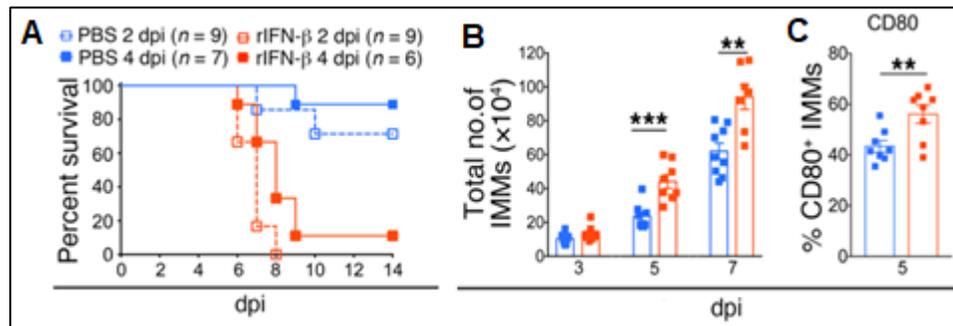


Figura 52. La administración tardía de IFN-β recombinante no protege de una infección subletal y provoca un aumento en la cantidad de IMMs activados. (A) Porcentaje de supervivencia de ratones BALB/c con y sin tratamiento de IFN-β recombinante a 2 y 4 dpi. (B, C). Cantidad de total de IMMs y porcentaje de IMMs activados, respectivamente, en ratones BALB/c con y sin tratamiento de IFN-β recombinante a 4 dpi (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Tomado de: Channappanavar *et al.* (2019).

Finalmente, se emplearon anticuerpos anti-CCR2 para reducir el número de IMMs y evaluar su rol inmunopatológico en los grupos con tratamiento de IFN-β recombinante a los 2 y 4 días pi. Los resultados obtenidos de los grupos con anti-CCR2 fueron combinados, al igual que los datos registrados con los grupos control. La información resultante mostró que cerca del 60% de los ratones del grupo con anti-CCR2 sobrevivió a la infección mientras que el 100% de los ratones con anticuerpo control sucumbieron a la infección al día 10 pi (Figura 53) (Channappanavar *et al.*, 2019).

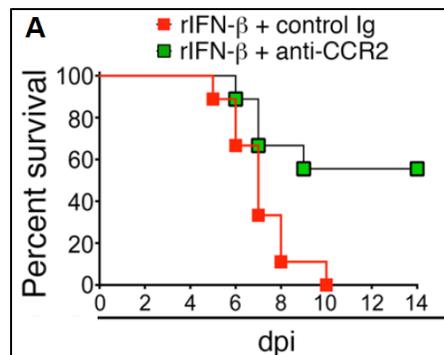


Figura 53. El uso de anticuerpos para el bloqueo de CCR2 protege de una infección letal al 60% de ratones BALB/c tratados. (A) Porcentaje de supervivencia de ratones BALB/c con y sin tratamiento de anticuerpo anti-CCR2. Tomado de: Channappanavar *et al.* (2019).

Los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas con los modelos de infección de SARS-CoV y MERS-CoV en ratones BALB/c demuestran que el tiempo al cual se da la señalización de IFN-I con relación al desarrollo de la carga viral, repercute directamente en el resultado y gravedad de las enfermedades causadas por tales coronavirus, siendo útil al hospedero cuando la señalización es temprana, y contraproducente cuando es tardía.

De igual forma, diversos estudios efectuados en pacientes infectados con SARS-CoV revelaron que las muestras analizadas contenían una elevada carga viral inicial, acumulación de neutrófilos, monocitos y macrófagos en pulmón, y niveles plasmáticos altos de IL-1, IL-6, IL-8, CXCL10 y CCL2 (Nicholls *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2004).

Similarmente, en la infección por MERS-CoV, los pacientes en estado grave mostraron niveles plasmáticos elevados de IL-6, CCL2 y CXCL10 (Kim *et al.*, 2016). Asimismo, su perfil inmunológico se caracterizó por presentar linfopenia y un aumento considerable de neutrófilos y monocitos en sangre periférica (Min *et al.*, 2016).

En lo que respecta a SARS-CoV-2, la identificación de diversas proteínas que interfieren en la síntesis y señalización de IFN-I sugiere que este coronavirus es capaz de suprimir la respuesta antiviral del hospedero, lo cual podría tener consecuencias clínicas similares a las reportadas para la infección por SARS-CoV y MERS-CoV.

Por tal motivo, varios grupos de investigación se han enfocado en el estudio de IFN-I y el estatus de la respuesta inmune en pacientes con COVID-19, cuyos trabajos tienen como objetivo común el determinar si la infección por SARS-CoV-2 implica la desregulación de IFN-I, y en dado caso, cómo contribuye tanto a la fisiopatología de la COVID-19 como en el curso de la enfermedad.

El grupo de Hadjadj *et al.* (2020) realizó un análisis inmunológico integrativo con 50 pacientes de COVID-19. Los pacientes fueron recibidos, en promedio, 10 días después del inicio de los síntomas y se agruparon según su estado de gravedad: leve-moderado (n=15), severo (n=17) y crítico (n=18). En cuanto a los controles, se utilizaron muestras provenientes de 18 voluntarios sanos.

Para comenzar la caracterización de la respuesta inmune en cada grupo de pacientes, se obtuvieron muestras de sangre periférica y se analizaron por citometría de masas. En esta técnica, las células son incubadas con anticuerpos dirigidos hacia un marcador de interés, por ejemplo, un receptor de membrana. Los anticuerpos empleados están conjugados a sondas que coordinan isotopos de metales pesados, los cuales generan iones reporteros que posteriormente son detectados y asociados a la expresión del marcador estudiado. El análisis de la expresión diferencial de marcadores permite determinar las diversas poblaciones celulares en la muestra, así como su proporción en la misma (Spitzer & Nolan, 2016).

Los primeros marcadores analizados correspondieron a diversas poblaciones de linfocitos, encontrándose que los pacientes en estado severo y crítico presentan linfopenia (cantidad anormalmente baja de linfocitos), ambos grupos con valores promedio de 750 linfocitos/mm³. Por el contrario, los pacientes en estado leve-moderado alcanzaron el límite normal bajo de linfocitos (1500 linfocitos/mm³) (Figura 54A). Como se puede apreciar en los mapas viSNE (visualization of t-distributed Stochastic Neighbor Embedding) (Figura 54B, C), el grupo crítico presenta una menor densidad en la población de células NK y linfocitos T CD8+, siendo esta última una subpoblación igualmente disminuida en el grupo severo. Por otro lado, una característica que comparten todos los grupos es el aumento en la densidad de monocitos, misma que se acentúa con la gravedad de los pacientes (Hadjadj *et al.*, 2020).

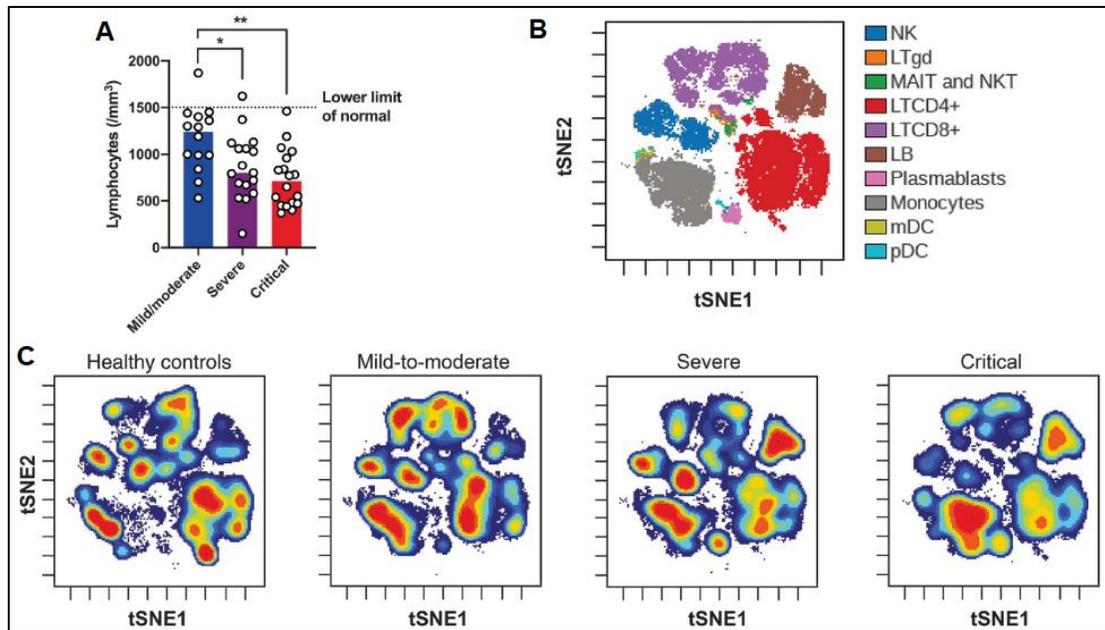


Figura 54. Perfil de linfocitos en pacientes con COVID-19 moderada, severa y crítica, determinada por citometría de masas. (A) Cantidad de linfocitos/ mm^3 en pacientes con COVID-19 en diferentes estados de gravedad (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (B) Mapa viSNE general con las diferentes subpoblaciones identificadas en muestras de sangre periférica. (C) Mapas viSNE en distintos grupos: control y pacientes con COVID-19 en diferentes estados de gravedad. Los colores rojo, anaranjado y amarillo representan una mayor densidad celular mientras que las tonalidades azules y verdes indican lo contrario. Tomado de: Hadjadj et al. (2020).

Otra diferencia que encontraron fue que, en el grupo de pacientes en estado crítico, el porcentaje de linfocitos T CD4+ apoptóticos es aproximadamente el doble respecto al control, mientras que los porcentajes en los linfocitos T CD8+ se mantienen en niveles equiparables, sin embargo, hay pacientes en estado crítico ($n=8$) que alcanzan niveles entre 20% y 25% de células apoptóticas, es decir, más del 10% en comparación con la población control (Hadjadj et al., 2020).

En lo que concierne al estudio de IFN-I y su señalización, se evaluaron los niveles de los transcritos de seis ISGs (*IFI44L*, *IFI27*, *RSAD2*, *SIGLEC1*, *IFIT1* e *IS15*) sobreexpresados por células mononucleares de sangre periférica durante infecciones virales. La expresión promedio de los ISGs se conjuntó y asoció a un valor denominado puntaje ISG, el cual refleja el grado de señalización de IFN-I. El puntaje ISG del grupo leve-moderado fue el mayor con un valor de ~ 80 , seguido del grupo severo con 40. Respecto al grupo en estado crítico, su puntaje ISG mostró que en dichos pacientes la

señalización mediada por IFN-I y la producción de ISGs es muy pobre, pues alcanzaron un valor de ~ 10 (Figura 55A) (Hadjadj *et al.*, 2020).

Los resultados de los ensayos ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) para la determinación de los niveles plasmáticos de IFN- $\alpha 2$ en cada grupo fueron consistentes con los puntajes ISG. Los pacientes del grupo de severidad leve-moderada presentaron en promedio niveles de $\sim 5 \times 10^3$ fg/mL, los cuales fueron 5 y 10 veces mayores respecto a los niveles de los grupos severo y crítico, respectivamente (Figura 55B) (Hadjadj *et al.*, 2020).

Para algunos pacientes de cada grupo fue posible obtener muestras a diferentes tiempos, por lo que se estudió la variación de los niveles de IFN- $\alpha 2$ plasmático. Las determinaciones mostraron que los pacientes del grupo leve-moderado presentan una producción elevada ($\sim 5 \times 10^3$ fg/mL) y constante durante el periodo analizado, los del grupo severo comienzan con altos niveles ($\sim 2 \times 10^3$ fg/mL) y conforme pasan los días disminuyen hasta 25 veces ($\sim 8 \times 10$ fg/mL). En el caso de los pacientes en estado crítico, su producción es baja con niveles iniciales de 7×10^2 fg/mL y finales de 8×10 fg/mL (Figura 55C) (Hadjadj *et al.*, 2020).

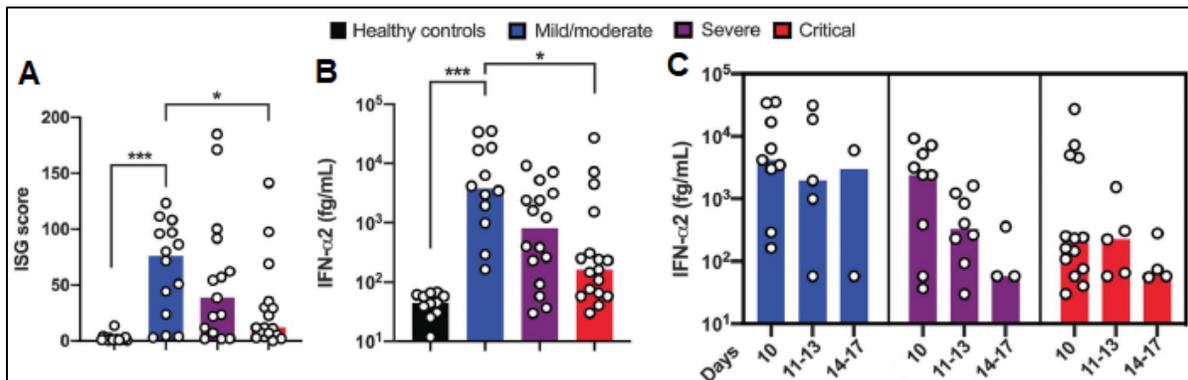


Figura 55. Puntaje ISG y niveles plasmáticos de IFN- $\alpha 2$ en pacientes con COVID-19 moderada, severa y crítica. Los pacientes con COVID-19 presentan diferentes puntajes ISG y perfiles de producción de IFN- $\alpha 2$ según su grado de severidad. (A) Puntajes ISG de los distintos grupos de pacientes con COVID-19 (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$). (B), (C) Niveles plasmáticos de IFN- $\alpha 2$ al día 10 y en el periodo de 10-17 días, respectivamente. Tomado de: Hadjadj *et al.* (2020).

De acuerdo con diversos autores, los casos más graves de COVID-19 suelen involucrar hipercitocinemia (Pedersen & Ho, 2020), por lo cual se determinaron los niveles plasmáticos de las citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- α e IL-1 β (Figura 56). De

las citocinas evaluadas, IL-6 fue la que mostró mayor variación entre cada uno de los grupos, alcanzando valores de hasta ~900 pg/mL en los pacientes en estado crítico, mientras que los pacientes en los grupos leve-moderado y severo tuvieron niveles de ~50 y 400 pg/mL, respectivamente. Esta información concuerda con los reportes de Chen *et al.* (2020), quienes identificaron a IL-6 como una de las citocinas responsables de la respuesta inmune exacerbada en pacientes graves de COVID-19 (Hadjadj *et al.*, 2020).

Por otro lado, pese a que los niveles de TNF- α fueron más uniformes entre los grupos, se detectaron pacientes en estado severo y crítico que produjeron hasta tres o cuatro veces más TNF- α en comparación con el nivel promedio (~2.7 pg/mL) del grupo leve-moderado. Respecto a IL-1 β los valores estuvieron por debajo del límite de detección prácticamente en todos los pacientes de cada grupo, lo cual se atribuye a que posiblemente se encuentre en su forma inactiva (Hadjadj *et al.*, 2020).

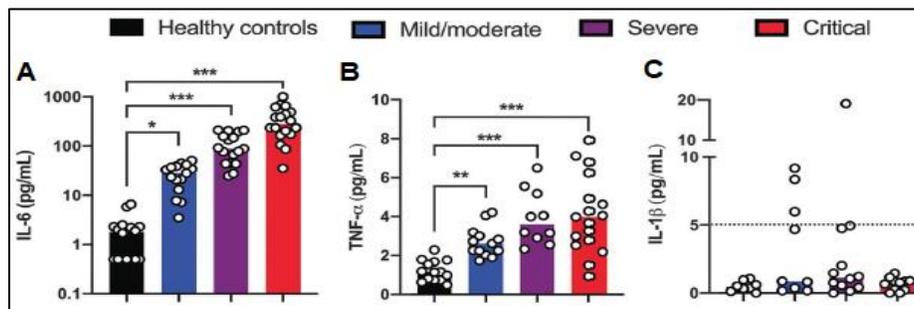


Figura 56. Niveles plasmáticos de IL-6, TNF- α e IL-1 β en pacientes con COVID-19 moderado, severo y crítico. (A) IL-6, (B) TNF- α (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001), (C) IL-1 β La línea punteada indica el límite de detección. Tomado de: Hadjadj *et al.* (2020).

Asimismo, debido a que la respuesta inflamatoria exacerbada en infecciones por coronavirus se ha asociado a un mayor flujo de monocitos (Channappanavar *et al.*, 2016), se estudiaron los niveles de CCL2 (ISG con actividad quimioatrayente de monocitos) en sangre periférica. Los resultados mostraron que, en todos los pacientes infectados, los niveles de CCL2 fueron mayores comparados con el grupo control, observándose además que los pacientes del grupo severo y crítico tuvieron niveles aproximadamente 4 veces mayores a los de los pacientes en estado leve-moderado. Este aumento en CCL2 se relaciona de manera positiva con la mayor densidad de

monocitos identificada en pacientes de los grupos severo y crítico (Figura 57) (Hadjadj *et al.*, 2020).

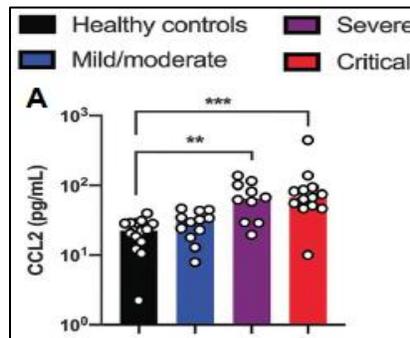


Figura 57. En pacientes con COVID-19 los niveles plasmáticos de CCL2 se encuentran elevados. (A) Niveles plasmáticos de CCL2 en pacientes con COVID-19 en distinto estado de gravedad (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Tomado de: Hadjadj *et al.* (2020).

Como conclusión de esta investigación, Hadjadj *et al.* (2020) establecieron que los pacientes con COVID-19 en estado severo y crítico presentan una baja producción de IFN-I, particularmente de IFN- $\alpha 2$. Asimismo, en dichos grupos se identificó la sobreproducción de las citocinas IL-6, TNF- α y CCL2. Se ha propuesto que la síntesis reducida de IFN-I, aunada al aumento de citocinas proinflamatorias, promueve la desregulación de la respuesta inmune, teniendo como evidencia el desarrollo de linfopenia y la acumulación de monocitos en pacientes en estado severo y crítico.

En otro estudio, con un número limitado de pacientes Wei *et al.* (2020) evaluaron poblaciones de linfocitos y los perfiles de expresión de genes de proteínas involucradas en las vías de detección de RNA viral y la síntesis de IFN-I. Los análisis se efectuaron durante tres diferentes etapas respecto a la estancia de los pacientes en la unidad de cuidados intensivos o ICU (Intensive Care Unit): Pre-ICU, ICU y Post-ICU en muestras de sangre periférica de cuatro pacientes con COVID-19 en estado crítico, a quienes se les denominó según su sexo y edad: FY (mujer joven, 32 años), FE (mujer mayor, 63 años), MY (Hombre joven, 38 años) y ME (Hombre mayor, 67 años).

Concordando con los hallazgos de Hadjadj *et al.* (2020), Wei *et al.* (2020) reportaron que durante la estancia en ICU los pacientes presentan un aumento en la densidad de monocitos, además de ser la única etapa durante la cual se detectó la población de pDCs (principales productores de IFN- α). Por el contrario, en esta etapa

se registró linfopenia, pues la densidad de células B y T fue considerablemente menor en comparación con Pre-ICU y Post-ICU.

Mediante la tecnología scRNA-seq (single-cell RNA sequencing) se analizaron los perfiles de expresión de los genes codificantes para los sensores RLRs y TLRs, así como los factores de transcripción IRF3 e IRF7. Los niveles de transcritos mostraron que dichos genes se sobreexpresan principalmente durante la etapa ICU. Por el contrario, los genes del receptor TLR3 y la proteína adaptadora MAVS no se inducen en ninguna etapa (Figura 58) (Wei *et al.*, 2020).

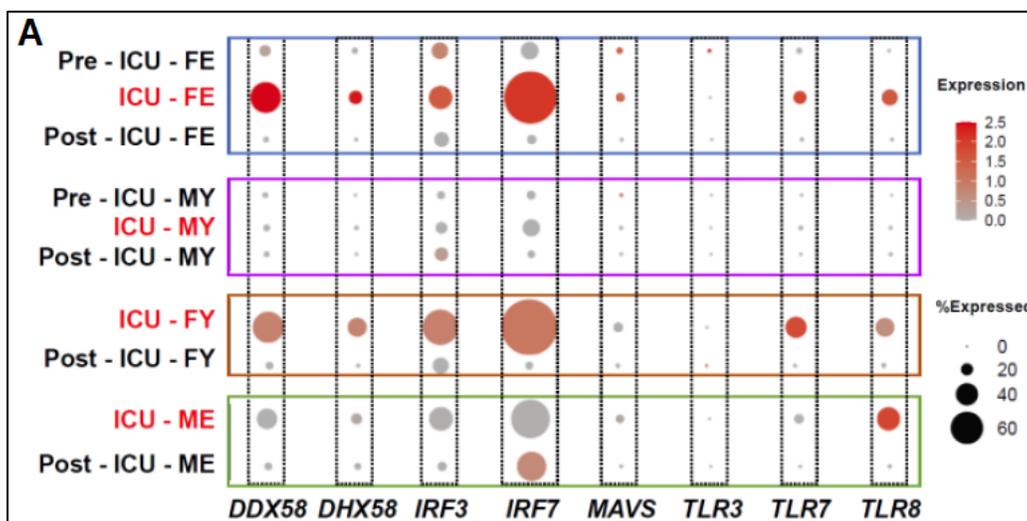


Figura 58. Niveles de expresión de genes codificantes para proteínas involucradas en las vías de síntesis de IFN-I durante las etapas Pre-ICU, ICU y Post-ICU. DDX58, DHX58 codificantes de RIG-I y MDA5. (A) Los genes codificantes para las proteínas involucradas en las vías de síntesis de IFN-I se encuentran sobreexpresados en pacientes con COVID-19 durante su estancia en ICU. Tomado de: Wei *et al.* (2020).

Debido a la elevada expresión de los elementos involucrados en la síntesis de IFN-I, se analizaron los niveles de IFN- α en el suero de cada uno de los pacientes. Tres de los cuatro pacientes presentaron la máxima producción de IFN- α durante el periodo en que se encontraban en condiciones críticas, en promedio, al día 7 después del inicio de los síntomas. Únicamente en el suero de la paciente FY se observó un máximo nivel de IFN- α posterior al estado crítico, correspondiendo al día 18 después de la aparición de síntomas (Figura 59) (Wei *et al.*, 2020).

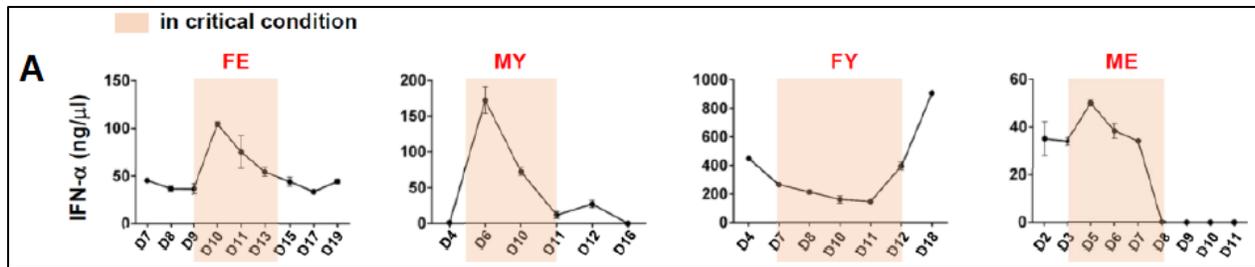


Figura 59. Niveles de IFN- α en el suero de pacientes con COVID-19 en estado crítico. (A) El máximo de la producción de IFN- α ocurre durante el periodo en el que los pacientes se encuentran en condiciones críticas. Tomado de: Wei *et al.* (2020).

Los datos obtenidos en esta investigación muestran que independientemente de la edad de los pacientes en estado grave, el periodo durante el cual se encuentran en ICU es en el que hay mayor activación de las vías para la producción de IFN-I. Por otro lado, el análisis de los niveles de IFN- α en suero mostró que los pacientes jóvenes alcanzan valores máximos más elevados respecto a los pacientes de mayor edad, aunque en ambos casos es probable que la producción de IFN- α esté retrasada, pues ocurre cuando la condición de los pacientes ya es crítica (Wei *et al.*, 2020).

El grupo de Trouillet-Assant *et al.* (2020) desarrolló un estudio en 26 pacientes con COVID-19 en estado crítico, todos ellos tratados en la ICU. El objetivo específico de esta investigación fue el análisis longitudinal (a distintos tiempos) de la producción de IFN-I y otros marcadores inflamatorios a partir del inicio de síntomas de COVID-19.

La primera determinación realizada con las muestras de sangre periférica correspondió a los niveles plasmáticos de IFN- α 2, con lo cual se clasificaron a los pacientes en dos grupos: IFN-positivo e IFN-negativo.

Conjuntando los valores de los pacientes del grupo IFN-positivo (21 pacientes) se construyó una cinética de la producción de IFN- α 2 (Figura 60A, curva negra). Para este grupo, el máximo nivel de IFN- α 2 (~1000 fg/mL) se alcanzó a los 8 días después del inicio de los síntomas y posteriormente, a partir del día 10, disminuyó de manera gradual permaneciendo en valores por debajo de 100 fg/mL (Trouillet-Assant *et al.*, 2020).

Por otro lado, los niveles plasmáticos de IFN- α 2 de los pacientes IFN-negativo (5 pacientes) fueron prácticamente nulos durante el periodo de estudio. Por este motivo, se les asignó un valor constante de IFN- α 2 de 1 fg/mL y no fue posible determinar su cinética de producción (Figura 60A) (Trouillet-Assant *et al.*, 2020).

También se determinaron los niveles plasmáticos de las citocinas proinflamatorias IL-6, CRP (C Reactive Protein) e IP-10 (IFN-gamma-induced Protein 10) (Figura 60B, C, D). A diferencia de los resultados obtenidos con IFN- α 2, no hubo diferencias significativas entre los valores obtenidos con los grupos de pacientes IFN-positivo e IFN-negativo. La síntesis de cada citocina comenzó desde los primeros días en que aparecieron los síntomas, y su producción, si bien con variaciones, en general se mantuvo elevada en ambos grupos de pacientes respecto a los niveles plasmáticos de los voluntarios sanos (Trouillet-Assant *et al.*, 2020).

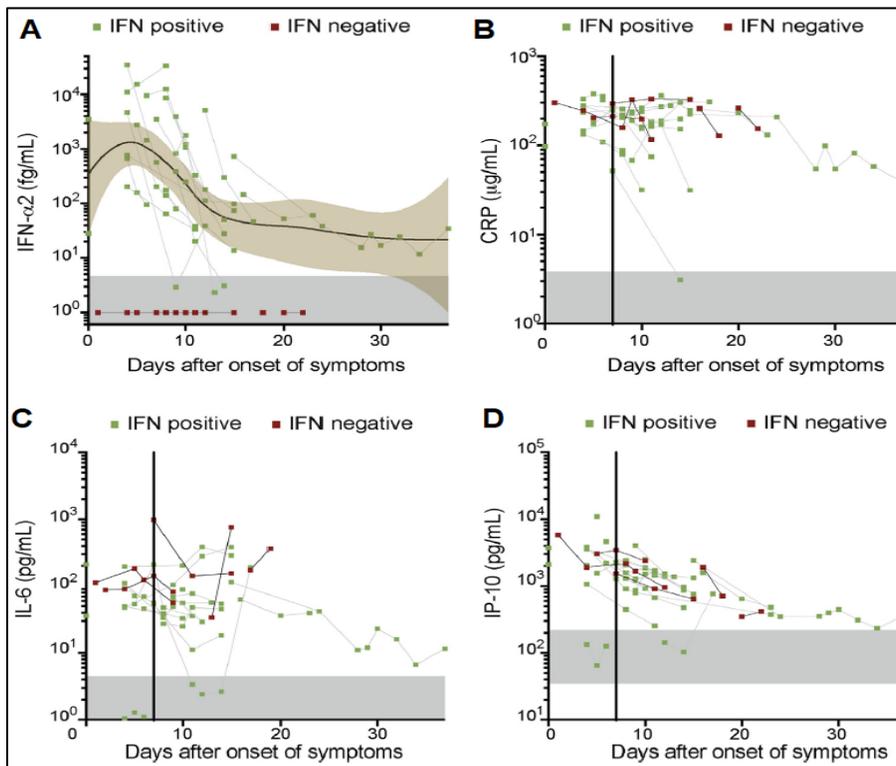


Figura 60. Niveles plasmáticos de (A) IFN- α 2, (B) CRP, (C) IL-6 e (D) IP-10 en pacientes con COVID-19 en estado crítico. *Los pacientes con COVID-19 en estado crítico muestran distintos perfiles de síntesis de IFN- α 2 y presentan producción elevada de CRP, IL-6 e IP-10. La barra horizontal de color gris representa los valores de referencia en voluntarios sanos. Tomado de: Trouillet-Assant et al. (2020).*

Estos datos se analizaron de forma conjunta con la información clínica de los pacientes, incluyendo la carga viral (Tabla 1). Se observa que los pacientes INF-positivo, tuvieron una carga viral menor (determinada por el valor Ct del método RT-qPCR) en comparación con los pacientes IFN-negativo. A pesar de que un menor número de pacientes productores de IFN- α 2 requirieron ventilación mecánica, los registros indican que el porcentaje de fallecidos fue similar en ambos casos, siendo del 40% para los del grupo IFN-negativo y 38% en el grupo IFN-positivo (Trouillet-Assant *et al.*, 2020).

Tabla 1. Características clínicas de pacientes con COVID-19 en estado crítico, grupos INF-negativo e INF-positivo. Tomado de: Trouillet-Assant *et al.* (2020).

Característica clínica.	IFN-negativo (n=5).	INF-positivo (n=21).
Edad promedio (años) (mín-máx).	81 (63-83)	74 (28-91)
Tiempo promedio (días) entre el inicio de síntomas y admisión a la unidad de cuidados intensivos (mín-máx).	7 (1-11)	7 (0-15)
Carga viral promedio (Ct) al momento del diagnóstico (mín-máx).	20.9 (18-28.2)	25.1 (16.1-38)
Pacientes con ventilación mecánica.	5 (100%)	9 (42%)
Pacientes fallecidos al día 28 después del inicio de síntomas.	2 (40%)	8 (38%)

Este reporte (Trouillet-Assant *et al.* 2020), reafirma que los pacientes con COVID-19 en estado crítico producen citocinas proinflamatorias en niveles elevados y constantes. Por otro lado, existe la posibilidad de que no sólo el grupo de pacientes INF-negativo presente desregulación en la síntesis de IFN- α 2, pues su producción no contribuyó significativamente a la mejora clínica de los pacientes IFN-positivo (quienes probablemente tuvieron una producción retrasada de IFN- α 2), lo cual se reflejó en la similitud de las tasas de mortalidad entre ambos grupos de pacientes en estado crítico.

A diferencia de las investigaciones anteriores en las que se analizaron muestras de sangre periférica, el grupo de Liao *et al.* (2020) estudiaron muestras BALF de

pacientes con COVID-19 en estado moderado (n=3) y severo (n=6), así como de voluntarios sanos (n=4). Las muestras BALF, al ser obtenidas directamente del sitio de infección, permiten obtener información sobre el microambiente de los bronquiolos y alveolos y, por ende, acerca de las variaciones en los niveles de citocinas y de la respuesta inmune que ocurre *in situ*.

Con la finalidad de analizar con mayor detalle las distintas subpoblaciones de células presentes en las muestras BALF, se empleó la técnica scRNA-seq, pues con ella es posible diferenciar y agrupar cada célula según la expresión diferencial de genes. El primer análisis general mostró que los pacientes en estado severo presentan un mayor enriquecimiento de macrófagos y neutrófilos (aumento del 15.03% y 4.56%, respectivamente) en comparación con los pacientes del grupo moderado. Por el contrario, las células mDC y pDC, así como los linfocitos T y NK se encuentran en porcentajes dos o tres veces más elevados respecto a los valores de los pacientes en estado severo (Liao *et al.*, 2020).

Debido a que la población de macrófagos fue la más enriquecida en pacientes en estado severo, se hizo una reclasificación basada en la expresión de diversos genes. Bajo este nuevo enfoque se identificaron cuatro grupos de macrófagos (Figura 61). En pacientes en estado severo, el grupo 4 presentó menor densidad, mientras que los grupos 1, 2 y 3 se enriquecieron respecto a lo obtenido en pacientes de condición moderada y voluntarios sanos. En los grupos 1 y 2 se encontró una mayor expresión de los genes codificantes para los factores de transcripción NF- κ B, STAT1, STAT2 e IRFs, y quimiocinas CCL2, CCL3 y CXCL10. Por otro lado, los macrófagos del grupo 3 sobreexpresaron genes promotores de fibrosis tales como *TREM2*, *TGFB1* y *SPP1*. Estos resultados, proporcionan evidencia de que en pacientes en estado severo predomina la presencia de macrófagos proinflamatorios (grupos 1 y 2) y profibróticos (grupo 3) (Liao *et al.*, 2020).

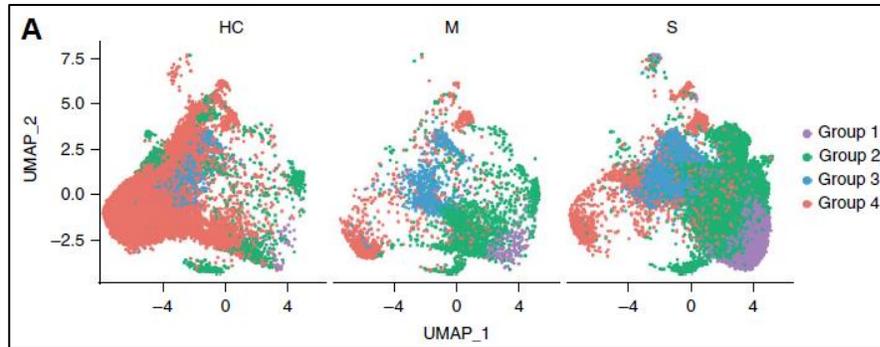


Figura 61. (A) Densidad celular de distintos grupos de macrófagos (según su expresión diferencial de genes) en voluntarios sanos (HC) y pacientes con COVID-19 en estado moderado (M) y severo (S). Los pacientes con COVID-19 en estado severo muestran enriquecimiento de macrófagos proinflamatorios. Tomado de: Liao et al. (2020).

Asimismo, se hicieron mediciones de los niveles de IL-6, IL-8 e IL-1 β producidas por macrófagos en las muestras BALF. Los pacientes en estado severo mostraron niveles elevados de tales citocinas proinflamatorias. Para el caso de los pacientes en estado severo S2 y S6 fue posible obtener muestras a diferentes tiempos. En ambos casos, estos pacientes mostraron una disminución en la producción de IL-6, IL-8 e IL-1 β en los últimos registros y se reportó que clínicamente tuvieron una mejora en su estado de salud (Figura 62) (Liao et al., 2020).

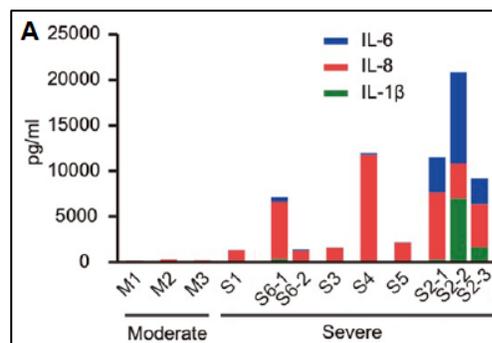


Figura 62. (A) Niveles de citocinas IL-6, IL-8 e IL-1 β en pacientes con COVID-19 en estado moderado y severo. Los pacientes con COVID-19 en estado severo presentan mayor producción de citocinas proinflamatorias IL-6, IL-8 e IL-1 β . Los pacientes S2 y S6, tuvieron determinaciones a distintos tiempos, mostrándose con un guion y un número que indica si es la primera (1), segunda (2) o tercera (3) muestra. Tomado de: Liao et al. (2020).

De igual forma, después de analizar los niveles de transcritos de CCL2, CCL3, CCL4, CCL7 y CCL8 se observó que los macrófagos de pacientes en estado severo sintetizan una gran cantidad de quimiocinas requeridas para promover la migración de monocitos al sitio de infección. Por el contrario, los pacientes en estado moderado

tuvieron una expresión considerablemente reducida de quimiocinas (Figura 63) (Liao *et al.*, 2020).

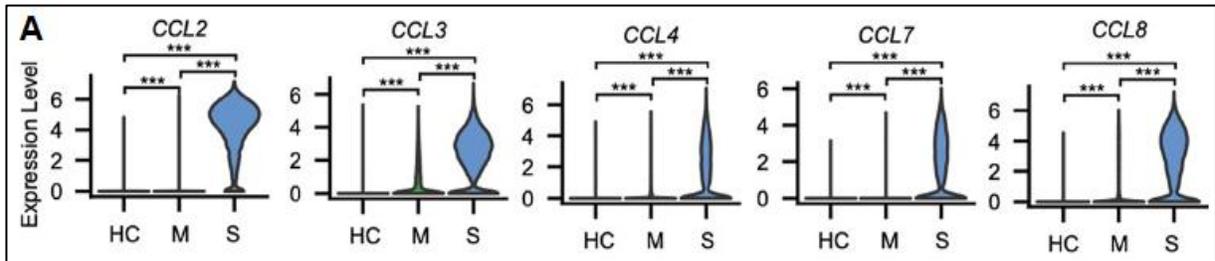


Figura 63. (A) Niveles de quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4, CCL7 y CCL8 en pacientes con COVID-19 en estado moderado (M) y severo (S). Los pacientes con COVID-19 en estado severo presentan mayor producción de quimiocinas reclutadoras de monocitos (** $p < 0.001$). Tomado de: Liao *et al.* (2020).

La información recopilada en esta investigación demuestra que el microambiente bronco-alveolar de los pacientes en estado severo se caracteriza por la disminución de pDC (principales productoras de IFN- α) y linfocitos T y NK. Por otro lado, se identificó que hay sobreproducción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, las cuales promueven la llegada de monocitos y macrófagos proinflamatorios al sitio de infección. Es muy probable que debido a que esta condición se presenta de manera sostenida, haya inducción de daño tisular, y por tanto los pacientes con este perfil celular y molecular presentan un peor pronóstico frente a la infección por SARS-CoV-2 (Liao *et al.*, 2020).

Otros estudios desarrollados bajo condiciones similares han reportado resultados consistentes con los hallazgos de Liao *et al.* (2020). En la investigación realizada por Zhou *et al.* (2020) igualmente se obtuvieron muestras BALF, las cuales provenían de ocho pacientes con COVID-19. El análisis de las muestras se efectuó con diversos métodos de metatranscriptómica, a través de los cuales se demostró que los principales ISGs expresados durante la infección por SARS-CoV-2 corresponden a quimiocinas como CXCL17, CXCL8, CCL2 y CCL7 cuya función es el reclutamiento de neutrófilos, monocitos y macrófagos proinflamatorios. De igual forma, se observó que los transcritos de dichos genes se encontraban en niveles mayores en los pacientes con mayor carga viral, sugiriendo que un título viral más elevado provoca una respuesta proinflamatoria más robusta.

3 DISCUSIÓN.

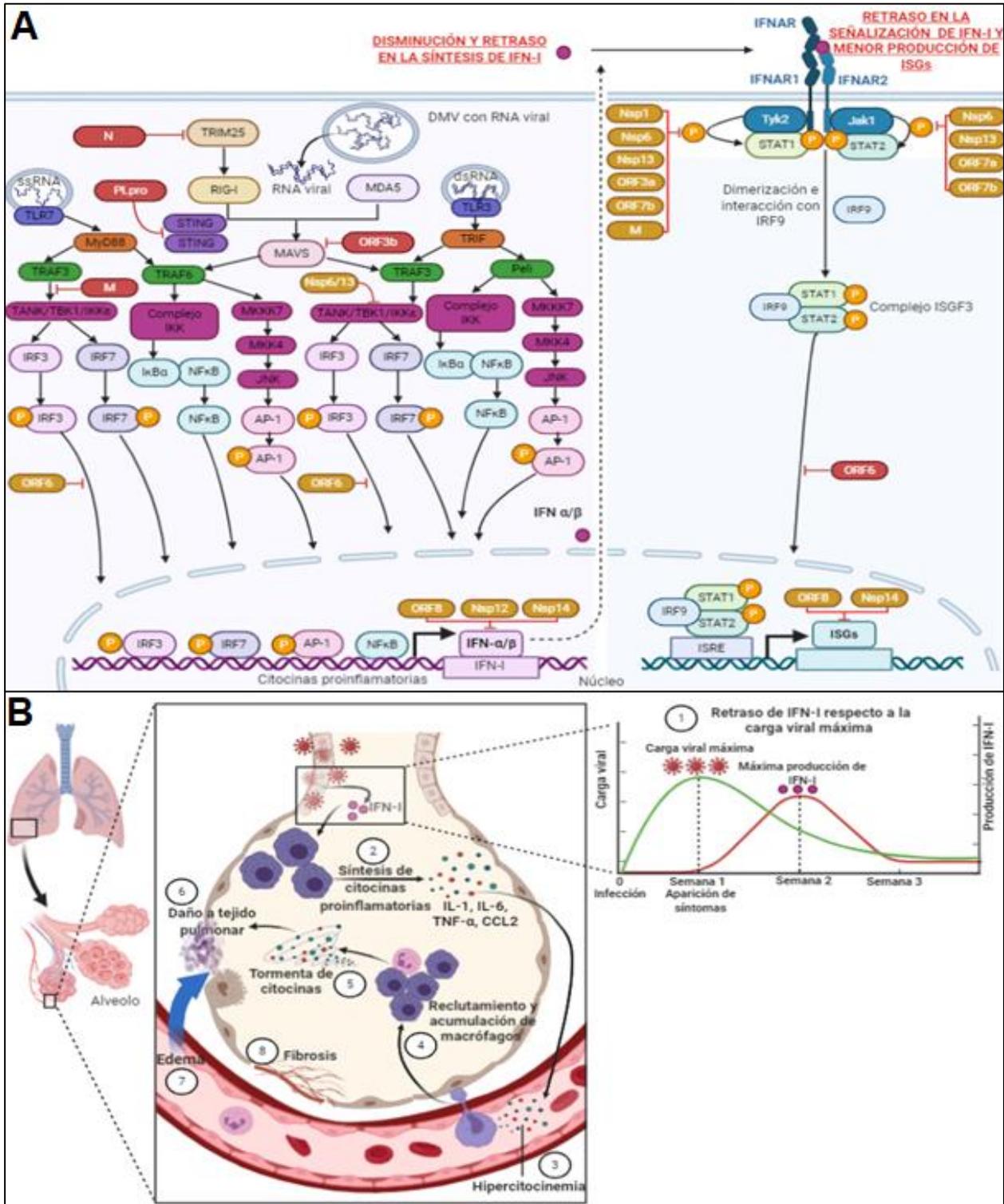


Figura 64. Resumen gráfico del contenido. (A) Actividad antagonista de IFN-I de proteínas de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2. Las proteínas conservadas se muestran en rojo, y en ocre las que únicamente tienen actividad en SARS-CoV-2. (B) Consecuencias de la desregulación de IFN-I en la COVID-19.

3.1 Conservación entre las proteínas antagonistas de IFN-I de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2.

Los tres coronavirus revisados en este trabajo, SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2, pertenecen al género *Betacoronavirus*, pero SARS-CoV y SARS-CoV-2 son clasificados en el linaje B, mientras que MERS-CoV forma parte del linaje C. Genéticamente, SARS-CoV-2 comparte 50% y 82% de identidad respecto al genoma de MERS-CoV y SARS-CoV, respectivamente (Rabaan *et al.*, 2020; Chan *et al.*, 2020). En el caso de MERS-CoV, la identidad genética se encuentra principalmente en las secuencias codificantes de las proteínas estructurales y no estructurales, las cuales igualmente comparte con SARS-CoV, además de algunas proteínas accesorias.

Entre las proteínas que comparten SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2, se encuentran factores que, debido a su función durante el ciclo de replicación, aumentan la eficiencia del proceso replicativo y evitan el reconocimiento de estos virus por parte de las células infectadas. Algunas de las proteínas que brindan tal protección son nsp1, la cual promueve la degradación de mRNAs del hospedero (entre ellos transcritos de IFN-I e ISGs), nsp12-16 que añaden la modificación cap al extremo 5' de los RNAs virales para que no sean degradados por exonucleasas o reconocidos por RLRs, y nsp3 y nsp4 que generan DMVs en donde las proteínas virales escapan de la degradación en el proteosoma y con ello, a su presentación en moléculas del MHC-I.

Tabla 2. Proteínas de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 y sus posibles mecanismos como antagonistas de IFN-I.

Proteína Viral	Probable mecanismo de inhibición.	Coronavirus en los que posee actividad antagonista de IFN-I.	Referencia.
N	Unión al dominio SPRY de TRIM25, para bloquear la ubiquitinación y activación de RIG-I.	SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2.	Hu <i>et al.</i> (2017). Li <i>et al.</i> (2020). Lei <i>et al.</i> (2020).

M	Bloqueo del complejo TRAF3/TANK/TBK1/IKKε para inhibir la activación de IRF3/7. M de MERS-CoV y SARS-CoV-2 también bloquean la activación de promotores con elementos ISRE.	SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2.	Siu <i>et al.</i> (2009). Yang <i>et al.</i> (2013). Lei <i>et al.</i> (2020). Xia <i>et al.</i> (2020).
Nsp3 (PLpro)	Mediante su actividad DUB desubiquitina a STING y probablemente también a IRF3 para inactivarlos. En SARS-CoV-2, el dominio PLpro de la cepa Wuhan-WIV04 carece de actividad DUB y función antagonista de IFN-I.	SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2.	Sun <i>et al.</i> (2009). Matthews <i>et al.</i> (2014). Bailey-Elkin <i>et al.</i> (2014). Lei <i>et al.</i> (2020). Yuen <i>et al.</i> (2020)
ORF3b	Inhibe la activación de IRF3 a través del bloqueo de MAVS. Es probable que ORF3b de SARS-CoV-2 emplee otro mecanismo debido a su ubicación exclusiva en citoplasma.	SARS-CoV y SARS-CoV-2.	Freundt <i>et al.</i> (2009). Konno <i>et al.</i> (2020).
ORF6	Secuestro de KPNA2 y KPNB1 para impedir la translocación nuclear de STAT1. En SARS-CoV-2 también bloquea la translocación nuclear de IRF3	SARS-CoV y SARS-CoV-2.	Frieman <i>et al.</i> (2007). Lei <i>et al.</i> (2020). Xia <i>et al.</i> (2020). Li <i>et al.</i> (2020).
Nsp1, nsp6, nsp12-14,	Nsp6 y nsp13 bloquean a TBK1 para inhibir la activación de IRF3. Nsp1, nsp6, nsp13, ORF3a,	SARS-CoV-2.	Xia <i>et al.</i> (2020). Lei <i>et al.</i> (2020).

ORF7a, ORF7b y ORF8.	ORF7b inhiben la fosforilación de STAT1. Nsp6, nsp13, ORF7a y ORF7b inhiben la fosforilación de STAT2. Nsp12 inhibe síntesis de IFN-I. ORF8 y nsp14 inhiben la síntesis y señalización de IFN-I.		Li <i>et al.</i> (2020).
----------------------------	---	--	--------------------------

Asimismo, SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2, comparten proteínas que interfieren con la síntesis de IFN-I y su señalización. Como se resume en la tabla 2, SARS-CoV-2 conserva las proteínas N, M, PLpro, ORF3b y ORF6, cuya actividad antagonista de IFN-I ha sido documentada en MERS-CoV y/o en SARS-CoV. Entre estas proteínas, únicamente para ORF6 se ha descubierto que su mecanismo de inhibición coincide con el descrito en ORF6 de SARS-CoV (Lei *et al.*, 2020; Xia *et al.*, 2020; Frieman *et al.*, 2007). Respecto a N, M, PLpro y ORF3b de SARS-CoV-2, los estudios de Lei *et al.* (2020) y Konno *et al.* (2020) sugieren que estas proteínas también actúan sobre la misma vía que sus ortólogas en SARS-CoV y MERS-CoV, pues inhiben la síntesis de IFN-I.

Un aspecto que subyace al mantenimiento de la actividad anti INF-I en las proteínas N, M, ORF3b y ORF6, así como la pérdida de función en PLpro de la cepa Wuhan-WIV04 de SARS-CoV-2, son las variaciones y la conservación de estructuras y funciones de ciertas regiones en las proteínas. Por este motivo, es importante analizar cómo repercuten los diversos cambios en las proteínas de SARS-CoV-2 respecto a sus ortólogas en SARS-CoV, MERS-CoV, e incluso en comparación con las nuevas cepas de SARS-CoV-2. De entre los casos antes mencionados, los más ampliamente estudiados corresponden a ORF6, PLpro y ORF3b.

Con base en los estudios realizados por Lei *et al.* (2020) ORF6 es la proteína con menor identidad (66.6%) con su ortóloga en SARS-CoV, (Figura 65A). Los grupos de Frieman *et al.* (2007) y Lei *et al.* (2020) reportaron que la región 53-61 del C-terminal de SARS-CoV y SARS-CoV-2 son esenciales en su actividad antagonista de IFN-I. Las sustituciones (E54D, Q56E e I60L; (Figura 65B) que se encuentran corresponden a aminoácidos con características fisicoquímicas similares a las que contiene su ortólogo

y por tanto, su función antagonista de IFN-I no es afectada, tal y como se demostró en las investigaciones de Lei *et al.* (2020).

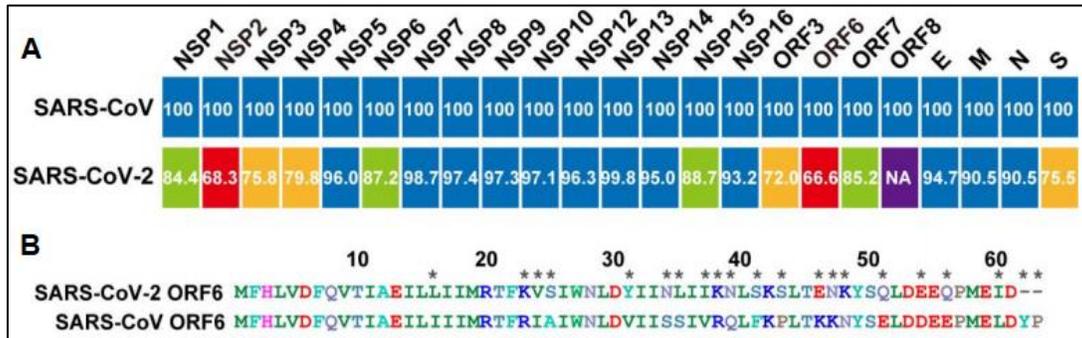


Figura 65. La proteína ORF6 de SARS-CoV-2 comparte un 66.6% de identidad respecto a su ortóloga en SARS-CoV. (A) Identidad de aminoácidos entre proteínas de SARS-CoV y SARS-CoV-2. Se asignó un valor de 100% de identidad a todas las proteínas de SARS-CoV. (B) Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de ORF6 de SARS-CoV-2 y SARS-CoV. Tomado de: Lei *et al.* (2020).

Un caso opuesto al de ORF6 es el del dominio PLpro de la cepa Wuhan-WIV04 de SARS-CoV-2, el cual a diferencia de sus ortólogos en SARS-CoV y MERS-CoV, no cuenta con actividad antagonista de IFN-I. La proteína nsp3 de SARS-CoV-2 comparte un 68.3% de identidad respecto a su ortólogo en SARS-CoV (Figura 65A). Sin embargo, en el dominio PLpro la identidad es mayor (83.0%) y solamente se identificaron dos sustituciones cruciales en el dominio Ub2 (Ubiquitin-binding domain 2): S67V y L76T (Figura 66). Estas dos sustituciones sí representan cambios en el tipo de cadena lateral de los aminoácidos y afectan la actividad DUB de PLpro perteneciente a la cepa Wuhan-WIV04, y con ello se anula su actividad antagonista de IFN-I (Yuen *et al.*, 2020).



Figura 66. El dominio PLpro de la cepa Wuhan-WIV04 SARS-CoV-2 presenta mutaciones cruciales que afectan su actividad DUB. (A) Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de PLpro de SARS-CoV-2 y SARS-CoV. Tomado de: Yuen *et al.* (2020).

Por otro lado, la ausencia de NLS en ORF3b de SARS-CoV-2 demuestra que la delección de una región, así como la localización específica de una proteína en la célula, pueden potenciar la actividad antagonista de IFN-I. De igual forma, la nueva variante

natural ORF3b Ecuador carece de la secuencia NLS (presuntivamente conformada por los residuos 135-154 en ORF3b de SARS-CoV), además de presentar la mutación *23Q, con la cual hubo la pérdida de un codón de paro prematuro y se extendió su longitud hasta 56 residuos de aminoácidos (Figura 67) (Konno *et al.*, 2020).

El surgimiento de la variante ORF3b Ecuador es un claro ejemplo de que SARS-CoV-2 está evolucionando y que durante dicho proceso se pueden dar eventos en los que las nuevas variantes conserven los elementos de la proteína paternal que favorecen su actividad, por ejemplo, la ausencia de NLS, y a su vez, adquieran nuevas características como la región adicional del residuo 23-56 que potencia su capacidad para contrarrestar la respuesta del hospedero.

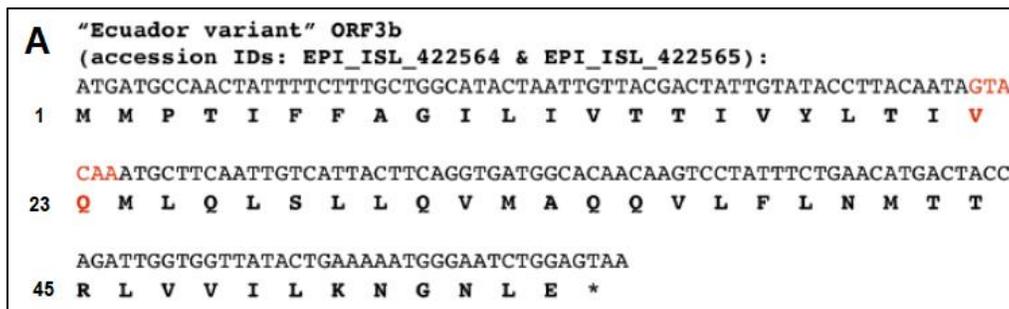


Figura 67. La variante ORF3b Ecuador de SARS-CoV-2 carece de la secuencia NLS y presenta una elongación de 34 residuos de aminoácidos. (A) Secuencias de nucleótidos (superior) y aminoácidos (inferior) de ORF3b de SARS-CoV-2 y la variante Ecuador. Los codones y aminoácidos marcados en color naranja son las modificaciones presentes en ORF3b Ecuador. Tomado de: Konno *et al.* (2020).

Los estudios de la función de las proteínas ORF6, PLpro y ORF3b, muestran que las consecuencias que puede tener una modificación sobre la actividad antagonista de una proteína, dependen en gran medida de la región o dominio que es afectado. De esta manera, es posible que haya mutaciones, deleciones, u otro tipo de variaciones genéticas que provoquen el mantenimiento, potenciación, pérdida o ganancia de la actividad anti-INF-I de las proteínas virales. Un probable ejemplo de ganancia de nueva actividad antagonista podría ser el caso de la proteína M de SARS-CoV-2 pues en el estudio de Xia *et al.* (2020) fue identificada como inhibidor de la fosforilación de STAT1.

Asimismo, las mutaciones que ha sufrido el genoma de SARS-CoV-2 son las responsables de que únicamente algunas de sus proteínas posean actividad

antagonista de IFN-I en comparación con aquellas que también están presentes en MERS-CoV y/o en SARS-CoV pero que carecen de tal función, como lo son nsp1, nsp6, nsp12, nsp13, nsp14, ORF3a, ORF7a y ORF7b . Este grupo de proteínas, aunadas a N, M, PLpro, ORF3b y ORF6, confieren a SARS-CoV-2 más ventajas tanto en su replicación como en su capacidad para evadir el reconocimiento y la respuesta antiviral del hospedero (Figura 64A). Tales aspectos pueden contribuir de manera importante al agravamiento de los pacientes con COVID-19 e incluso ser cruciales en el desarrollo de diversas complicaciones como un síndrome hiperinflamatorio.

En conjunto, la información recopilada confirma la hipótesis de este trabajo, pues existe evidencia de que SARS-CoV-2 posee proteínas que mantienen la actividad antagonista de IFN-I respecto a aquellas proteínas con la misma función reportada en SARS-CoV y MERS-CoV.

3.2 Determinación de la actividad antagonista de IFN-I de proteínas virales.

Como se apreció en la descripción de las investigaciones enfocadas en el estudio de las proteínas virales, existe un procedimiento general mediante el cual se determina la actividad antagonista de IFN-I, así como el posible factor del hospedero que es afectado en la vía de señalización. Las técnicas principalmente empleadas son el ensayo reportero dual de luciferasa, para evaluar la activación de un promotor, y la coimmunoprecipitación, para elucidar la interacción entre proteínas. Ambas técnicas, aunadas a otros experimentos realizados, son llevados a cabo *in vitro*.

Un aspecto que se debe tener presente acerca de los ensayos *in vitro* es que no necesariamente reflejan lo que ocurre durante la infección *in vivo*, pues en esta se ven involucrados una gran cantidad de factores, tales como el complejo esquema de replicación de los coronavirus, el cual implica la expresión de proteínas virales a diferentes tiempos y niveles, así como su compartimentalización y localización celular.

Un ejemplo que muestra la generación de conclusiones con cierto sesgo a partir de los ensayos *in vitro*, son los estudios realizados con el dominio PLpro de nsp3 de SARS-CoV y MERS-CoV. El grupo de Matthews *et al.* (2014) trabajó con el dominio

PLpro de SARS-CoV y descubrió su capacidad para desubiquitar a IRF3(5D) (molécula mimética de IRF3 constitutivamente activa), con lo cual inhibe la síntesis de IFN-I. De manera similar, Bailey-Elkin *et al.* (2014) demostraron que el dominio PLpro de MERS-CoV bloquea la señalización de IRF3(5D), y que la mutante de PLpro carente de actividad DUB pierde su función como antagonista. Sin embargo, al evaluar el potencial de nsp3 para realizar la misma función se observó que la forma completa de la proteína era incapaz de impedir la acción de IRF3(5D).

Una diferencia crucial entre nsp3 y PLpro es su localización celular. Debido a que nsp3 participa en la formación de invaginaciones para generar DMVs, durante el ciclo de replicación viral se encuentra anclada a membrana, mientras que el dominio PLpro estudiado *in vitro* puede estar libre en citoplasma. De ambas investigaciones se deduce que la actividad DUB de PLpro de SARS-CoV y MERS-CoV es inactivar a IRF3, sin embargo, debido a la localización de nsp3 en el contexto de la infección *in vivo*, es poco probable que actúe de esta manera para inhibir la síntesis de IFN-I como lo sugirieron los resultados obtenidos por Matthews *et al.* (2014).

Por otro lado, en los estudios enfocados en las proteínas de SARS-CoV-2 se observó que algunos resultados fueron consistentes entre las diferentes investigaciones, como lo fue con la identificación de la actividad anti IFN-I de ORF6, mientras que en otros hubo discrepancia, o en su defecto, sólo en algunas investigaciones se les caracterizó como antagonistas de IFN-I, siendo un ejemplo ORF3b.

La cantidad de plásmido empleada para expresar una proteína es uno de los factores que influyen en mayor medida sobre los resultados y las diferencias reportadas por distintos grupos. Este factor repercute directamente sobre la cantidad de proteína producida y, por tanto, en la determinación de su actividad antagonista, así como en las interacciones con otras proteínas.

Debido al uso de promotores fuertes y constitutivos, la sobreexpresión de una proteína puede favorecer su asociación con alguno de los componentes de las vías de señalización y con ello, contribuir a la disminución de la expresión génica, ya sea de

IFN-I o ISGs. De esta manera, es posible que ocurran variaciones en los niveles de proteína reportados por los distintos grupos de investigación y que esto se refleje en la actividad antagonista de IFN-I.

Por esta razón, en algunas ocasiones, los estudios realizados por diversos autores generaron resultados que son difíciles de analizar y comparar entre los tres coronavirus incluidos en este trabajo. Asimismo, cuando la cantidad de una proteína en estudio dista considerablemente de los niveles producidos durante la infección *in vivo*, podría tenerse un sesgo en la información obtenida experimentalmente.

3.3 Desregulación de IFN-I: Modelos animales y estudios en pacientes con COVID-19.

Aunque es posible que los resultados obtenidos *in vitro* no reproduzcan en su totalidad lo que ocurre *in vivo* durante la infección, sí aportan evidencias sobre los mecanismos que operan para explicar las observaciones realizadas tanto en modelos animales experimentales como en pacientes con COVID-19, y que confirman que ocurre desregulación en la producción y señalización de IFN-I.

Estudios en ratones BALB/c infectados por SARS-CoV proporcionan un panorama en torno al efecto que tiene a nivel sistémico la desregulación de IFN-I, particularmente el retraso de su producción respecto al tiempo en que se alcanza el máximo de la carga viral. Cuando ocurre un retraso en la síntesis de IFN-I se desencadena una serie de eventos que concluye con el reclutamiento sostenido de IMMs al sitio de infección, mismos que provocan daños al tejido alveolar por la liberación de ROS, sobreproducción de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8 y la síntesis de quimiocinas como CCL2 que refuerzan el flujo de IMMs (Channappanavar *et al.* (2016).

Asimismo, estudios en pacientes infectados con SARS-CoV y MERS-CoV han demostrado que el curso de ambas infecciones se caracteriza por la sobreproducción de IL-1, IL-6, IL-8, CXCL10 y CCL2, así como la acumulación de monocitos y macrófagos (Nicholls *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2016; Min *et al.*, 2016).

Estas características son consistentes con la desregulación de IFN-I y apoyan el planteamiento fisiopatológico propuesto por Channappanavar *et al.* (2016).

De manera similar, las investigaciones en pacientes con COVID-19 (Tabla 3) demostraron que las personas infectadas en estado severo y crítico presentan niveles elevados de TNF- α , IL-6 y factores quimiotácticos como CCL2 tanto en muestras de sangre periférica como de BALF. Asimismo, el análisis de muestras BALF proporcionó evidencia de que el microambiente bronco-alveolar de pacientes con mayor estado de gravedad se caracteriza por la baja cantidad de linfocitos NK y CD8+, además de estar enriquecido en macrófagos proinflamatorios. Al igual que en pacientes infectados por SARS-CoV, este perfil de citocinas proinflamatorias y población celular en el tejido pulmonar concuerda con los hallazgos y el modelo de Channappanavar *et al.* (2016).

Tabla 3. Hallazgos relacionados con la desregulación de IFN-I en pacientes con COVID-19.

Hallazgo en pacientes con COVID-19.	Referencia
Los pacientes en estado severo y crítico presentan bajos niveles plasmáticos de IFN- α 2, baja expresión de ISGs y sobreproducción de IL-6, TNF- α y CCL2. Asimismo, en sangre periférica sufren de linfopenia y acumulación de monocitos.	Hadjadj <i>et al.</i> (2020).
Durante su estancia en ICU, los pacientes en estado crítico alcanzan el máximo de la producción de IFN- α (día 7 después del inicio de síntomas). También en esta etapa se detectó linfopenia y un aumento en la densidad de monocitos en sangre periférica	Wei <i>et al.</i> (2020).
Dos grupos de pacientes en estado crítico presentaron perfiles distintos de producción de IFN- α 2: IFN-positivo e IFN-negativo. Pese a que el grupo IFN-positivo si produjo IFN- α (máximo nivel al día 8 después del inicio de síntomas), la letalidad fue de ~40% en ambos casos.	Trouillet-Assant <i>et al.</i> (2020)
El análisis de muestras BALF de pacientes con COVID-19 en estado severo reveló que su microambiente bronco-alveolar está enriquecido en macrófagos proinflamatorios, además de presentar niveles elevados de IL-6 e IL-8 y sobreexpresar quimiocinas como CCL2.	Liao <i>et al.</i> (2020)

En lo que respecta al análisis de IFN-I, en pacientes con COVID-19 en estado severo y crítico, los niveles plasmáticos de IFN- α son considerablemente bajos, encontrándose en el intervalo de 10^2 - 10^3 fg/mL, en comparación con el valor promedio de 5×10^3 fg/mL registrado en los pacientes que cursan la COVID-19 en un estado leve-moderado (Hadjadj *et al.* 2020; Trouillet-Assant *et al.* 2020). Un aspecto fundamental en la producción de IFN-I, es que debe ocurrir previa al tiempo en que se alcanza el máximo de la carga viral, pues si ocurre simultáneamente o posteriormente, se anula su efecto sobre el control de la infección y, por el contrario, contribuye al establecimiento de una respuesta inmune exacerbada.

Este retraso se ha demostrado en varios estudios, por ejemplo, células Calu-3 (línea celular de epitelio pulmonar) infectadas con SARS-CoV-2 tuvieron un retraso en la producción del transcrito de IFN- β , cuyo máximo nivel se registró a las 24 hpi, mismo tiempo en que se alcanzó el máximo del título viral. Estos resultados, señalaron la posibilidad de que al igual que en la infección causada por SARS-CoV, en COVID-19 también existiera un retraso en la síntesis de IFN-I (Lei *et al.*, 2020).

Con base en diversos estudios de meta-análisis (Cevic *et al.*, 2020; Walsh *et al.*, 2020) el máximo de la carga viral en pacientes con COVID-19 coincide con el inicio de los síntomas, o en su defecto, ocurre entre el tercer y quinto día posterior al comienzo de los mismos. Considerando esta dinámica de la carga viral de SARS-CoV-2, los resultados obtenidos por Trouillet-Assant *et al.* (2020) sugieren un retraso en la producción de IFN-I en el contexto de la COVID-19, ya que el máximo de la producción de IFN- $\alpha 2$ en pacientes IFN-positivo ocurrió hasta el séptimo día posterior al inicio de los síntomas.

Por otro lado, el retraso de la síntesis de IFN- $\alpha 2$ explicaría el porqué pese a su producción los pacientes IFN-positivo también se encontraban en estado crítico, aunado al hecho de que su señalización no contribuye de manera significativa a la recuperación de los pacientes, viéndose reflejando en un valor de letalidad muy similar al del grupo IFN-negativo.

El retraso de la síntesis de IFN-I, el bajo nivel de IFN- α y la expresión pobre de ISGs en pacientes con COVID-19 en estado crítico constituyen una evidencia importante de que las proteínas antagonistas de IFN-I de SARS-CoV-2 (N, M, nsp1, PLpro, nsp6, nsp12, nsp13, nsp14, ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a y ORF7b) sí tienen un impacto durante la patogénesis y contribuyen en última instancia al desarrollo de hipercitocinemia y una respuesta inmune exacerbada, ambos considerados factores que desencadenan y/o empeoran el síndrome de distrés respiratorio agudo en los pacientes (Figura 64B). Por estas razones, la posibilidad de diseñar y emplear terapias basadas en IFN-I es una cuestión que surge inevitablemente, por lo que es preciso abordar y discutir algunos aspectos relacionados con tal planteamiento.

Uno de los primeros enfoques que podrían considerarse es el diseño de antivirales para contrarrestar la actividad antagonista de IFN-I de alguna de las proteínas de SARS-CoV-2. En primera instancia, es necesario identificar qué proteínas contribuyen en mayor medida al bloqueo de la síntesis y señalización de IFN-I. En el caso particular de SARS-CoV-2, nsp1 y ORF6 han destacado en todos los estudios por su alta actividad anti-IFN-I. Asimismo, para que el antiviral sea más efectivo es importante dirigirle hacia una proteína que sea esencial para el ciclo replicativo de SARS-CoV-2, pues el hecho de que promuevan la replicación viral a través de la interferencia de la síntesis de IFN-I y su señalización, no implica que tales proteínas sean estrictamente necesarias para completar la formación de viriones.

Al respecto, estudios realizados con ratones infectados con el coronavirus MHV WT y MHV-nsp1 Δ 99, demostraron que los ratones infectados con la cepa mutante de nsp1 tuvieron un 100% de supervivencia a la infección, mientras que todos los infectados con la cepa WT sucumbieron entre el día 5 y 6 pi. Asimismo, esta investigación demostró que la mutante de nsp1 afecta de manera significativa la replicación de MHV (Züst *et al.* 2007).

Con base en las consideraciones antes mencionadas, al ser nsp1 un antagonista de IFN-I y probablemente un factor esencial en la replicación de SARS-CoV-2, podría ser un blanco terapéutico adecuado para el diseño de algún antiviral para el tratamiento de la COVID-19.

Por lo que ya se presentó y discutió referente a la temporalidad y efecto de IFN-I, es muy relevante evaluar el uso de IFN- α e IFN- β recombinantes como terapias para el tratamiento de pacientes con COVID-19, ya que su administración a destiempo podría reproducir una respuesta inmune aberrante, afectando así el estado de los pacientes.

Debido a que el diagnóstico de COVID-19 y la atención a pacientes en unidades médicas ocurre frecuentemente tras la aparición de síntomas (tiempo en que se alcanza el máximo de la carga viral) no es conveniente recurrir a la administración de IFN-I, pues ya ha pasado el periodo durante el cual podría tener un efecto de protección para el paciente. Aunado a este hecho, si existe un retraso en la producción de IFN-I, el suministrarle una dosis potenciaría sus efectos negativos como la sobreproducción de citocinas proinflamatorias y el reclutamiento sostenido de IMMs.

Por tales motivos, el uso de IFN-I probablemente solo sea recomendable como profiláctico, particularmente en personas que presenten mayor riesgo de contagiarse, como lo puede ser el personal de la salud. Como argumento para esta propuesta, se ha reportado que el pretratamiento de células Calu-3 con IFN-I disminuye de manera significativa la infección por SARS-CoV-2 (Park & Iwasaki, 2020).

En la actualidad se están llevando a cabo ensayos preclínicos y clínicos para evaluar el uso de IFN-I recombinante como terapia para la COVID-19, entre ellos, un ensayo sobre la inyección subcutánea de IFN- β 1a en combinación con antivirales como lopinavir (identificador: NCT04315948) y un ensayo en fase II relacionado con la inhalación de IFN- β 1a (identificador: NCT04385095). Respecto al uso profiláctico de IFN-I, en la provincia de Hubei se administraron gotas nasales de IFN- α recombinante a 2944 trabajadores de la salud, reportándose nula incidencia de infectados ni efectos adversos entre el personal tratado (Park & Iwasaki, 2020), lo cual presuntivamente indicaría su eficacia como agente profiláctico, aunque se requieren estudios clínicos formales que lo confirmen.

Por otro lado, un aspecto a resolver en pacientes graves son las manifestaciones clínicas causadas por la desregulación de IFN-I, tales como la tormenta de citocinas e hiperinflamación. Entre los posibles fármacos se ha propuesto emplear inhibidores de la

vía Jak-STAT ya sea de manera individual o combinados con inhibidores de IL-1 e IL-6, antiinflamatorios e inmunomoduladores (Figura 68). En particular, los inhibidores de IL-1 y de la vía Jak-STAT han demostrado tener tiempos de vida media cortos, por lo que su efecto ayudaría a aminorar rápidamente las complicaciones asociadas a una respuesta inmune aberrante en pacientes con COVID-19 (Ingraham *et al.*, 2020).

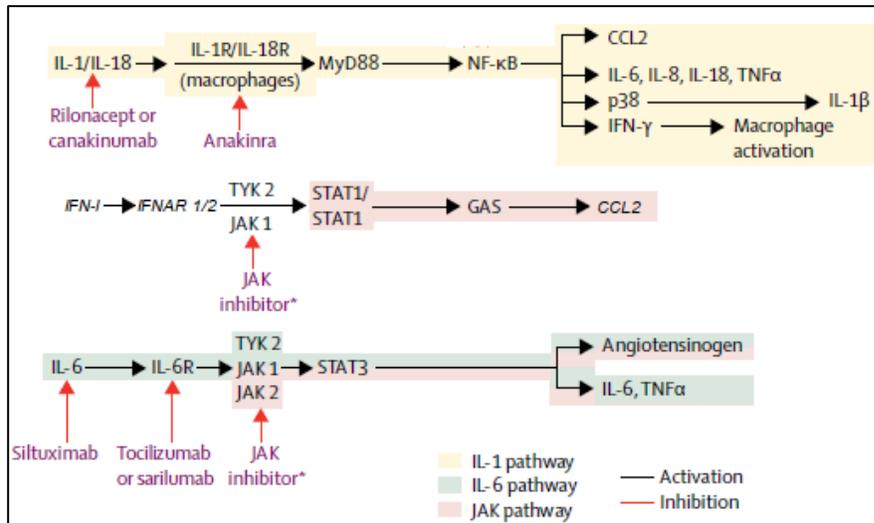


Figura 68. Propuesta de fármacos y blancos terapéuticos para el control de tormenta de citocinas e hiperinflamación en pacientes con COVID-19. *Inhibidores de Jak: ruxolitinib, tofacitinib, baricitinib, peficitinib, fedratinib y upadacitinib. Tomado de: Ingraham *et al.* (2020).

4 CONCLUSIONES.

En la actualidad, se ha encontrado que el agente etiológico de la COVID-19 conserva la actividad antagonista de las proteínas N, M, PLpro, ORF3b y ORF6, las cuales interfieren sobre la activación y/o translocación nuclear de factores de transcripción como IRF3 y STAT1, bloqueando así la expresión génica de IFN-I o ISGs. Entre este grupo de proteínas ORF3b es de especial relevancia, ya que se ha descubierto una nueva variante natural (ORF3b Ecuador) que inhibe aún más la síntesis de IFN-I. Esta variante es una prueba fehaciente de que SARS-CoV-2 está evolucionando rápidamente, con lo cual puede adquirir mayor capacidad para evadir la respuesta del hospedero.

Asimismo, se han detectado proteínas cuya actividad antagonista sobre la vía Jak-STAT únicamente se ha descrito en SARS-CoV-2. Dichas proteínas se han agrupado como inhibidores de la fosforilación de STAT1: nsp1, nsp6, nsp13, ORF3a, M y ORF7b e inhibidores de la fosforilación de STAT2: nsp6, nsp13, ORF7a y ORF7b.

Los antagonistas de IFN-I en SARS-CoV-2 se han relacionado con la desregulación de IFN-I en pacientes con COVID-19 en estado severo y crítico. Estudios con estos pacientes han determinado que presentan una producción retrasada y baja de IFN- α , la cual es inoportuna para el control de la infección, pues ocurre después del tiempo en que se ha alcanzado la carga viral máxima. Por otro lado, el retraso de la síntesis de IFN-I promueve un estado hiperinflamatorio que en la COVID-19 se caracteriza por la acumulación de monocitos y macrófagos, así como el desarrollo de una tormenta de citocinas enriquecida en IL-6 y TNF- α , factores que se han asociado al daño tisular y agravamiento del síndrome de distrés respiratorio agudo.

5 REFERENCIAS.

- Ashour, H. M., Elkhatib, W. F., Rahman, M. M., & Elshabrawy, H. A. (2020). Insights into the recent 2019 novel coronavirus (Sars-CoV-2) in light of past human coronavirus outbreaks. *Pathogens*, *9*(3), 1–15. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030186>
- Bailey-Elkin, B. A., Knaap, R. C. M., Johnson, G. G., Dalebout, T. J., Ninaber, D. K., Van Kasteren, P. B., Bredenbeek, P. J., Snijder, E. J., Kikkert, M., & Mark, B. L. (2014). Crystal structure of the middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) papain-like protease bound to ubiquitin facilitates targeted disruption of deubiquitinating activity to demonstrate its role in innate immune suppression. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(50), 34667–34682. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.609644>
- Blanco-Melo, D., Nilsson-Payant, B. E., Liu, W. C., Uhl, S., Hoagland, D., Møller, R., Jordan, T. X., Oishi, K., Panis, M., Sachs, D., Wang, T. T., Schwartz, R. E., Lim, J. K., Albrecht, R. A., & tenOever, B. R. (2020). Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*, *181*(5), 1036-1045. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>
- Cevik, M., Tate, M., Lloyd, O., Maraolo, A. E., Schafers, J., & Ho, A. (2020). SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Microbe*, *5247*(20), 1–10. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(20\)30172-5](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30172-5)
- Chan, C.-P., Siu, K.-L., Chin, K.-T., Yuen, K.-Y., Zheng, B., & Jin, D.-Y. (2006). Modulation of the Unfolded Protein Response by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein. *Journal of Virology*, *80*(18), 9279–9287. <https://doi.org/10.1128/jvi.00659-06>
- Chan, J. F. W., Kok, K. H., Zhu, Z., Chu, H., To, K. K. W., Yuan, S., & Yuen, K. Y. (2020). Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes and Infections*, *9*(1), 221–236. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>
- Chan, R. W. Y., Chan, M. C. W., Agnihothram, S., Chan, L. L. Y., Kuok, D. I. T., Fong, J. H. M., Guan, Y., Poon, L. L. M., Baric, R. S., Nicholls, J. M., & Peiris, J. S. M. (2013). Tropism of and Innate Immune Responses to the Novel Human *Betacoronavirus* Lineage C Virus in Human Ex Vivo Respiratory Organ Cultures. *Journal of Virology*, *87*(12), 6604–6614. <https://doi.org/10.1128/jvi.00009-13>
- Channappanavar, R., Fehr, A. R., Vijay, R., Mack, M., Zhao, J., Meyerholz, D. K., & Perlman, S. (2016). Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. *Cell Host and Microbe*, *19*(2), 181–193. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.007>

- Channappanavar, R., Fehr, A. R., Zheng, J., Wohlford-Lenane, C., Abrahante, J. E., Mack, M., Sompallae, R., McCray, P. B., Meyerholz, D. K., & Perlman, S. (2019). IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes. *Journal of Clinical Investigation*, *129*(9), 3625–3639. <https://doi.org/10.1172/JCI126363>
- Chen, G., Wu, D., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., Wang, H., Wang, T., Zhang, X., Chen, H., Yu, H., Zhang, X., Zhang, M., Wu, S., Song, J., Chen, T., Han, M., Li, S., Luo, X., Zhao, J., & Ning, Q. (2020). Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *Journal of Clinical Investigation*, *130*(5), 2620–2629. <https://doi.org/10.1172/JCI137244>
- Devaraj, S. G., Wang, N., Chen, Z., Chen, Z., Tseng, M., Barretto, N., Lin, R., Peters, C. J., Tseng, C. T. K., Baker, S. C., & Li, K. (2007). Regulation of IRF-3-dependent innate immunity by the papain-like protease domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(44), 32208–32221. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704870200>
- Fan, E., Brodie, D., & Slutsky, A. S. (2018). Acute respiratory distress syndrome advances in diagnosis and treatment. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *319*(7), 698–710. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.21907>
- Fitzgerald-Bocarsly, P., & Feng, D. (2007). The role of type I interferon production by dendritic cells in host defense. *Biochimie*, *89*, 843–855. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.04.018>
- Freundt, E. C., Yu, L., Park, E., Lenardo, M. J., & Xu, X.-N. (2009). Molecular Determinants for Subcellular Localization of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Open Reading Frame 3b Protein. *Journal of Virology*, *83*(13), 6631–6640. <https://doi.org/10.1128/jvi.00367-09>
- Frieman, M., Yount, B., Heise, M., Kopecky-Bromberg, S. A., Palese, P., & Baric, R. S. (2007). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus ORF6 Antagonizes STAT1 Function by Sequestering Nuclear Import Factors on the Rough Endoplasmic Reticulum/Golgi Membrane. *Journal of Virology*, *81*(18), 9812–9824. <https://doi.org/10.1128/jvi.01012-07>
- Fung, T. S., & Liu, D. X. (2019). Human coronavirus: Host-pathogen interaction. *Annual Review of Microbiology*, *73*, 529–560. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115759>
- Hadjadj, J., Yatim, N., Barnabei, L., Corneau, A., Boussier, J., Smith, N., Péré, H., Charbit, B., Bondet, V., Chenevier-Gobeaux, C., Breillat, P., Carlier, N., Gauzit, R., Morbieu, C., Pène, F., Marin, N., Roche, N., Szwebel, T. A., Merklings, S. H., Trel, B. (2020). Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science*, *369*(6504), 718–724. <https://doi.org/10.1126/science.abc6027>

- Hartenian, E., Nandakumar, D., Lari, A., Ly, M., Tucker, J. M., & Glaunsinger, B. A. (2020). The molecular virology of coronaviruses. *Journal of Biological Chemistry*, 295(37), 12910–12934. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.013930>
- Hu, Y., Li, W., Gao, T., Cui, Y., Jin, Y., Li, P., Ma, Q., Liu, X., & Cao, C. (2017). The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nucleocapsid Inhibits Type I Interferon Production by Interfering with TRIM25-Mediated RIG-I Ubiquitination. *Journal of Virology*, 91(8), 1–15.
- Ingraham, N. E., Lotfi-Emran, S., Thielen, B. K., Techar, K., Morris, R. S., Holtan, S. G., Dudley, R. A., & Tignanelli, C. J. (2020). Immunomodulation in COVID-19. *The Lancet Respiratory Medicine*, 8(6), 544–546. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30226-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30226-5)
- Ivashkiv, L. B., & Donlin, L. T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, 14(1), 36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>
- Jiang, X., Kinch, L. N., Brautigam, C. A., Chen, X., Du, F., Grishin, N. V., & Chen, Z. J. (2012). Ubiquitin-Induced Oligomerization of the RNA Sensors RIG-I and MDA5 Activates Antiviral Innate Immune Response. *Immunity*, 36(6), 959–973. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.022>
- Kim, E. S., Choe, P. G., Park, W. B., Oh, H. S., Kim, E. J., Nam, E. Y., Na, S. H., Kim, M., Song, K. H., Bang, J. H., Park, S. W., Kim, H. Bin, Kim, N. J., & Oh, M. D. (2016). Clinical progression and cytokine profiles of middle east respiratory syndrome coronavirus infection. *Journal of Korean Medical Science*, 31(11), 1717–1725. <https://doi.org/10.3346/jkms.2016.31.11.1717>
- Kindler, E., Thiel, V., & Weber, F. (2016). Interaction of SARS and MERS Coronaviruses with the Antiviral Interferon Response. *Advances in Virus Research*, 96, 219–243. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.006>
- Kindler, E., & Thiel, V. (2016). SARS-CoV and IFN: Too Little, Too Late. *Cell Host and Microbe*, 19(2), 139–141. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.012>
- Konno, Y., Kimura, I., Uriu, K., Fukushi, M., Irie, T., Koyanagi, Y., Sauter, D., Gifford, R. J., Nakagawa, S., & Sato, K. (2020). SARS-CoV-2 ORF3b Is a Potent Interferon Antagonist Whose Activity Is Increased by a Naturally Occurring Elongation Variant. *Cell Reports*, 32(12), 108185. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108185>
- Kopecky-Bromberg, S. A., Martínez-Sobrido, L., Frieman, M., Baric, R. A., & Palese, P. (2007). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Open Reading Frame (ORF) 3b, ORF 6, and Nucleocapsid Proteins Function as Interferon Antagonists. *Journal of Virology*, 81(2), 548–557. <https://doi.org/10.1128/jvi.01782-06>
- Lei, X., Dong, X., Ma, R., Wang, W., Xiao, X., Tian, Z., Wang, C., Wang, Y., Li, L., Ren, L., Guo, F., Zhao, Z., Zhou, Z., Xiang, Z., & Wang, J. (2020). Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. *Nature Communications*, 11(1), 3810. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17665-9>

- Li, J. Y., Liao, C. H., Wang, Q., Tan, Y. J., Luo, R., Qiu, Y., & Ge, X. Y. (2020). The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 inhibit type I interferon signaling pathway. *Virus Research*, 286, 198074. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198074>
- Li, K., Markosyan, R. M., Zheng, Y. M., Golfetto, O., Bungart, B., Li, M., Ding, S., He, Y., Liang, C., Lee, J. C., Gratton, E., Cohen, F. S., & Liu, S. L. (2013). IFITM Proteins Restrict Viral Membrane Hemifusion. *PLoS Pathogens*, 9(1), e1003124. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003124>
- Liao, M., Liu, Y., Yuan, J., Wen, Y., Xu, G., Zhao, J., Cheng, L., Li, J., Wang, X., Wang, F., Liu, L., Amit, I., Zhang, S., & Zhang, Z. (2020). Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nature Medicine*, 26(6), 842–844. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0901-9>
- Lu, X., Pan, J., Tao, J., & Guo, D. (2011). SARS-CoV nucleocapsid protein antagonizes IFN- β response by targeting initial step of IFN- β induction pathway, and its C-terminal region is critical for the antagonism. *Virus Genes*, 42(1), 37–45. <https://doi.org/10.1007/s11262-010-0544-x>
- Matthews, K., Schäfer, A., Pham, A., & Frieman, M. (2014). The SARS coronavirus papain like protease can inhibit IRF3 at a post activation step that requires deubiquitination activity. *Virology Journal*, 11(209), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12985-014-0209-9>
- Mielech, A. M., Kilianski, A., Baez-Santos, Y. M., Mesecar, A. D., & Baker, S. C. (2014). MERS-CoV papain-like protease has deISGylating and deubiquitinating activities. *Virology*, 450–451, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.11.040>
- Min, C. K., Cheon, S., Ha, N. Y., Sohn, K. M., Kim, Y., Aigerim, A., Shin, H. M., Choi, J. Y., Inn, K. S., Kim, J. H., Moon, J. Y., Choi, M. S., Cho, N. H., & Kim, Y. S. (2016). Comparative and kinetic analysis of viral shedding and immunological responses in MERS patients representing a broad spectrum of disease severity. *Scientific Reports*, 6, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep25359>
- Newton, K., & Dixit, V. M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(3), 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006049>
- Nguyen, N., Strnad, O., Klein, T., Luo, D., Alharbi, R., Wonka, P., Maritan, M., Mindek, P., Autin, L., Goodsell, D. S., & Viola, I. (2020). Modeling in the time of covid-19: Statistical and rule-based mesoscale models. *ArXiv*, 1–20. <https://doi.org/10.1109/tvcg.2020.3030415>
- Nicholls, J. M., Poon, L. L., Lee, K. C., Ng, W. F., Lai, S. T., Leung, C. Y., Chu, C. M., Hui, P. K., Mak, K. L., Lim, W., Yan, K. W., Chan, K. H., Tsang, N. C., Guan, Y., Yuen, K. Y., & Peiris, J. S. (2003). Lung pathology of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 361(9371), 1773–1778.

- Park, A., & Iwasaki, A. (2020). Type I and Type III Interferons – Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. *Cell Host and Microbe*, 27(6), 870–878. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.008>
- Pedersen, S. F., & Ho, Y. C. (2020). SARS-CoV-2: A storm is raging. *Journal of Clinical Investigation*, 130(5), 2202–2205. <https://doi.org/10.1172/JCI137647>
- Piehler, J., Thomas, C., Christopher Garcia, K., & Schreiber, G. (2012). Structural and dynamic determinants of type I interferon receptor assembly and their functional interpretation. *Immunological Reviews*, 250(1), 317–334. <https://doi.org/10.1111/imr.12001>
- Rabaan, A. A., Al-Ahmed, S. H., Haque, S., Sah, R., Tiwari, R., Malik, Y. S., Dhama, K., Yattoo, M. I., Bonilla-Aldana, D. K., & Rodriguez-Morales, A. J. (2020). SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: A comparative overview. *Infezioni in Medicina*, 28(2), 174–184.
- Reid, S. P., Leung, L. W., Hartman, A. L., Martinez, O., Shaw, M. L., Carbonnelle, C., Volchkov, V. E., Nichol, S. T., & Basler, C. F. (2006). Ebola Virus VP24 Binds Karyopherin $\alpha 1$ and Blocks STAT1 Nuclear Accumulation. *Journal of Virology*, 80(11), 5156–5167. <https://doi.org/10.1128/jvi.02349-05>
- Samuel, C. (2012). ADARs, Viruses and Innate Immunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 353, 163–195. <https://doi.org/10.1007/82>
- Siu, K. L., Kok, K. H., Ng, M. H. J., Poon, V. K. M., Yuen, K. Y., Zheng, B. J., & Jin, D. Y. (2009). Severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein inhibits type I interferon production by impeding the formation of TRAF3-TANK-TBK1/IKK ϵ complex. *Journal of Biological Chemistry*, 284(24), 16202–16209. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.008227>
- Spiegel, M., Pichlmair, A., Martínez-Sobrido, L., Cros, J., García-Sastre, A., Haller, O., & Weber, F. (2005). Inhibition of Beta Interferon Induction by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Suggests a Two-Step Model for Activation of Interferon Regulatory Factor 3. *Journal of Virology*, 79(4), 2079–2086. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.4.2079-2086.2005>
- Spitzer, M.H., & Nolan, G. . (2016). Mass Cytometry: Single Cells, Many Features. *Cell*, 4(2), 780–791. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.019.Mass>
- Sun, L., Xing, Y., Chen, X., Zheng, Y., Yang, Y., Nichols, D. B., Clementz, M. A., Banach, B. S., Li, K., Baker, S. C., & Chen, Z. (2012). Coronavirus papain-like proteases negatively regulate antiviral innate immune response through disruption of STING-mediated signaling. *PLoS ONE*, 7(2), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030802>
- Teijaro, J. R. (2016). Type I interferons in viral control and immune regulation. *Current Opinion in Virology*, 16, 31–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2016.01.001>

- Thoms, M., Buschauer, R., Ameisemeier, M., Koepke, L., Denk, T., Hirschenberger, M., Kratzat, H., Hayn, M., Mackens-Kiani, T., Cheng, J., Straub, J. H., Stürzel, C. M., Fröhlich, T., Berninghausen, O., Becker, T., Kirchhoff, F., Sparrer, K. M. J., & Beckmann, R. (2020). Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science*, 369(6508), 1249–1256. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABC8665>
- Totura, A. L., & Baric, R. S. (2012). SARS coronavirus pathogenesis: host innate immune responses and viral antagonism of interferon. *Current Opinion in Virology*, 2, 264–275. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2012.04.004>
- Trouillet-Assant, S., Viel, S., Gaymard, A., Pons, S., Richard, J. C., Perret, M., Villard, M., Brengel-Pesce, K., Lina, B., Mezidi, M., Bitker, L., Belot, A., Mouton, W., Oriol, G., Compagnon, C., Generenaz, L., Cheynet, V., Ader, F., Becker, A., ... Walzer, T. (2020). Type I IFN immunoprofiling in COVID-19 patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 146(1), 206–208. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.029>
- Walsh, K. A., Jordan, K., Clyne, B., Rohde, D., Drummond, L., Byrne, P., Ahern, S., Carty, P. G., Brien, K. K. O., Murchu, E. O., Neill, M. O., Smith, S. M., Ryan, M., & Harrington, P. (2020). SARS-CoV-2 detection, viral load and infectivity over the course of an infection. *Journal of Infection*, 81, 357–371.
- Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S., & Li, F. (2020). Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *Journal of Virology*, 94(7), 1–9. <https://doi.org/10.1128/jvi.00127-20>
- Wei, L., Ming, S., Zou, B., Wu, Y., Hong, Z., Li, Z., Zheng, X., Huang, M., Luo, L., Liang, J., Wen, X., Chen, T., Liang, Q., Kuang, L., Shan, H., & Huang, X. (2020). Viral Invasion and Type I Interferon Response Characterize the Immunophenotypes During Covid-19 Infection. *Cell Press*, 2, 1–27. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3564998>
- Wong, C. K., Lam, C. W. K., Wu, A. K. L., Ip, W. K., Lee, N. L. S., Chan, I. H. S., Lit, L. C. W., Hui, D. S. C., Chan, M. H. M., Chung, S. S. C., & Sung, J. J. Y. (2004). Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clinical and Experimental Immunology*, 136(1), 95–103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02415.x>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Lam, C. S. F., Lau, C. C. Y., Tsang, A. K. L., Lau, J. H. N., Bai, R., Teng, J. L. L., Tsang, C. C. C., Wang, M., Zheng, B.-J., Chan, K.-H., & Yuen, K.-Y. (2012). Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus *Deltacoronavirus* Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of *Alphacoronavirus* and *Betacoronavirus* and Avian Coronaviruses as the Gene Source of *Gammacoronavirus* and *Deltacoronavi*. *Journal of Virology*, 86(7), 3995–4008. <https://doi.org/10.1128/jvi.06540-11>
- World Health Organization. (25 de enero de 2021). *WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard*. <https://covid19.who.int/>

- Xia, H., Cao, Z., Xie, X., Zhang, X., Chen, J. Y. C., Wang, H., Menachery, V. D., Rajsbaum, R., & Shi, P. Y. (2020). Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. *Cell Reports*, 33(1), 108234. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108234>
- Yang, Y., Zhang, L., Geng, H., Deng, Y., Huang, B., Guo, Y., Zhao, Z., & Tan, W. (2013). The structural and accessory proteins M, ORF 4a, ORF 4b, and ORF 5 of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) are potent interferon antagonists. *Protein and Cell*, 4(12), 951–961. <https://doi.org/10.1007/s13238-013-3096-8>
- Yuen, C. K., Lam, J. Y., Wong, W. M., Mak, L. F., Wang, X., Chu, H., Cai, J. P., Jin, D. Y., To, K. K. W., Chan, J. F. W., Yuen, K. Y., & Kok, K. H. (2020). SARS-CoV-2 nsp13, nsp14, nsp15 and orf6 function as potent interferon antagonists. *Emerging Microbes and Infections*, 9(1), 1418–1428. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1780953>
- Zhou, Z., Ren, L., Zhang, L., Zhong, J., Xiao, Y., Jia, Z., Guo, L., Yang, J., Wang, C., Jiang, S., Yang, D., Zhang, G., Li, H., Chen, F., Xu, Y., Chen, M., Gao, Z., Yang, J., Dong, J., ... Wang, J. (2020). Heightened Innate Immune Responses in the Respiratory Tract of COVID-19 Patients. *Cell Host and Microbe*, 27(6), 883–890. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.04.017>
- Züst, R., Cervantes-Barragán, L., Kuri, T., Blakqori, G., Weber, F., Ludewig, B., & Thiel, V. (2007). Coronavirus non-structural protein 1 is a major pathogenicity factor: Implications for the rational design of coronavirus vaccines. *PLoS Pathogens*, 3(8), 1062–1072. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030109>

ANEXO 1. Rúbrica para análisis de artículos científicos originales.

Datos del artículo	Autor(es), Año, Título, Revista, Vol. Páginas.
I. Introducción y Antecedentes	
¿Cuáles son los antecedentes generales del campo de estudio?	
¿Cuáles son los antecedentes particulares que originan el estudio?	
¿Cuál es la pregunta de investigación que trata de responder el estudio?	
II. Materiales y Métodos	
¿Cuáles son los métodos principales empleados para responder la pregunta de investigación?	
¿Cuáles son las ventajas y desventajas de estos métodos?	
III. Resultados	
¿Cuáles son los principales hallazgos novedosos en el estudio?	
¿Todos los experimentos se realizaron con controles adecuados?	
¿Hay algún resultado que no haya quedado claro?	
IV. Discusión	
¿Cuál es la principal conclusión del estudio?	
¿Se respondió la pregunta de investigación?	
¿Se generaron hipótesis alternativas nuevas para explicar los resultados?	
¿Qué perspectivas (estudios) nuevas se pueden generar?	